



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
AREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE INGENIERIA
MAESTRIA EN INGENIERIA AMBIENTAL



**EVALUACIÓN DEL USO DE LA VINAZA (RESIDUO INDUSTRIAL) PARA LA
OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO EMPLEANDO *Aspergillus niger*.**

AUTOR: Ing. Pedro Lugo

TUTOR: Msc. Luis Amaiz

Valencia, 20 de Marzo de 2017



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
AREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE INGENIERIA
MAESTRIA EN INGENIERIA AMBIENTAL



**EVALUACIÓN DEL USO DE LA VINAZA (RESIDUO INDUSTRIAL) PARA LA
OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO EMPLEANDO *Aspergillus niger*.**

AUTOR: Ing. Pedro Lugo

Trabajo presentado ante el Área de Estudios de
Postgrado de la Universidad de Carabobo para
Optar al título de Magister en Ingeniería Ambiental

Valencia, 20 de Marzo de 2017



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
AREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE INGENIERIA
MAESTRIA EN INGENIERIA AMBIENTAL



**EVALUACIÓN DEL USO DE LA VINAZA (RESIDUO INDUSTRIAL) PARA LA
OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO EMPLEANDO *Aspergillus niger*.**

AUTOR: Ing. Pedro Lugo

Aprobado en el Área de Estudios de Postgrado de la Universidad de
Carabobo por Miembros de la Comisión Coordinadora del Programa:

_____ (Nombre, Apellido y Firma)
_____ (Nombre, Apellido y Firma)
_____ (Nombre, Apellido y Firma)

Valencia, 20 de Marzo de 2017



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
AREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE INGENIERIA
MAESTRIA EN INGENIERIA AMBIENTAL



VEREDICTO

Nosotros, Miembros del Jurado designado para la evaluación del Trabajo de Grado titulado: **EVALUACIÓN DEL USO DE LA VINAZA (RESIDUO INDUSTRIAL) PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO EMPLEANDO *Aspergillus niger***. Presentado por: **PEDRO LUIS LUGO GARCIA** para optar al título de **MAGISTER EN INGENIERIA AMBIENTAL** estimamos que el mismo reúne los requisitos para ser considerado como:

Aprobado: _____ Tesis óptima: _____

Nombre y Apellido del Jurado

Cédula de Identidad

Firma

Valencia, 20 de Marzo de 2017

DEDICATORIA

Éste trabajo especial de grado se lo dedico a Dios primeramente.

A mis padres Orlando y Maritza, a mis hermanos Orlando y Reinaldo y a mi tia Maryori.

A toda mi familia.

Y a mis amigos: Adolfo, Naimir, Martha, Analia, Vianna, Ronald, Oswaldo, Marcos, Luis Amaiz, Rosmary Vargas y Oscar Valbuena.

AGRADECIMIENTOS

A dios, por permitirme gozar de buena salud y poder realizar éste sueño de cursar estudios de Magister en Ingeniería Ambiental.

A mis padres Orlando y Maritza, a mis hermanos Orlando y Reinaldo, a mis tíos: Maryori, Luis, Lourdes, Jorge, Pedro, Reinaldo, Nelly, Doris e Iván que siempre han estado animándome para crecer académica, profesional y moralmente.

A mis amigos Adolfo, Naimir, Martha, Analia, Vianna, Ronald, Oswaldo y Marcos, por su apoyo durante toda mi carrera.

Al Centro de Investigaciones Microbiológicas Aplicadas CIMA-UC y personal en general que allí labora, por permitirme realizar mi trabajo especial de grado para optar por el título de Magister.

A los Profesores Msc. Luis Amaiz y Lic. Rosmary Vargas por acompañarme en todo momento y por brindarme tantos conocimientos valiosos en todos los ámbitos de mi vida.

Especial agradecimiento al Profesor Dr. Oscar Valbuena por su gran apoyo, ayuda, consejos y amistad.

Al Director de CIMA-UC, Profesor Dr. Luis Medina por permitirme realizar esta investigación en este centro.

A la Profesoras Katuska del Departamento de Química de FACYT - UC y a María Cristina Colmenares de la Facultad de Ingeniería - UC, por brindarme su ayuda para la realización de éste trabajo especial de grado.

Al Profesor Dr. Doménico Pavone por su apoyo.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera colaboraron con la realización de esta investigación.

ÍNDICE

	Pág
Planteamiento del problema.....	1
Objetivos.....	9
Justificación.....	10
Antecedentes.....	13
Bases Teóricas.....	15
Marco Metodológico.....	44
Resultados y Discusión.....	66
Conclusión.....	102
Recomendaciones.....	103
Referencias Bibliográficas.....	106
Anexo A (Resultados experimentales).....	120
Anexo B (Cálculos Típicos).....	154

INDICE DE TABLAS

Pag.

Tabla 1. Usos del Ácido cítrico.....	24
Tabla 2. Comparación de características contaminantes de la vinaza diluida y concentrada al 60%.....	41
Tabla 3. Preparación de bioreactores para la obtención de ácido cítrico con vinaza como sustrato, usando <i>A. niger</i> como agente fermentativo.....	57
Tabla 4. Condiciones del sistema fermentativo (bioreactores) para la obtención de ácido cítrico, usando vinaza a diferentes diluciones y suplementada con sacarosa.....	58
Tabla 5. Microorganismos para prueba de remoción de fenoles en vinaza a 10%v/v.....	59
Tabla 6. Condiciones iniciales para el ensayo de remoción de fenoles en vinaza a 10%v/v con hongos B y C.....	61
Tabla 7. Condiciones iniciales para la remoción de fenoles en vinaza a diferentes porcentajes de dilución, empleando <i>Penicillium</i> sp.....	62
Tabla 8. Condiciones iniciales para determinar la influencia de concentración de fenoles en la biosíntesis de ácido cítrico empleando <i>A. niger</i> en vinaza a diferentes diluciones.....	64
Tabla 9. Condiciones iniciales para la estimación de la producción de ácido cítrico empleado <i>A. niger</i> , sin tratamiento biológico, con vinaza al 10% v/v.....	65
Tabla 10. Caracterización Físico-Química de la vinaza.....	66
Tabla 11. Características de los microorganismos aislados de la vinaza.....	70
Tabla 12. Crecimiento de <i>A. niger</i> en vinaza a diferentes valores de pH.....	78

Caracterización físico-química de la vinaza.

Tabla 13. Datos obtenidos para determinar la DQO de la vinaza.....	120
Tabla 14. Datos obtenidos para determinar la DBO de la vinaza.....	120
Tabla 15. Datos obtenidos para determinar la cantidad de sólidos totales en la vinaza.....	120
Tabla 16. Datos obtenidos para determinar la cantidad de Sólidos Disueltos Totales en la vinaza.....	121
Tabla 17. Datos obtenidos para determinar la cantidad de Sólidos Totales Fijos en la vinaza.....	121
Tabla 18. Datos obtenidos para determinar la cantidad de Sólidos Disueltos Fijos en la vinaza.....	121
Tabla 19. Datos obtenidos s para determinar fenoles en la vinaza.....	122
Tabla 20. Datos obtenidos para determinar la cantidad de nitrógeno en la vinaza.....	122
Tabla 21. Datos obtenidos para determinar azúcares reductores en la vinaza	
Tabla 22. Datos obtenidos para determinar Sulfatos en la vinaza.....	122
Tabla 23. Datos obtenidos para determinar Hierro total en la vinaza.....	122

Crecimiento de *Aspergillus niger* en medio selectivo con sacarosa como única fuente de carbono.

Tabla 24. Variación de la absorbancia de azúcares reductores y ácido cítrico en la fermentación con medio selectivo con sacarosa como única fuente de carbono y empleando *A. niger*.....123

Tabla 25. Variación del pH, concentración de azúcares reductores y ácido cítrico en la fermentación con medio selectivo con sacarosa como única fuente de carbono y empleando *A. niger*.....123

Tabla 26. Variación de la Biomasa en la fermentación con medio selectivo con sacarosa como única fuente de carbono y empleando *A. niger*.....124

Producción de ácido cítrico con vinaza como sustrato, con y sin adición de sales minerales y empleando *A. niger*.

Tabla 27. Variación de la absorbancia de Azúcares Reductores y Ácido Cítrico en la fermentación con vinaza como sustrato, sin adición de sales minerales y empleando *A. niger*.....124

Tabla 28. Variación de la absorbancia de Azúcares Reductores y Ácido Cítrico en la fermentación con vinaza como sustrato, con adición de sales minerales y empleando *A. niger*.....125

Tabla 29. Variación en pH, concentración de azúcares reductores, ácido cítrico y biomasa en la fermentación con vinaza como sustrato, sin adición de sales minerales y empleando *A. niger*.....125

Tabla 30. Variación en pH, concentración de azúcares reductores, ácido cítrico y biomasa en la fermentación, usando vinaza con sales minerales y empleando *A. niger*.....126

Producción de ácido cítrico con vinaza a diferentes porcentajes de dilución (%v/v), suplementada con sacarosa, sin pre-tratamiento biológico y empleando *A. niger*.

Tabla 31. Variación de la absorbancia de azúcares reductores y ácido cítrico en vinaza a diferentes porcentajes de dilución (%v/v), suplementada con sacarosa, sin pre-tratamiento biológico y empleando *A. niger*.....126

Tabla 32. Variación de pH, concentración de azúcares reductores y ácido cítrico en la fermentación con vinaza al 5%v/v, sin pre-tratamiento biológico, suplementada con sacarosa y empleando *A. niger*.....127

Tabla 33. Variación de la Biomasa en la fermentación con vinaza al 5%v/v, sin pre-tratamiento biológico, suplementada con sacarosa y empleando *A. niger*.....127

Tabla 34. Variación de pH, concentración de azúcares reductores y ácido cítrico en la fermentación con vinaza al 10%v/v, sin pre-tratamiento biológico, suplementada con sacarosa, empleando *A. niger*.....128

Tabla 35. Variación de la Biomasa en la fermentación con vinaza al 10%v/v, sin pre-tratamiento biológico, suplementada con sacarosa y empleando *A. niger*.....128

Tabla 36. Variación de pH, concentración de azúcares reductores y ácido cítrico en la fermentación con vinaza al 20%v/v, sin pre-tratamiento biológico, suplementada con sacarosa, empleando *A. niger*.....129

Tabla 37. Variación de la Biomasa en la fermentación con vinaza al 20%v/v, sin pre-tratamiento biológico, suplementada con sacarosa y empleando *A. niger*.....129

Tabla 38. Variación de la absorbancia de fenoles el pre-tratamiento de la vinaza al 10% v/v, utilizando el hongo <i>Penicillium</i> sp.....	132
Tabla 39. Variación del pH y fenoles en el pre-tratamiento con vinaza al 10% v/v, utilizando el hongo <i>Penicillium</i> sp.....	132
Tabla 40. Variación de la absorbancia de fenoles el pre-tratamiento de vinaza al 10% v/v, utilizando el Bacterias degradadoras de fenoles.....	133
Tabla 41. Variación del pH y fenoles en el pre-tratamiento con vinaza al 10%v/v, empleando bacterias.....	134
Tabla 42. Variación de la absorbancia de fenoles el pre-tratamiento de vinaza al 10% v/v, empleando el Bacterias.....	135
Tabla 43. Variación del pH y fenoles en el pre-tratamiento con vinaza al 10%v/v, empleando hongo de podredumbre blanca (Hongo B).....	135
Tabla 44. Variación del pH y fenoles en el pre-tratamiento con vinaza al 10%v/v, empleando hongo de podredumbre blanca (Hongo C).....	136
Tabla 45. Variación de la absorbancia de fenoles en el pre-tratamiento biológico a la vinaza, a diferentes porcentajes de dilución (%v/v) y empleando <i>Penicillium</i> sp.....	138
Tabla 46. Variación del pH y concentración de fenoles durante el pre-tratamiento con vinaza, a diferentes porcentajes de dilución (%v/v) y empleando <i>Penicillium</i> sp.....	138
Tabla 47. Variación de la absorbancia de DQO en el pre-tratamiento biológico a la vinaza, a diferentes concentraciones y empleando <i>Penicillium</i> sp..	139
Tabla 48. Variación de la concentración de DQO en el pre-tratamiento a la vinaza, a diferentes porcentajes de dilución (%v/v) y empleando <i>Penicillium</i> sp.....	148

Producción de ácido cítrico con vinaza a diferentes porcentajes de dilución, suplementada con sacarosa, pre-tratada biológicamente y empleando *A. niger*.

- Tabla 49.** Variación de la absorbancia para ácido cítrico y azúcares reductores, usando vinaza a diferentes porcentajes de dilución (%v/v), suplementada con sacarosa, pre-tratada biológicamente y empleando *A. niger*.....141
- Tabla 50.** Variación del pH, concentración de azúcares reductores y ácido cítrico en la fermentación con vinaza al 5%v/v, pre-tratada biológicamente y empleando *A. niger*.....142
- Tabla 51.** Variación de la Biomasa en la fermentación con vinaza al 5%v/v, pre-tratada biológicamente y empleando *A. niger*.....142
- Tabla 52.** Variación del pH, concentración de azúcares reductores y ácido cítrico en la fermentación con vinaza al 10%v/v, pre-tratada biológicamente y empleando *A. niger*.....143
- Tabla 53.** Variación de la Biomasa en la fermentación con vinaza al 10%v/v, pre-tratada biológicamente y empleando *A. niger*.....143
- Tabla 54.** Variación del pH, concentración de azúcares reductores y ácido cítrico en la fermentación con vinaza al 20%v/v, pre-tratada biológicamente y empleando *A. niger*.....144
- Tabla 55.** Variación de la Biomasa en la fermentación con vinaza al 20%v/v, pre-tratada biológicamente y empleando *A. niger*.....144
- Tabla 56.** Producción de ácido cítrico empleando *A. niger*, en vinaza a diferentes porcentajes de dilución (%v/v), suplementada con sacarosa.....146

Estimación de la producción de ácido cítrico con vinaza al 10%v/v, suplementada con sacarosa, sin pre-tratamiento biológico y empleando *A. niger*.

Tabla 57. Variación de la absorbancia de azúcares reductores y ácido cítrico durante los ensayos de fermentación con vinaza al 10%v/v, suplementada con sacarosa, sin pre-tratamiento biológico y empleando *A. niger*.....147

Tabla 58. Variación del pH, concentración de azúcares reductores y ácido cítrico producción de ácido cítrico con vinaza al 10% v/v, suplementada con sacarosa, sin pre-tratamiento biológico y empleando *A. niger*.....148

Tabla 59. Variación de la biomasa en la producción de ácido cítrico, con vinaza al 10% v/v, suplementada con sacarosa, sin pretratamiento biológico y empleando *A. niger*.....148

Datos necesarios para la determinación de parámetros físico-químicos (ácido cítrico, azúcares reductores y fenoles).

Tabla 60. Datos necesarios para realizar la curva de calibración de azúcares reductores.....150

Tabla 61. Resultados de la curva de calibración de los azúcares reductores mediante el método DNS.....151

Tabla 62. Datos para la realización de la curva de calibración de ácido cítrico.....152

Tabla 63. Resultados de la curva de calibración de ácido cítrico mediante el método Saffran-Denstedt.....152

Tabla 64. Datos necesarios para construir la curva de calibración de fenoles.....153

Tabla 65. Resultados de la curva de calibración de fenoles por el método de la p-nitroanilina.....154

INDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Cultivo de <i>Aspergillus niger</i> en Agar Saouraud. Colonias granulosas negras, planas, ilimitadas.....	22
Figura 2. Características microscópicas de <i>Aspergillus niger</i> en el medio agar Sabouraud dextrosa. Hifas tabiculares y conidioforas cuya cabeza está localizada en el extremo de una hifa.....	22
Figura 3. Estructura química del Ácido Cítrico.....	23
Figura 4. Rutas metabólicas utilizadas para la producción de ácido cítrico, glicólisis y ciclo de Krebs.....	26
Figura 5. Proceso de producción de Ácido Cítrico.....	34
Figura 6. Proceso de Separación del Ácido Cítrico.....	36
Figura 7. Proceso de Purificación del Ácido Cítrico a partir de melazas.....	37
Figura 8. Composición Química de la Vinaza según la Fuente de Obtención para Varios Autores. Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA).....	39
Figura 9. Caracterización Macro y Micro morfológica del Hongo <i>A. niger</i> sembrado en cuña con agar Sabouraud (A) y visto con el microscopio Vista 10X (B).....	71
Figura 10. Variación del pH y producción de ácido cítrico, en medio selectivo con sacarosa como única fuente de carbono, empleando <i>A. niger</i>	72
Figura 11. Variación en las concentraciones de los Azucares reductores y ácido cítrico, en medio selectivo con sacarosa como única fuente de carbono, empleando <i>A. niger</i>	73

Figura 12. Incremento de la Biomasa y producción de Ácido Cítrico, en medio selectivo con sacarosa como única fuente de carbono, empleando <i>A. niger</i>	73
Figura 13. Crecimiento de <i>A. niger</i> en Vinaza esterilizada a diferentes porcentajes de dilución (%v/v) A, B, C, D, E y F (5%, 10%, 20 %, 50%, 70% y 100% respectivamente).....	77
Figura 14. Variación de pH durante la biosíntesis de ácido cítrico, en vinaza como sustrato, empleando <i>A. niger</i>	79
Figura 15. Variación de la concentración de Azúcares Reductores en fermentación con vinaza como sustrato, empleando <i>A. niger</i>	80
Figura 16. Variación de la concentración de ácido cítrico en fermentación con vinaza como sustrato, empleando <i>A. niger</i>	80
Figura 17. Variación de la Biomasa en fermentación con vinaza como sustrato, empleando <i>A. niger</i>	81
Figura 18. Producción de ácido cítrico, empleando <i>A. niger</i> , a diferentes porcentajes de dilución (%v/v) de vinaza, suplementada con Sacarosa.....	85
Figura 19. Variación de la producción de ácido cítrico, empleando <i>A. niger</i> , a diferentes porcentajes de dilución de vinaza (%v/v) pre-tratadas con <i>Penicillium</i> sp.....	88
Figura 20. Producción de ácido cítrico, empleando <i>A. niger</i> , con vinaza a diferentes porcentajes de dilución (%v/v), suplementada con sacarosa.....	90
Figura 21. Variación del pH y ácido cítrico durante la fermentación, empleando <i>A. niger</i> , con vinaza al 10% v/v sin pre-tratamiento biológico.....	92

Figura 22. Variación de la concentración de los Azúcares Reductores y ácido cítrico durante la fermentación, empleando *A. niger*, con vinaza al 10% v/v sin pre-tratamiento biológico.....92

Figura 23. Variación de la concentración de Biomasa y ácido cítrico durante la fermentación, empleando *A. niger*, con vinaza al 10% v/v sin pre-tratamiento biológico.....93

Figura 24. Variación en la concentración del ácido cítrico por método de acidez titulable durante la fermentación, empleando *A. niger*, con vinaza al 10% v/v sin pre-tratamiento biológico.....93

Producción de ácido cítrico con vinaza a diferentes porcentajes de dilución (%v/v), suplementada con sacarosa, sin pre-tratamiento biológico y empleando *A. niger*.

Figura 25. Variación de la concentración de los Azúcares Reductores, en la fermentación con vinaza a diferentes porcentajes de dilución, suplementada con sacarosa, sin pre-tratamiento biológico y empleando *A. niger*.....130

Figura 26. Variación de la concentración del pH, en la fermentación con vinaza a diferentes porcentajes de dilución, suplementada con sacarosa, sin pre-tratamiento biológico y empleando *A. niger*.....130

Figura 27. Variación de la Biomasa en la fermentación de ácido cítrico, empleando *A. niger*, con vinaza suplementada con sacarosa, a diferentes porcentajes de dilución y sin pre-tratamiento biológico.....131

Pre-tratamiento biológico a la vinaza 10%v/v, empleando diferentes microorganismos.

- Figura 28.** (A) *Penicillium* sp., en agar-agar con vinaza al 10% v/v. (B) *Penicillium* sp., en agar Sabouraud131
- Figura 29.** Variación de la concentración de fenoles en el pre-tratamiento con vinaza al 10% v/v, empleando *Penicillium* sp.....133
- Figura 30.** Variación de la concentración de fenoles en el pre-tratamiento con vinaza al 10% v/v, empleando Bacterias.....134
- Figura 31.** Variación de la concentración de fenoles en el pre-tratamiento con vinaza al 10% v/v, empleando hongo de podredumbre blanca (hongo B).....136
- Figura 32.** Variación de la concentración de fenoles en el pre-tratamiento con vinaza al 10% v/v, empleando hongo de podredumbre blanca (hongo C).....137
- Figura 33.** Porcentaje de remoción de fenoles (%) con vinaza al 10% v/v, ejercida por *Penicillium* sp; Bacterias; Hongo B y C.....137
- Figura 34.** Porcentaje de Remoción de fenoles (%), a diferentes porcentajes de dilución de vinaza (%v/v) y empleando *Penicillium* sp.....139
- Figura 35.** Remoción de DQO (Demanda Química de Oxígeno) en el pre-tratamiento de la vinaza a diferentes porcentajes de dilución empleando *Penicillium* sp.....140

Producción de ácido cítrico con vinaza a diferentes porcentajes de dilución, suplementada con sacarosa, pre-tratada biológicamente y empleando *A. niger*.

Figura 36. Variación de la concentración de los Azúcares Reductores, en la fermentación con vinaza a diferentes porcentajes de dilución (%v/v), suplementada con sacarosa, con pre-tratamiento biológico y empleando *A. niger*.....145

Figura 37. Variación del pH, en la fermentación con vinaza a diferentes porcentajes de dilución (%v/v), suplementada con sacarosa, con pre-tratamiento biológico y empleando *A. niger*.....145

Figura 38. Variación de la Biomasa, en la fermentación con vinaza a diferentes porcentajes de dilución (%v/v), suplementada con sacarosa, sin pre-tratamiento biológico y empleando *A. niger*.....146

Datos necesarios para la determinación de parámetros físico-químicos (ácido cítrico, azúcares reductores y fenoles).

Figura 39. Curva de calibración de Azúcares Reductores mediante el método del DNS.....151

Figura 40. Curva de patrón para la determinación de ácido cítrico empleando método de Saffran-Densted.....153

Figura 41. Curva de Calibración de Fenoles por el método de la p-nitroanilina.154



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
AREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE INGENIERIA
MAESTRIA EN INGENIERIA AMBIENTAL



EVALUACIÓN DEL USO DE LA VINAZA (RESIDUO INDUSTRIAL) PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO EMPLEANDO *Aspergillus niger*.

AUTOR: Ing. Pedro Lugo
TUTOR: Msc. Luis Amaiz
20 DE MARZO DE 2017

RESUMEN

Los objetivos que persiguen las destilerías con respecto a la vinaza son: el uso o aprovechamiento del mismo, evitar su descarga en cuerpos de agua o suelos y disminuir los costos en su disposición final. En la presente investigación se evaluó el uso de la vinaza para la obtención de ácido cítrico empleando *A. niger* con la finalidad de aprovechar este residuo y así disminuir el impacto ambiental que este ocasiona. Se realizaron ensayos para: producción de ácido cítrico en medio selectivo con sacarosa como única fuente de carbono, viabilidad con vinaza a diferentes porcentajes de dilución (%v/v), crecimiento óptimo a diferentes pH en vinaza y se realizaron tres procesos de fermentación; el primero en medio selectivo con sacarosa como única fuente de carbono, el segundo con vinaza como sustrato, con y sin adición de sales minerales y el tercero, vinaza a diferentes porcentajes de dilución, suplementada con sacarosa con o sin pre-tratamiento biológico. Se determinó que en medio selectivo con sacarosa como única fuente de carbono, la producción de ácido cítrico fue de 0,682 g/L, en un tiempo de ocho días de incubación, empleando vinaza como sustrato y sin adicionar sales minerales, la producción ácido cítrico fue de 1,197 g/L a dos días de incubación. En lo que respecta a la máxima producción de ácido cítrico con vinaza: suplementada con sacarosa y sin pre-tratar biológicamente fue de: 3,987 g/L, 9,627g/L y 8,460 g/L, en un tiempo de ocho, dos y un (1) días respectivamente. Y con vinaza pre-tratada biológicamente fue de: 3,792 g/L, 5,154 g/L y 7,877 g/L, en un tiempo de tres, ocho y tres días de incubación, al 5, 10 y 20% v/v respectivamente para ambos sistemas. La condición óptima de crecimiento de *A. niger* para una producción máxima de ácido cítrico (4,57 g/L) fue: vinaza al 10%v/v, sin adición de sales, suplementada con sacarosa (150g/L) y sin pre-tratamiento biológico en un tiempo de incubación de un (1) día.

CAPITULO I EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del Problema

El alcohol está presente en las sociedades desde la antigüedad. El consumo de alcohol varía mucho de unas culturas a otras, pero en todas ellas se puede observar que su consumo depende de unas variables, entre ellas destaca el status, la edad, el género del individuo y la estructura social. Así también se intenta dejar plasmada la influencia que tiene el alcohol en la sociabilización de muchos individuos tanto para integrarse dentro de un grupo determinado como para excluirse. (Hernández, 2002).

La historia nos demuestra que el hombre, conocía que los jugos provenientes de frutas de dulces, entraban en actividad, transformándose en bebidas alcohólicas que al beberlas en exceso producían un agradable cambio espiritual. Esa transformación, producida en los líquidos azucarados por la formación de alcohol, es lo que se llama fermentación alcohólica (Garassini, 1964).

Se puede definir a la fermentación alcohólica, como un proceso biológico, en el cual un azúcar fermentescible es transformado en alcohol etílico, mediante intervención de ciertos microorganismos llamados levaduras, o productos enzimáticos elaborados por éstas. Este fenómeno es uno de los procesos biológicos más utilizados por el hombre para fines industriales y es por eso que la industria alcoholera es considerada económicamente como una de las más importantes (Garassini, 1964).

Uno de los procesos más importantes derivados de la fermentación de las levaduras es la destilería, mediante la cual el hombre obtiene diversos productos que son utilizados como bebidas o aguardientes, o para otros fines determinados, utilizando como materias primas diversas, especialmente productos vegetales azucarados en cualquiera de sus formas o empleando sustancias hidrocarbonadas de poco valor; residuos o subproductos de otras industrias. Estas sustancias hidrocarbonadas o residuales son sometidas previamente a un proceso de sacarificación económica, antes de ser utilizadas como materia prima fermentativa (Garassini, 1964).

Los azúcares fermentescibles constituyen las materias primas en estas industrias y de acuerdo al origen de las mismas se las ha clasificado en la siguiente forma: a) Productos azucarados; comprenden todas las sustancias azucaradas, especialmente jugos, como los de caña de azúcar, remolacha, jugos de frutas, melazas, etc., que contengan un elevado porcentaje de azúcar industrialmente aprovechable. B) Productos amiláceos y floculentos; así se llaman las sustancias ricas en almidones, como cereales en general (maíz, arroz, cebada, centeno) y ciertos tubérculos comestibles (papas, yuca, batata, mandioca, otros.). c) Los productos celulósicos, comprenden las pulpas vegetales, aserrín de maderas, pasta de papel, otros. Según las materias primas empleadas las destilerías pueden ser clasificadas en dos tipos: destilerías de melazas y destilerías de cereales u otras sustancias amiláceas (Garassini, 1964).

En Venezuela la producción de alcohol etílico se da exclusivamente a través del proceso de fermentación biológica de melazas provenientes de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) seguido de un proceso de destilación donde se concentra el volumen alcohólico del 8 al 96%. En este proceso productivo se generan enormes cantidades de aguas residuales de color oscuro, denominadas vinazas, que poseen una considerable cantidad de material orgánico

biodegradable, que las convierten en un efluente de alto riesgo de contaminación ambiental, si no son tratadas adecuadamente al ser descargadas al medio y que como todos los efluentes de industria alimentaria son de difícil disposición (Mohaibes y Heinonen, 2004).

Las vinazas presentan concentraciones muy elevadas de: sólidos, sustancias orgánicas, demanda biológica de oxígeno ($DBO_{5\text{días},20^{\circ}\text{C}}$) (6-25) g/L- O_2 , demanda química de oxígeno (DQO) (15-65)g/L $-O_2$ y alta acidez (pH). El gran poder de contaminación de las vinazas se ve favorecido por sustancias como: fitotóxicos, antibacteriales y compuestos recalcitrantes como son fenoles, polifenoles y metales pesados, los cuales tienen efectos negativos en microorganismos y plantas. Los compuestos altamente colorados también se encuentran en la vinaza. Esta característica conduce a reducir la penetración de la luz del sol en los ríos y lagos, reduciendo así la actividad fotosintética y las concentraciones de oxígeno disuelto, causando condiciones peligrosas para la vida acuática. (Prasad y Shih, 2016).

La vinaza es un residuo líquido que impacta negativamente, especialmente, al recurso hídrico, ya que, por ejemplo, al tener una alta $DBO_{5,20^{\circ}\text{C}}$ los microorganismos encargados de degradar la materia orgánica presente en la vinaza pueden llegar a agotar el oxígeno disuelto en los cuerpos de agua, provocando la muerte de la fauna acuática. Las condiciones anaeróbicas (sin oxígeno) potencian la emisión de gases entre ellos: sulfuro de hidrogeno (H_2S) que al entrar en contacto con el agua de lluvia produce la lluvia acida, alterando el pH tanto del suelo como del agua. Adicionalmente, emisiones de otros gases como Metano (CH_4), altamente inflamable y es uno de los precursores del efecto invernadero y el cambio climático a nivel mundial.

Además de poseer altas concentraciones de nutrientes como el fosforo y nitrógeno, la vinaza puede favorecer el crecimiento desmedido de algunas plantas

acuáticas de libre flotación como por ejemplo la lemna, las cuales pueden bloquear los rayos del sol para otras plantas acuáticas como algas, que sirven de alimento a animales acuáticos, y son uno de los proveedores de oxígeno al agua, además una abundante población de plantas también agota el oxígeno disuelto en el agua debido a su alto y rápido crecimiento (eutrofización), produciendo la muerte de peces. Estas plantas acuáticas al morir se depositan en el fondo del cuerpo de agua incrementando la DQO y $DBO_{5\text{días},20^{\circ}\text{C}}$ y creando depósitos de materiales los cuales producen gases y condiciones anaeróbicas.

Otras de las razones que afecta negativamente al ambiente es el pH característicos de la vinaza, ya que, generalmente es ácido (aproximadamente 4), por lo tanto es muy corrosivo, pH en el cual se ve favorecida el aumento en la concentración de CO_2 en los cuerpos de agua, impactando negativamente en los lagos, ríos o mares. La alcalinidad o el equilibrio CO_2 -agua es muy importante porque mantiene los niveles óptimos de pH de los cuerpos de agua para el crecimiento y mantenimiento óptimo de toda la vida marina, es decir, un pH de 6 - 8. El CO_2 al entrar en contacto con el agua, genera ácido carbónico (de pH 4 a 6 aproximadamente) y si aumenta el pH se ve favorecida la formación de bicarbonatos (de pH 6 a 8,5) y carbonatos (a partir de pH 9) que ayudan a mantener los niveles de pH, debido a ésta situación, el agua es mucho más resistente a los cambios de pH, sin embargo, si el pH sigue aumentando, el pH el agua se tornaría básico lo cual también es nocivo para la vida acuática. Si el agua entra en contacto con la vinaza, teniendo un pH de 4,5, solo algunos peces muy especializados sobrevivirían pero debido a que la vinaza posee una alta $DBO_{5,20^{\circ}\text{C}}$ consecuentemente, el oxígeno disuelto en el agua pronto desaparecería y ellos (peces) también morirían. Por lo que una alteración en la capacidad amortiguadora de pH en un cuerpo de agua, provoca un efecto no deseable sobre la biota y ambientes cercanos al sitio de la descarga o en lugares alejados donde el agua tiene acceso.

El problema se ve multiplicado debido al volumen tan elevado de vinazas producidas en la elaboración del alcohol ya que por cada litro de alcohol se obtienen 12 litros de vinazas como residuo; tenemos así que en una industria, en la cual se elaboran aproximadamente 11.500 litros de ron por día, daría al año, una producción de aproximadamente 50.370.000 de litros de vinaza. Por éste gran volumen, dichos residuos industriales se tornan una molestia además, de ser altamente costosos en su manejo y tratamiento tradicionales, así como su disposición final.

Por tratarse de un subproducto de la obtención de Etanol, la Vinaza se trata como residuo líquido industrial, de ahí que algunos de sus usos tienen su origen como alternativas de disposición final más que como alternativas de aprovechamiento. Con el paso de los años y debido a las grandes cantidades generadas de este material, se empezó a investigar en distintas empresas, nuevas aplicaciones en pro del aprovechamiento de sus propiedades fisicoquímicas y otras iniciaron trabajos, en su mayoría, dirigidos a explorar su uso como fertilizante (García y Rojas, 2005).

Porque su origen es vegetal, entre ellos, la caña de azúcar, la vinaza está compuesta por materiales orgánicos y nutrientes minerales que hacen parte de compuestos y constituyentes bioquímicos como aminoácidos, proteínas, lípidos, ácidos diversos, enzimas, bases, ácidos nucleicos, clorofila, lignina, quinonas, ceras, azúcares y hormonas. La naturaleza en forma normal descompone estos materiales mediante procesos microbiológicos y recicla los elementos minerales, lo que hace lógico pensar que el destino final de la vinaza deba ser su regreso al suelo (García y Rojas, 2005).

Sin embargo, se ha señalado la necesidad de pre-tratamientos adecuados antes de aprovechar los elementos nutritivos que este tipo de material contiene (Amir y col, 2005). Al respecto, Pande y Sinha (1997) recomiendan diferentes formas de emplear la vinaza como enmienda orgánica para complementar la fertilización del suelo: i) En compost con bagazo, cascarilla de arroz y cachaza; ii) Convertida en humus; iii) mezclada con cal a valores de pH entre 10,5 y 12,5 con adición de cachaza carbonatada y/o ácido fosfórico para precipitar los sólidos que pueden usarse como fertilizante, mientras que la fase clarificada sería usada como riego; iv) mezclada con residuos vegetales de alto contenido en celulosa (ej. bagazo) y por último v) tratada en lagunas, para su posterior aplicación al suelo como agua de riego. Ahora bien, investigaciones realizadas (Brignoli, 1993) en Italia señalan que es posible tratar biotecnológicamente los residuos industriales, entre ellos la vinaza, para lo cual se plantea el uso de complejos enzimáticos que permiten convertir efluentes orgánicos industriales en abonos orgánicos susceptibles de ser conservados por largos periodos de tiempo sin que se alteren sus características y su poder fertilizante. En estudios realizados indican que la adición de multienzimas, para el compostaje de materiales orgánicos provenientes de la agroindustria de la caña de azúcar, mejora la solubilidad de fósforo, calcio y magnesio, y provoca un incremento del nitrógeno total del compost sólido obtenido, a la cachaza y el bagazo (Pimentel y Rivero, 2011).

Debido a su alto contenido en materia orgánica y nutrientes como: Nitrógeno, Fósforo, Calcio, Magnesio, Zinc, Hierro, etc., una de las posibles alternativas de uso de la vinaza para contrarrestar su efecto negativo al ambiente, es la utilización de ésta como sustrato o medio de cultivo para microorganismos y así obtener sustancias aprovechables para otro tipo de industrias. Existen muchos estudios sobre la obtención de moléculas de alto valor agregado como ácidos orgánicos (láctico, cítrico, succínico, oxálico, entre otros) importantes en síntesis químicas orgánicas, mediante fermentaciones sumergidas con diferentes microorganismos, las cuales utilizan hidratos de carbono que luego son convertidos a azúcares

fermentables para obtener así su fuente de energía y la producción de nuevas moléculas de interés.

El ácido cítrico es un producto con una demanda mundial creciente, debido a sus aplicaciones en la industria de alimentos (bebidas, embutidos), farmacéutica, cosmética, plástico y detergente; por este motivo se ha estudiado su producción a partir de diferentes sustratos como la melaza de caña, melaza de remolacha, desechos de cervecería, almidón, desechos de piñas, entre otros.

El ácido cítrico natural fue obtenido en forma cristalizada, concentrando el jugo de limones, a fines del siglo XVIII por Scheele, pero posteriormente se comprobó que muchas otras frutas lo contienen, especialmente las cítricas (Garassini, 1964).

El ácido cítrico se fabrica en más de 20 países en el mundo. La Unión Europea, Estados Unidos y China reúnen el 88% del total de producción mundial. Las primeras firmas productoras a nivel mundial son Bayer y ADM, cada una con el 17% del mercado, aproximadamente. Seguidas por Jungunzlauter, Cargill y Citrique Belge (Eliozondo y Manzanares, 2009).

Entre los microorganismos capaces de producir y acumular ácido cítrico se encuentran las especies de los géneros *Aspergillus*, *Citromyces*, *Penicillium*, *Monilia*, *Candida* y *Pichia*. Las especies de *Aspergillus* negros y especialmente *Aspergillus niger*, son las más empleadas en este tipo de producción (López y col., 2006).

El estudio de nuevos métodos y el aislamiento de especies de *Aspergillus* con altos rendimientos en producción de ácido cítrico, permitió, pocos años después, desplazar casi completamente la vieja industria de obtención del ácido a partir de

los jugos de limones, que por muchos años dio vida industrial a muchas regiones cítricas europeas, especialmente de Italia (Garassini, 1964).

La producción de ácido cítrico por fermentación de sustratos carbohidráticos por *Aspergillus niger*, es una de las fermentaciones más antiguas, pero no por ello la mejor conocida. Tradicionalmente, la producción de ácido cítrico por fermentación se ha realizado en cultivo superficial, aunque en los últimos años se tiende a la producción en cultivo sumergido, ante las ventajas, sobre todo de índole económica, que tiene este procedimiento (Gómez y col., 1988).

Debido a que la obtención de ácido cítrico tradicionalmente se ha realizado bajo fermentaciones con sustratos provenientes de la industria alimentaria (melaza de caña, melaza de remolacha, frutas, entre otros.) sería conveniente estudiar o evaluar la obtención de éste importante ácido orgánico para la industria en general, por vías alternativas amigables y sustentables para el ambiente. La vinaza puede ser un sustituto de materias primas tradicionales en la fermentación de azúcares por parte de microorganismos (*Aspergillus*, *Citromyces*, *Penicillium*, *Monilia*, *Candida* y *Pichia*), para la obtención de ácido cítrico, debido a que, la vinaza contiene sustratos que pueden utilizarse como fuente de carbono y energía y así, excretar ácido cítrico.

1.2 Formulación del Problema

Actualmente los procesos biotecnológicos han incorporado, como una alternativa de búsqueda de solución, el uso de fermentaciones utilizando microorganismos aislados del ambiente para resolver de manera rápida, fácil y

confiable los problemas de contaminación ambiental y la obtención de compuestos para el beneficio económico. El objetivo planteado de la destilería es satisfacer las necesidades de tratamiento de la vinaza para la reducción de contaminación ambiental.

Las industrias alcohólicas invierten en la construcción de grandes áreas para la contención y disposición de la vinaza, lo cual genera un costo extra y solo se utiliza como riego en plantaciones debido al alto contenido de nutrientes que posee y no se le da otra alternativa de uso a dicho residuo durante el proceso de producción de alcoholes. Por lo cual se generan algunas interrogantes para el aprovechamiento de la vinaza para la producción de ácido cítrico y tratamiento de éste residuo peligroso, como: ¿Cuáles son las características fisicoquímicas y microbiológicas de la vinaza de la destilería?, ¿Cuál sería el comportamiento del hongo *Aspergillus niger* usando vinaza como sustrato?, ¿Cuáles serían las condiciones óptimas de producción de ácido cítrico utilizando vinaza y el hongo *Aspergillus niger*?, ¿Cuándo se alcanzaría la máxima producción del ácido cítrico utilizando el sistema vinaza/*Aspergillus niger*?

1.2 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Evaluar el uso de un residuo industrial (Vinaza) para la obtención de ácido cítrico empleando *Aspergillus niger*.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Describir físico-química y microbiológicamente el residuo industrial (vinaza).
2. Especificar las condiciones óptimas de crecimiento del hongo *Aspergillus niger* para la obtención del ácido cítrico empleando vinaza como sustrato.
3. Estimar la producción de ácido cítrico una vez obtenido las condiciones óptimas para el crecimiento del *hongo Aspergillus niger*.

1.4 Justificación

La obtención de ácido cítrico a partir de residuos de la destilería, es de suma importancia, ya que permite la utilización de una sustancia altamente contaminante como es la vinaza como una alternativa a la sustitución de melazas u otras materias primas tradicionales para su producción a gran escala. Además de presentarse como una alternativa económica para el país en la reducción de importación de ácido cítrico.

En cuanto a los beneficios, este proyecto reducirá los niveles de contaminación de los cuerpos de agua receptores, reducción de malos olores, reducción de generación de insectos y vectores productores de enfermedades, minimización de costos de disposición final de la vinaza, nueva temática de investigación en lo que respecta a fermentaciones sumergidas utilizando sustrato vinaza y la posible obtención de otros ácidos orgánicos, alcoholes o biocombustibles de importancia en la industria químicas.

Por otra parte al ser aplicado abriría una nueva oportunidad de negocio a la empresa, debido a que es un proceso que podría ser implementado para la obtención de un compuesto tan importante en la industria alimentaria como es el ácido cítrico, ya que, el aumento y expansión de la demanda mundial de ácido cítrico se debe, fundamentalmente, a su utilización como aditivo en la industria de alimentos y bebidas y el consumo de éste en el mundo crece a razón de 5-8% anual y la tendencia parece mantenerse estable.

En el ámbito personal este trabajo de grado permitirá adquirir nuevas herramientas de tipo biotecnológico en el ámbito de manejo y tratamiento de desechos líquidos, además de ampliar los conocimientos en el área de análisis de laboratorio e implementar los conocimientos adquiridos a lo largo de la carrera, logrando de esta forma afianzar y completar la formación académica.

1.5 Limitaciones

La realización de éste proyecto se ejecutará en el Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas Aplicadas (CIMA-UC) de la Universidad de Carabobo y presenta las siguientes limitaciones: la caracterización fisicoquímica de la vinaza (residuo industrial) se realizará por métodos colorimétricos y gravimétricos según sea el parámetro a determinar, además que solo se tomarán los más comunes, debido a la no disponibilidad que tiene el laboratorio de realizar determinaciones de algunos parámetros fisicoquímicos, como por ejemplo metales pesados, con equipos más sensibles y específicos. Por lo que algunos componentes desconocidos que se encuentran en la vinaza podrían afectar negativamente las experiencias a realizar.

La caracterización microbiológica solo tomará en cuenta la identificación de microorganismos hasta género, a través de métodos de criterios morfológicos, tinciones diferenciales y pruebas bioquímicas.

Para el proceso de producción de ácido cítrico, utilizando la vinaza como medio fermentativo, el pre-tratamiento que se aplicará a la misma será por vías biológicas, no tomará en cuenta tratamientos físico-químicos, debido a los altos costos en reactivos y equipos especiales. En la siguiente etapa, para la producción y optimización, solo tomará las fases de pre-tratamiento del residuo y fermentación, así como también no tomará en cuenta el efecto de: metales pesados, nutrientes u otras sustancias que puedan presentar el residuo y que puedan alterar la fermentación y solo se tomará en cuenta el efecto de diferentes porcentajes de concentración de vinaza para una buena producción de ácido cítrico y el buen desenvolvimiento del hongo en el medio.

En la fase de fermentación se tomará en cuenta la posibilidad de enriquecer el residuo con otra sustancia para aumentar la producción de ácido cítrico, además la medición de éste parámetro, se realizará por métodos colorimétricos y en forma acuosa, es decir, todavía disuelto en el medio fermentativo y sin purificar. Otra de las limitaciones sería el costo de los reactivos y la disponibilidad de los mismos para realizar las actividades en el laboratorio.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTOS TEORICOS

2.1 Antecedentes de la Investigación

1. Auta H., Abidoye K., Tahir H., Ibrahim A. y Aransiola S.(2014). ***Producción de ácido cítrico por Aspergillus niger Cultivado en Pulpa de Frutas de Parkia biglobosa.*** Departamento de Microbiología. Universidad Federal de Tecnología, Minna, Nigeria.

El estudio se realizó para investigar el potencial de la pulpa de fruta de *Parkia biglobosa* como sustrato para la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. El azúcar reductor se estimó con el método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) y el ácido cítrico se estimó usando el método de anhídrido acético-piridina. El estudio ha revelado que el *Aspergillus niger* puede producir ácido cítrico cuando se cultivan en pulpa de fruta de *Parkia biglobosa* y que el uso de éste, podría representar un método eficiente de la reducción de costes en la producción de ácido orgánico de valiosa importancia.

En lo concerniente al presente proyecto, se tiene la propuesta de una alternativa de sustitución de sustratos tradicionales para la fermentación del *Aspergillus niger* y la obtención de ácido cítrico. La diferencia de mayor relevancia, es que se utiliza *Parkia biglobosa*, la cual es un cultivo forestal leguminoso y no utiliza desechos industriales para la obtención del ácido cítrico.

2. Oliveira A., Matos V. y Bastos R. (2012). “**Cultivo de *Aspergillus niger* en bagazo de caña de azúcar con vinaza**”. Centro de Ciencias Agrícolas. Universidad Federal São Carlos. Brasil.

El cultivo de estado sólido implica el crecimiento de microorganismos en ausencia o casi ausencia de agua libre, que emplea un soporte natural o inerte. Los experimentos se establecieron en reactores de columna de lechos con bagazo de caña de azúcar, impregnando una suspensión de *Aspergillus niger* y vinaza con 80% de humedad, 25 ° C, aireación flujo de tasa de 0,4 L / min de aire, durante 6 días saturado de agua. Los resultados sugieren la eficacia del cultivo en estado sólido en esta situación, con 1,45 g de ácido total por g de bagazo seco por día. El objetivo es una alternativa para corregir los principales residuos de procesamiento de la caña de azúcar.

En el antecedente expuesto, se puede apreciar el aprovechamiento de los residuos de la industria alcoholera (vinaza), junto con el bagazo de caña para el crecimiento de *Aspergillus niger* y la obtención de ácido cítrico.

3. Pimentel H., Rivero C., (2011). **Parámetros de calidad de un material orgánico obtenido a partir de vinaza con el uso de un activador multienzimático**. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Venezuela.

En este trabajo se evaluó la estabilización y biotransformación de la materia orgánica contenida en la vinaza. Se realizó un ensayo, en una planta piloto, con aplicación de un complejo multienzimático. se efectuó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos 3 x 2,

cuyos factores en estudio fueron: tres dosis de multienzima (0, 110 y 147 g por cada 150 L de vinaza contenidos en cada unidad experimental) y dos condiciones de pH (4,2 y 5,0). Se extrajo la materia orgánica y se evaluaron las siguientes variables: Relación carbono/nitrógeno (C/N), Contenido de ácidos húmicos y fúlvicos, Índice de humificación (IH), Grado de Humificación (GH). Los resultados mostraron una disminución de la relación C/N y un efecto positivo sobre la formación de las sustancias húmicas. Para el IH el valor más bajo (0,78) fue alcanzado en el tratamiento T3, lo que sugiere la mayor estabilización del material.

Como semejanza respecto al presente proyecto, se tiene el aprovechamiento de un residuo industrial (vinaza), para la obtención de un producto, que en éste caso, es abono orgánico, mediante la utilización de enzimas para su degradación. La diferencia de mayor relevancia, es que solo es para lograr la estabilización y biotransformación de la materia orgánica contenida en la vinaza, es decir, no utiliza un microorganismo específico para la obtención de abono orgánico, ni de ácido cítrico.

2.2 Bases Teóricas

2.1 Biotecnología

La biotecnología es la disciplina que se refiere al uso de los organismos vivos o de sus productos en procesos industriales a gran escala. En ese aspecto se refiere a los procesos en los que intervienen microorganismos, la cual ha sido innovado en años recientes debido a la adición de técnicas de ingeniería genética que ha permitido desarrollar procesos microbianos para la producción de numerosos metabolitos o productos farmacéuticos como enzimas, antibióticos, vitaminas, y otros (Eliozondo y Manzanares, 2009).

Las aplicaciones en microbiología medioambiental incluyen:

- Tratamiento de aguas residuales industriales y municipales.
- Mejora de la calidad del agua potable.
- Recuperación de zonas industriales, comerciales, residenciales y oficiales contaminadas con productos químicos peligrosos.
- Protección y recuperación de ríos, lagos, estuarios y aguas costeras de contaminantes medioambientales.
- Prevención de la propagación a través del agua o el aire de organismos patógenos entre los seres humanos y otras especies.
- Producción de sustancias químicas benignas para el medio ambiente
- Reducción de residuos industriales con objeto de disminuir el consumo de recursos y la producción de contaminantes que requieren su eliminación.

La Biotecnología se puede dividir en dos fases:

- Tecnología microbiana tradicional: la cual parte con los primeros desarrollos tecnológicos como la destilación alcohólica, la preparación y conservación de alimentos y bebidas por fermentación (pan, queso, cerveza, vino, y vinagre) hasta la obtención biotecnológica de antibióticos y metabolitos. Implica la fabricación a gran escala de productos que los microorganismos son capaces de producir, para la cual se modifica el organismo o proceso para obtener el rendimiento más alto del producto.
- Tecnología microbiana con organismos alterados por ingeniería: Esta innovada tecnología trabaja en estrecha asociación con la ingeniería genética modificando microorganismos en los que son insertados genes extraños. Para desarrollar un organismo adecuado para producir un producto nuevo o una sustancia que normalmente no genera y que puede ser cultivado a gran escala, necesaria para su explotación comercial. (Eliozondo y Manzanares, 2009)

2.2 Hongos

Los hongos, junto con las bacterias y las *Archea*, son los principales agentes descomponedores o degradadores en el mundo. Los agentes de descomposición son los responsables de la oxidación de materia orgánica muerta, que devuelve al medio ambiente los elementos inorgánicos que serán reciclados de nuevo por otras formas vivientes. Los hongos no tienen el amplio rango de características metabólicas de las bacterias (Rittmann y McCarty, 2001).

2.3 Morfología de los Hongos

Las características morfológicas identifican a más de 50.000 especies diferentes de hongos, entre las que se incluyen grupos con nombres comunes como mohos, levaduras, añublos, royas, tizones, bejines y setas. Las células de los hongos son eucariotas y esa es la característica que más los distingue de bacterias heterotróficas.

Excepto en algunas formas unicelulares, tales como las levaduras, los hongos se componen de masas de filamentos. Un filamento único se denomina Hifa y todas las hifas juntas de un hongo se conocen como micelio. El micelio tiene, generalmente una anchura de 5 a 10 μm , puede estar ramificado y se encuentra tanto en la superficie como oculto debajo de la superficie nutriente o del suelo donde crece. Sus paredes celulares están generalmente compuestas de quitina, que no se encuentra ni en bacterias ni en plantas mayores, pero que se encuentra en la cubierta exterior de insectos (Rittmann y McCarty, 2001).

2.4 Clasificación de los Hongos

Los hongos se clasifican algunas veces en tres grupos principales. La primera clase, que se dice son los verdaderos hongos, *Eumycota*, la segunda clase es la de los mohos delgados o *Mycophycomycota*, que tienen una etapa de mortalidad como las amebas y otra de producción de esporas similar a la de los hongos. La tercera clase es *Myxophycomycota*, que es la de los líquenes a base de hongos que crecen junto con las algas (Rittmann y McCarty, 2001).

2.5 Los Hongos Filamentosos

Los Mohos son hongos filamentosos. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se ven frecuentemente sobre pan viejo, queso y frutas. Cada filamento crece fundamentalmente en el extremo por un mecanismo de extensión celular. Cada filamento se denomina hifa. Las hifas crecen en masa en lo que se denomina micelio, que puede verse fácilmente sin la ayuda del microscopio (Madigan, y col, 2003).

A partir del micelio, otras hifas buscan superficie donde forma esporas o conidios. Los conidios son esporas asexuales (su formación no implica la fusión de gametos), a menudo muy pigmentadas y resistentes a la desecación, que sirven como forma de dispersión del hongo en nuevos hábitat. Cuando se forman conidios, cambia el color blanco del micelio adquiriendo el de éstos que puede ser negro, rojo, azul-verdoso, amarillo o marrón. La presencia de esas esporas da a la masa micelial la apariencia de ser una capa de polvo (Madigan, y col, 2003).

Algunos mohos también producen esporas sexuales, formadas como resultado de una reproducción sexual. Esta se produce por fusión de gametos

unicelulares o bien hifas especializadas llamadas gametangios. Alternativamente, las esporas sexuales se pueden originar de la fusión de dos células haploides que sufren meiosis y mitosis para dar esporas individuales. Dependiendo a que grupo pertenezca el hongo en cuestión se pueden formar diversos tipos de esporas sexuales. Cuando se forman dentro de un saco o asca se denominan ascosporas y se forman en los extremos de estructuras en forma de porra se denominan basidiosporas (Madigan y col, 2003).

2.6 Requerimientos de Alimentación y Medio Ambiente de los Hongos

Todos los hongos descomponen materia orgánica para obtener energía. La mayoría pueden vivir en azúcares simples como la glucosa y, como grupo, tienen la capacidad de descomponer una gran variedad de materias orgánicas. Algunos satisfacen los requerimientos de nitrógeno, a partir de fuentes inorgánicas, como amonio y nitrato; algunos necesitan satisfacer sus necesidades de nitrógeno a partir de fuentes orgánicas, lo que también resulta válido para casi todos los demás. Dado que los hongos contienen menos nitrógeno que las bacterias, sus requerimientos de éste elemento son menores (Rittmann y McCarty, 2001).

En general, todos los mohos son aerobios y requieren para sobrevivir de un suministro suficiente de oxígeno. Las levaduras, por otra parte, son en su mayor parte facultativas. En ausencia de oxígeno obtienen energía por fermentación, como en la conversión de azúcar a alcohol. Los hongos crecen, generalmente más lentos que las bacterias, pero pueden tolerar, corrientemente mejor, condiciones ambientales extremas. Pueden vivir en climas relativamente secos, ya que pueden obtener agua del aire, lo mismo que desde el medio en el que crecen. Los mohos pueden sobrevivir en climas secos que resultan inhibitorios para bacterias

vegetativas. En condiciones extremadamente secas, los hongos pueden producir esporas protectoras (Rittmann y McCarty, 2001).

Los mohos pueden crecer en azúcares concentrados con alta presión osmótica y pueden vivir en condiciones de acidez relativa, que resultaría perniciosa para la mayoría de las bacterias. El pH óptimo para el crecimiento es, generalmente de 5,5 pero un intervalo de 2 a 9 puede ser, a menudo, tolerado. La temperatura óptima para el crecimiento de la mayoría de hongos se encuentra en el intervalo mesófilo de (22-30)°C, aunque algunas pueden provocar daños a alimentos en condiciones de refrigeración próximas a 0ª y otras pueden vivir en condiciones termofilicas con temperaturas tan altas como 60°C. (Rittmann y McCarty, 2001)

2.7 *Aspergillus Niger*

Muchos organismos pueden producir ácido cítrico, sin embargo, *A. niger*, es el principal microorganismo utilizado en la producción industrial (Soccol y col., 2006; Papagianni, 2007; Rywinska y col., 2010). Dentro del género *Aspergillus* se agrupan hongos filamentosos que han sido reclasificados y actualmente pertenecen al grupo de los *Ascomycetos* (Lutzoni y col, 2004). Su reproducción es asexual exclusivamente por conidios o pueden presentar fragmentación del micelio, forman conidios expuestas sobre la superficie del micelio, normalmente agrupados sobre una cabezuela.

Para poder realizar una descripción de las colonias de *A. niger*, múltiples autores coinciden en que la composición del sustrato, la temperatura de incubación, las condiciones de iluminación, y la edad del cultivo deben ser especificadas. En medio CYA, Czapeck Yeast Extract, las colonias del género

Aspergillus tienen textura que va desde suave hasta polvorosa. El color de la superficie de la colonia depende de la especie; en *A. niger*, es de color negro y el reverso entre blanco y amarillo (Raper y Fennel, 1965).

Las características macroscópicas que normalmente se especifican al hacer un proceso de identificación son las siguientes:

- El color de las partes aéreas incluyendo el micelio vegetativo, cabezas conidiales.
- La pigmentación del medio basal así como del sustrato permiten realizar confirmaciones.
- La tasa del crecimiento colonial y el diámetro alcanzado en un tiempo particular y en un medio específico es característico de una especie.
- El borde de la colonia puede ser grueso y afilado, delgado y difuso, liso y entero o irregular, sumergido o aéreo (Raper y Fennel , 1965).

La identificación microscópica del género *Aspergillus* está basada en características similares existentes en todas las especies y en características específicas presentes en ciertas especies. Entre las comunes a todas las especies se encuentran:

- Las especies del género *Aspergillus* están conformadas por hifas hialinas septadas.
- *A. niger* en particular presenta conidióforos largos, lisos, incoloros o de color café, con fialides bi-seriadas y conidios redondos. La cabeza conidial, su color, forma, tamaño y organización de las partes de la cabeza conidial es característico de cada especie. Las cabezas de *A. niger* son más largas, radiadas y negras, amarillas–cafes.



Figura 1. Cultivo de *Aspergillus niger* en Agar Saouraud. Colonias granuladas negras, planas, ilimitadas.

Fuente: Tangarife. V. Universidad de Antioquia (2011). Disponible en: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/lms/moodle/mod/page/view.php?id=100812>



Figura 2. Características microscópicas de *Aspergillus niger* en el medio agar Sabouraud dextrosa. Hifas tabiculares y conidioforas cuya cabeza está localizada en el extremo de una hifa.

Fuente: (Eliozondo y Manzanares, 2009).

2.8 Ácido Cítrico

El ácido cítrico es un ácido orgánico tricarboxílico que está presente en la mayoría de las frutas, sobre todo en los limones y naranjas. Su fórmula química es $C_6H_8O_7$ y su peso molecular 192.12 g / mol. Es un sólido cristalino blanco que funde a 153 °C.

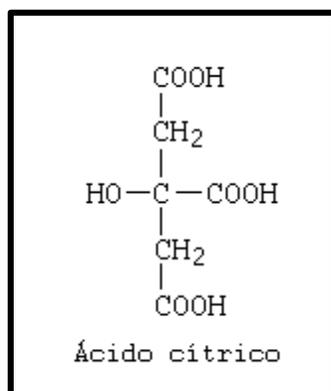


Figura 3. Estructura química del Ácido Cítrico.
Fuente: (Stryer, L. 1985).

La acidez del ácido cítrico es debida a los tres grupos carboxilos -COOH que pueden perder un protón en las soluciones. Si sucede esto, se produce un ion citrato. Los citratos son unos buenos controladores del pH de soluciones ácidas. Los iones citrato forman sales llamadas citratos con muchos iones metálicos. El ácido cítrico puede existir en una forma anhidra (sin agua), o como monohidrato que contenga una molécula de agua por cada molécula de ácido cítrico. La forma anhidra se cristaliza en el agua caliente, mientras que la forma monohidrato se cristaliza en agua fría. El monohidrato se puede convertir a la forma anhidra calentándolo sobre 74 °C.

Químicamente, el ácido cítrico comparte las características similares de otros ácidos carboxílicos. Se descompone a 175°C, produciendo dióxido de carbono y agua. (Elizondo y Manzanares., 2009).

Tabla 1. Usos del Ácido cítrico

Sector	Uso
Bebidas	Saborizante y regulador de pH; incrementa la efectividad de los conservantes microbianos
Dulces, conservas y caramelos	Acidulante y regulador de pH para lograr óptima gelificación.
Lácteos	Estabilizante en cremas batidas.
Verduras procesadas	En combinación con ácido ascórbico, previene la oxidación.
Alimentos congelados	Antioxidantes e inhibe el deterioro del sabor y el color.
Frutas y hortalizas enlatadas	Disminuye el pH, al actuar como quelante; previene la oxidación enzimática y la degradación del color, resalta el sabor.
Aceites y grasas	Previene la oxidación.
Carnes	Auxiliar del procesado y modificador de textura
Bebidas	Saborizante y regulador de pH; incrementa la efectividad de los conservantes microbianos.
Quesos pasteurizados y procesados	Se adiciona en forma de sal, como emulsificante y texturizante
Pescado y productos del mar	Regulador de pH en presencia de otros conservantes o antioxidantes

Fuente: Pedro Lugo. (2015)

2.9 Biosíntesis Del Ácido Cítrico

Las rutas metabólicas utilizadas por *A. niger* para la producción de ácido cítrico a partir de sacarosa son la Glicólisis o vía Embden Meyerhof Parnas y el Ciclo de Ácidos Tricarboxílicos o Ciclo de Krebs. La sacarosa, es inicialmente hidrolizada por un invertasa extracelular activa a bajo pH generando una molécula de glucosa y una de fructosa las cuales son asimiladas por el microorganismo (Boddy y col., 1993) (Rubio y Maldonado, 1995). La glicólisis, vía degradativa que se lleva a cabo en el citosol celular, consiste en la degradación de la glucosa o

glucosa 1-fosfato en ácido pirúvico. Transformación que se da en dos etapas: en la primera, la molécula de glucosa de seis carbonos, se transforma en dos moléculas de tres carbonos; en la segunda, las moléculas de tres carbonos se transforman en ácido pirúvico, ATP y NADH. El balance energético neto de la glicólisis es la producción de 2ATP por cada mol de glucosa (4ATP producidos y 2 ATP consumidos) (Stryer L, 1995; Alvares y col, 2000 y Peksell y col., 2002).

En presencia de oxígeno, el ácido pirúvico proveniente de la glicólisis se oxida totalmente en la matriz mitocondrial hasta liberar CO_2 a través del ciclo de Krebs. Como oxidantes actúan coenzimas que a su vez son reducidas. El hidrógeno unido a las coenzimas, es transferido en la segunda fase al oxígeno molecular, con formación de agua. El ciclo es la vía final para la oxidación de moléculas combustibles como los azúcares y suministra intermediarios diferentes para la biosíntesis (Crueger y Crueger, 1989). El balance energético neto del ciclo de Krebs y la glicólisis es la formación de 38ATP (2ATP producidos en glicólisis y 36 ATP producidos en ciclo de Krebs) como se ve en la Figura 4 (Stryer L, 1995).

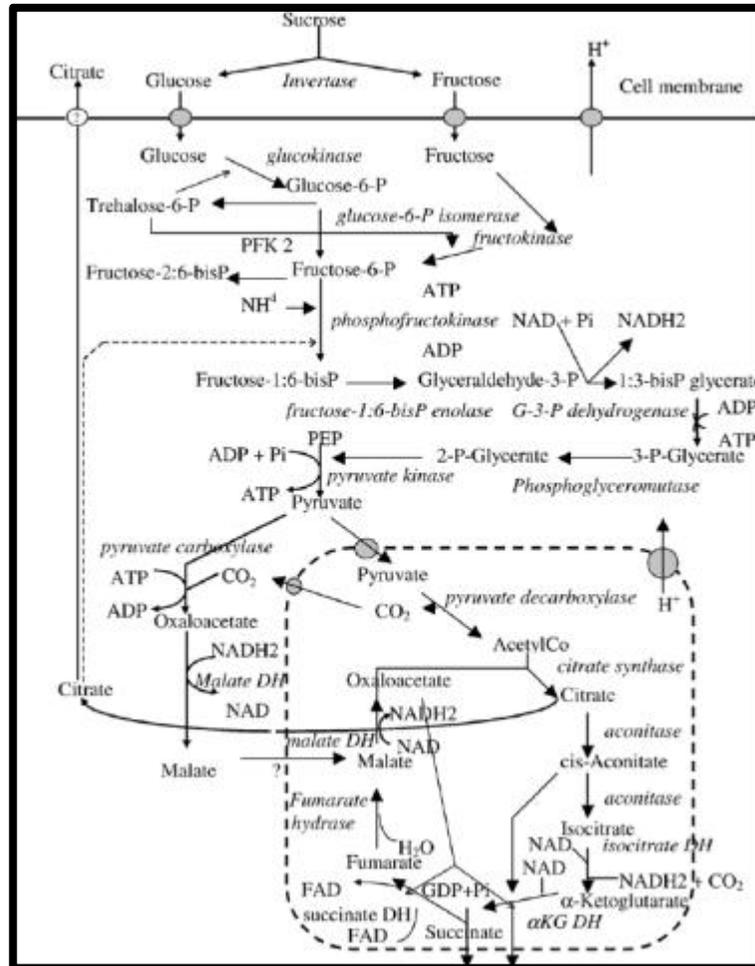


Figura 4. Rutas metabólicas utilizadas para la producción de ácido cítrico, glicólisis y ciclo de Krebs.

Fuente: (Papagianni, M. 2007).

Como se puede observar, la producción de ácido cítrico ocurre en las primeras etapas del ciclo de Krebs. Aunque numerosos trabajos han registrado como etapa determinante para su acumulación, la inhibición de las enzimas que permiten su degradación (aconitasa o isocitrato deshidrogenada) (Kubicek y Rohr, 1989), existen sólidas evidencias de la realización del ciclo total durante el proceso de fermentación. Ahmed y col., 1972, demostraron la presencia de un set completo de enzimas requeridas para el ciclo; adicionalmente, Jernejc y col, 1992, demostraron un incremento en el nivel de proteína celular; ambas observaciones

sugieren que el ciclo se encuentra activo durante el proceso de producción de ácido cítrico.

Una hipótesis para la acumulación de ácido cítrico, está asociada con la actividad de un transportador, con alta afinidad por citrato, que compite con la enzima acotinasasa. El transportador, bombea el citrato por fuera de la mitocondria sin la necesidad de inhibir ninguna enzima del ciclo de Krebs, en los mamíferos se sabe que este transportador está igualmente asociado al transporte de malato (Kubicek y col, 1988), (Karaffa y Kubiceck, 2003).

Torres y col, 1994, demostraron que existen tres etapas de control determinantes en la producción de ácido cítrico, todas ellas blancos importantes para el mejoramiento de cepas (Karaffa y Kubiceck, 2003).

- **Toma y fosforilación de las hexosas:** Existen 2 transportadores de glucosa, sin embargo, su papel no está claro. Uno de los transportadores, de baja afinidad, se encuentra activo en condiciones de alta concentración de azúcar como las utilizadas para la producción de cítrico. La toma de la glucosa no se inhibe ni siquiera en condiciones de alta concentración de cítrico en el medio, pero las permeasas sí (Torres y col., 1996). Al parecer, en esta condición la entrada de la glucosa se da por difusión pasiva.
- **Excreción de ácido cítrico de la mitocondria al citosol:** Como se mencionó anteriormente, la excreción del cítrico de la mitocondria ocurre gracias a la existencia de un transportador de tricarboxilato, la excreción está adicionalmente acoplada a la entrada de malato, hecho que se ha

soportado en la observación de un incremento en la concentración de malato previo a la acumulación de ácido cítrico (Evans y col., 1983).

- **Excreción del ácido cítrico del citosol al exterior:** Ocurre en condiciones de una alta concentración de citrato dentro de las células, por lo que requiere ATP. El proceso requiere adicionalmente de una permeasa, que se incrementa, según estudios realizados en cultivos del hongo bajo condiciones de deficiencia de manganeso (Madigan y col., 2003).

2.10 Factores que afectan la producción de ácido cítrico

2.10.1 Nutrientes

La composición del medio usado para la producción de ácido cítrico por *A. niger* depende de la raza del microorganismo usado y el tipo de proceso. Generalmente, la raza que puede usar eficientemente la fuente de un carbono deja de mostrar buena producción de ácido cuando es cultivado en un medio que contiene otro. El *A. niger* crece bien en medios que contienen carbohidratos (sucrosa, glucosa, fructosa, maltosa, manosa y almidón), nitrógeno (como amonio o iones nitrato), fosfatos, bajas concentraciones de potasio, magnesio, sulfato y trazas de metales como el hierro, manganeso, zinc y cobre. Ha sido encontrado que los rendimientos de ácido cítrico son mucho más altos cuando las cepas de *A. niger* crecen en medios simples sintéticos en vez de medios complejos. La concentración de azúcar inicial juega un rol importante. Las concentraciones más altas de ácido cítrico fueron observadas en crecimientos de cultivos con altas concentraciones de azúcares (15-20% p/v). Un incremento más allá de la concentración de azúcares (250 g/L), resulta en una disminución del 15 % en la concentración del ácido. La disminución en la concentración de ácido encontrado con el tratamiento de altas concentraciones, fue probablemente, debido a efectos

osmóticos. Ha sido reportado que a concentraciones críticas sobre 150 g/L, la actividad del agua disminuye y aparece plasmólisis ambos efectos se combinan y causan una disminución en la velocidad de fermentación y concentración del producto.

Además, una concentración inicial de azúcar (>20%), trae una baja utilización del azúcar, haciendo el proceso no económico, mientras que bajas concentraciones de azúcar (<5%), trae bajos rendimientos de ácido cítrico y una gran acumulación de ácido oxálico. El pre-crecimiento del *A. niger* en sacarosa al 1% (p/V) y transferirlo a una concentración del 14 % p/v de otros azúcares varios (sacarosa, glucosa, maltosa, manosa y fructosa) inducen la acumulación de ácido cítrico. (Shetty y col, 2006).

La adición de nitrógeno y fosfato tienen una gran influencia en la producción de ácido cítrico. Generalmente, una concentración de nitrógeno o fosfato más baja que 0,2 % (p/v) en el medio, parece ser la más adecuada. Altas concentraciones de nitrógeno (>0,8 g/L), resulta en una disminución del 100% en la producción de ácido cítrico. Se alimenta con nitrógeno para la formación de nuevas células en el tope de las hifas (conidios). Las células más viejas sufren de limitación de nitrógeno y en consecuencia almacenan carbono y producen ácido cítrico.

La concentración de fosfato en el medio es muy importante para el crecimiento de *A. niger* y la biosíntesis del ácido cítrico. Una alta concentración de fosfato (>2g/L), promueve mayor crecimiento del microorganismo y baja producción de ácido cítrico. Como en el caso del nitrógeno, la producción de ácido cítrico comienza después del agotamiento de componentes de fósforo (Shetty y col, 2006).

2.10.2 Elementos Trazas

Los elementos trazas juegan un rol significativo. Altas concentraciones de metales trazas (5mg/L), disminuyen la concentración de ácido cítrico, mientras que bajas concentraciones (1mg/L) mejoran la producción del ácido. Se han encontrado que las concentraciones optimas de elementos trazas como Fe^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} es de 1mg/L, mientras que el NaCl y CaCl_2 no tienen efecto a bajas concentraciones. Otros elementos trazas como Cu^{2+} , Co^{2+} y Mo^{2+} tienen un efecto adverso. En presencia de altas concentraciones de manganeso (Mn^{2+}), incrementa el crecimiento de células, el consumo de azúcar disminuye y la etapa de acidogenesis disminuye drásticamente. Esto se explica ya que bajas concentraciones de manganeso en el medio, da como resultado de una represión de las enzimas del ciclo del ácido cítrico a excepción de la Citrato sintasa (Shetty y col, 2006).

2.10.3 Inhibidores y Estimulantes

Los estimulantes químicos son sustancias que incrementan la concentración del producto cuando es añadido al medio. Los estimulantes más importantes utilizados para mejorar el rendimiento de ácido cítrico por *A. niger* son metanol y etanol. Estos químicos han sido probados que retardan el crecimiento, esporulación e incrementan entre un 30-50% la producción de ácido cítrico. La adición de algunos inhibidores como el fluoruro de calcio, fluoruro de sodio, fluoruro de potasio, peróxido de hidrogeno, naftaquinona, azul de metileno, malonato de sodio, ferrocianuro de potasio, yodoacetato, sodio azida y arsenato de sodio a diferentes medios, disminuye la concentración de ácido cítrico en un 30-40%. La galactosa causa inhibición en la producción de ácido cítrico (Shetty y col, 2006).

2.10.4 Temperatura

El *A. niger* y otros hongos utilizados para la producción de ácido cítrico de medios sintéticos y melazas en fermentaciones sumergidas tienen una temperatura óptima entre 25 y 30°C.

2.10.5 Tiempo de biosíntesis

El tiempo óptimo para la producción de ácido cítrico depende de la cepa utilizada, la composición del medio, el sistema de biosíntesis y generalmente de las condiciones sobre las cuales la biosíntesis toma lugar. Para cultivos en superficie el tiempo es de 10-20 días, mientras que para cultivos sumergidos el tiempo es mucho más corto entre 5-10 días.

2.10.6 pH

Un factor importante en la biosíntesis de ácido cítrico es el pH inicial del medio. Cuando el medio que se emplea es sintético, el pH inicial es ajustado de 2,5 a 3,5, mientras que en el caso de melazas el pH inicial debe ser neutral o ligeramente ácido con el fin de que ocurra la germinación y el crecimiento del microorganismo. El pH del medio disminuye (desde 7 a 2) debido a la producción de ácido cítrico y otros ácidos generados en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA). Se puede separar las etapas de producción de ácido cítrico y ajustar el pH en los tiempos adecuados. Primero el pH puede estar entre 4-6 para obtener la cantidad deseada de micelio y luego bajar el pH para estimular la producción del ácido cítrico en medios como melaza (Shetty y col, 2006).

2.10.7 Aireación y agitación

El *A. niger* es un microorganismo aeróbico y por consiguiente requiere oxígeno. La aireación y la agitación en el caldo de fermentación normalmente satisface la demanda de oxígeno del proceso. El efecto de la agitación y aireación en la producción de ácido cítrico en cultivos sumergidos es extremadamente importante para el progreso exitoso de la fermentación. La agitación es importante para la adecuada mezcla, transferencia de masa y calor.

No solo ayuda a la transferencia de masas de diferentes fases presentes en el cultivo, sino que también mantiene homogéneo las condiciones físicas y químicas del cultivo. La aireación puede ser beneficiosa para el crecimiento y el desempeño de las células microbianas, mejorando la transferencia de masa con respecto al sustrato, productos y subproductos y oxígeno. En general el porcentaje de oxígeno disuelto debe ser entre 25-30% (Shetty y col, 2006).

2.11 Proceso industrial del ácido cítrico

Los hermanos Pfizer en 1923, mediante la técnica descubierta por J. Curriel comienzan la producción a escala industrial de este producto. En 1925 Italia rompe el monopolio que ejercía sobre la materia prima y Pfizer logra expandirse. En 1950, la producción de ácido cítrico alcanzaba las 50.000 toneladas/año. Se registra una importante expansión de mercado sobre este producto, debido a que el proceso de obtención, mediante fermentaciones, es mucho más adecuado y se convierte en un producto mucho más económico. Ya en la década de los 80 los hermanos Pfizer se convierten en los líderes del mercado mundial con el ácido cítrico. (Torre, 2008).

El proceso de producción de ácido cítrico anhidro se divide en tres partes claramente diferenciadas: producción del ácido cítrico, separación del ácido cítrico de las impurezas del licor y, por último, purificación y conformado del producto.

2.11.1 PRODUCCIÓN DE ACIDO CITRICO POR MELAZAS

En primer lugar, tendrán lugar una serie de etapas previas cuyo fin es acondicionar las materias primas principales de la fermentación: el agua y las melazas. Antes de ser cargada en el fermentador, el agua se hace pasar por un lecho de desmineralización que retirará los iones disueltos presentes. En cuanto a la melaza, abandonará el depósito donde se almacena llegando a un filtro, donde se separarán todos los sólidos que pudiera contener. Posteriormente también se retiran los iones disueltos presentes en la melaza mediante un lecho desmineralizador (Rivada, 2008).

La carga de fermentador se completa con la adición de ciertos nutrientes suplementarios, tras lo cual, se produce la esterilización. Se introduce vapor por medio del sistema de aireación del fermentador. El vapor aumentará la temperatura del medio hasta los 100°C y mantendrá esta temperatura durante el tiempo necesario para eliminar todo microorganismo que pueda competir por el sustrato (Rivada, 2008).

Una vez terminado el proceso de esterilización, se debe disminuir la temperatura del medio hasta la temperatura idónea de fermentación. Una vez alcanzada la temperatura de fermentación, se introduce el inóculo; este momento marca el final de los procesos de preparación de la materia prima y el inicio del proceso fermentativo (Rivada, 2008).

Una vez producida la inoculación, el microorganismo comenzará a crecer en el medio, consumiendo la sacarosa y fabricando ácido cítrico. El medio fermentativo debe estar agitado y aireado. La aireación puede ser producida por un sistema de soplantes que introducen el aire exterior o cualquier otro dispositivo, se filtra el aire para limpiarlo de impurezas y microorganismos y una tubería que lo conduce hasta el fermentador. En esta fase, se debe mantener la temperatura, ya que el proceso es exotérmico (Rivada, 2008).

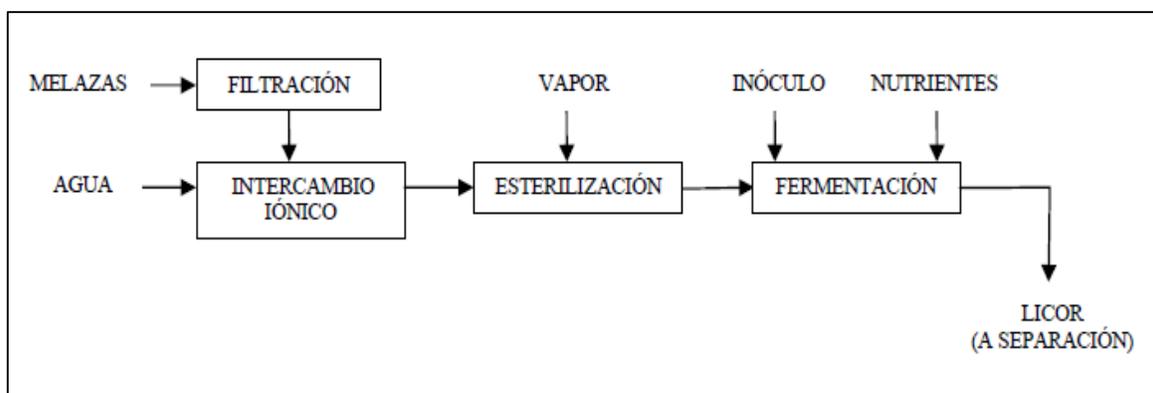


Figura 5. Proceso de producción de Ácido Cítrico.

Fuente: Rivada, 2008.

La fermentación va a ser la etapa más duradera de todo el proceso, aproximadamente 6 días. Durante el proceso fermentativo se controlan distintas variables (temperatura, pH, etc.), para que transcurra de manera correcta y se produzca la mayor cantidad posible de ácido cítrico. Tras el tiempo estipulado, el fermentador se descarga. El producto obtenido, el licor post-fermentativo, contiene ácido cítrico, agua y una serie de impurezas. Este licor se conduce por tubería hacia la siguiente etapa del proceso (Rivada F, 2008)

2.11.2 Separación del ácido cítrico

Después de la fase post fermentativa, el licor resultante se trata para la separación del ácido cítrico, proceso que se esquematiza en la figura 6. Esta fase comienza con la llegada del licor post-fermentativo a un filtro, cuya función es separar el micelio. La torta sólida que forma el micelio será enviada, por ejemplo, por medio de cinta transportadora hacia un depósito donde será almacenada. El líquido filtrado, compuesto por el licor post-fermentativo sin micelio, se transporta mediante tubería hacia el tanque de lechada (Rivada, 2008).

En el tanque de lechada, el líquido que se va filtrando en la etapa anterior se irá mezclando con una lechada ya preparada. Se produce una reacción química que transforma el ácido cítrico, presente en el licor post-fermentativo, en citrato cálcico, el cual es sólido y precipita. Para que esta reacción se produzca adecuadamente es necesario un sistema de agitación que promueva la mezcla de sustancias y un serpentín refrigerante, ya que la reacción producida es exotérmica (Rivada, 2008).

Una vez acabado el proceso, la masa dentro del reactor se calienta hasta una temperatura cercana a la de ebullición. Una vez calentado el licor, será

enviado a un filtro. Este equipo separará el citrato cálcico en forma de torta y lo enviará mediante cinta transportadora hacia el reactor de descomposición del citrato. El líquido filtrado (licor post-fermentativo sin ácido cítrico) es mandado por tubería hacia un depósito para su almacenaje (Rivada, 2008).

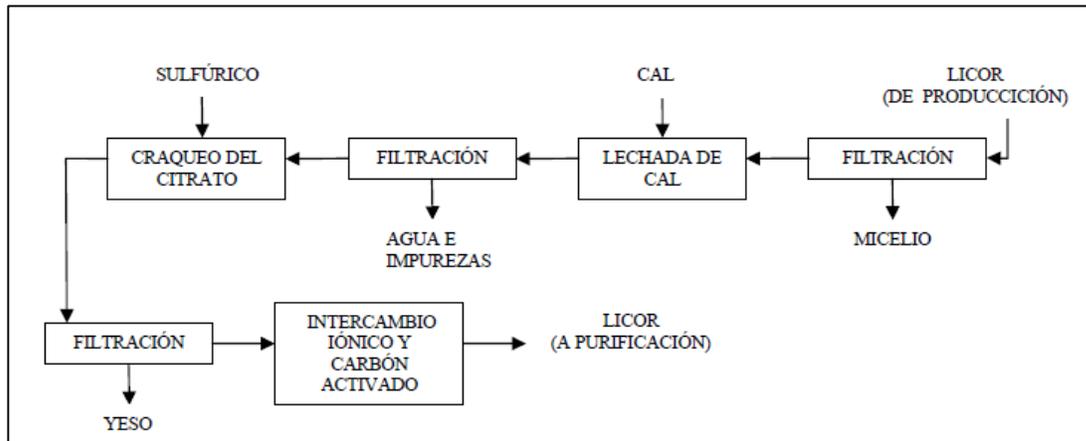


Figura 6. Proceso de Separación del Ácido Cítrico.

Fuente: Rivada, 2008.

En el reactor de craqueo, la torta de citrato cálcico se irá mezclando con una disolución de ácido sulfúrico, produciéndose una reacción química que forma yeso (el cual es sólido y precipita) y deja libre en disolución el ácido cítrico. En este reactor es fundamental una buena agitación para mezclar bien la torta sólida con el ácido sulfúrico, también se debe eliminar el calor producido durante la reacción mediante un sistema de refrigeración (Rivada, 2008).

Tras el craqueo del citrato cálcico, la masa reaccionante se conduce mediante tubería a un filtro que separará el sulfato cálcico o yeso del líquido que contiene el ácido cítrico. El yeso se transporta hacia un depósito para su almacenaje, mientras que el líquido filtrado será conducido hasta un sistema combinado de desmineralización y carbón activado que eliminará ciertas impurezas que aún arrastra el producto (Rivada, 2008).

2.11.3 Purificación del ácido cítrico

La fase de purificación comienza cuando la disolución de ácido cítrico abandona la columna de intercambio iónico y carbón activado y es conducida hacia el siguiente equipo, que es un evaporador. En este proceso la disolución de ácido cítrico perderá agua mediante la acción de un calor cedido por un vapor condensante, quedando lo suficientemente concentrada como para poder entrar en el siguiente proceso (figura 7).

La corriente que sale del evaporador se introduce en un equipo de cristalización. En el interior del aparato se creará sobresaturación por vacío, lo que provocará la nucleación y la formación de cristales sólidos de ácido cítrico. Estos cristales, acompañados por el resto de licor que no ha cristalizado, abandonarán el cristizador camino de la siguiente etapa (Rivada, 2008)

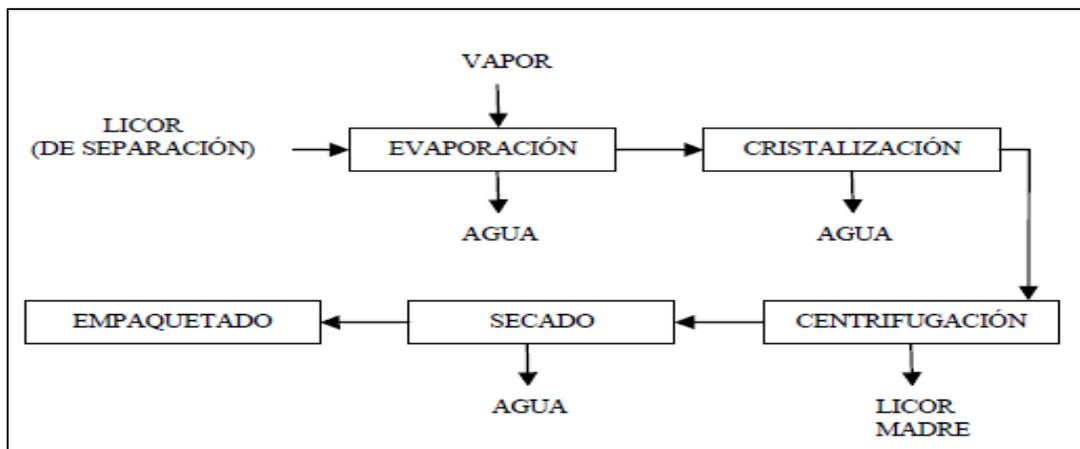


Figura 7. Proceso de Purificación del Ácido Cítrico a partir de melazas.

Fuente: Rivada, 2008.

El magma procedente del aparato de cristalización será conducido a una centrífuga que separará los cristales recién formados de producto del licor y sus impurezas, abandonando el equipo prácticamente seco. La corriente cristalina es

conducida a un secador, donde los cristales de ácido cítrico pierden el agua restante, quedando totalmente secos. En esta etapa se le darán las características finales al producto (Rivada, 2008).

Por último, la corriente de producto llegará a una maquina pesadora ensacadora donde el ácido cítrico anhidro será introducido en sacos, sellados herméticamente. Los sacos serán transportados hacia la zona de almacenaje donde esperarán su transporte para su posterior venta (Rivada, 2008).

2.12 Vinaza

La vinaza es un material líquido resultante de la producción de etanol, ya sea por destilación de la melaza fermentada o de la fermentación directa de los jugos de la caña. Su origen es, entonces, las plantas de caña de azúcar por lo que su composición elemental debe reflejarla del material de procedencia. Se trata de un material orgánico líquido que puede contener como impurezas sustancias procedentes del proceso de extracción de los jugos y de la fermentación (García y Rojas, 2005).

2.13 Composición de la vinaza

La composición de la vinaza depende de las características de la materia prima usada en la producción de alcohol, en este caso melaza, del sustrato empleado en la fermentación, del tipo y eficiencia de la fermentación y destilación y de las variedades y maduración de la caña. La vinaza, resultante de la destilación de melaza fermentada, tiene una composición elemental interesante y contiene todos los componentes del vino que han sido arrastrados por el vapor de

agua así como cantidades de azúcar residual y componentes volátiles (García y Rojas, 2006).

De manera general, los constituyentes son los siguientes (figura 8):

- Sustancias inorgánicas solubles en las cuales predominan los iones K, Ca y SO₄.
- Células muertas de levadura.
- Sustancias orgánicas resultantes de los procesos metabólicos de levaduras y microorganismos contaminantes.
- Alcohol y azúcar residual.
- Sustancias orgánicas insolubles.
- Sustancias orgánicas volátiles.

Elemento	Fuente 1/		
	Melaza	Mixto (jugo-melaza)	Jugo
N*	0,77	0,46	0,28
P ₂ O ₅ *	0,19	0,24	0,20
K ₂ O*	6	3,06	1,47
CaO*	2,45	1,18	0,46
MgO*	1,04	0,53	0,29
SO ₄ *	3,73	2,67	1,32
Materia Orgánica*	52,04	32,63	23,44
Fe**	80	78	69
Cu**	5	21	7
Zn**	3	19	2
Mn**	8	6	7
pH**	4,40	4,1	3,7

Fuente: (1,4) * En Kgr/m³ ** En ppm

1/ Cada valor es el promedio de los resultados obtenidos por 5 autores

Figura 8. Composición Química de la Vinaza.

Fuente: Chaves, 1985.

2.14 Contaminación producida por la vinaza

Uno de los inconvenientes de este residuo es el alto volumen generado en el proceso de destilación, se estima que por cada litro de etanol producido se obtienen entre 10 a 15 litros de este subproducto, que no es más que una mezcla de agua y compuestos orgánicos e inorgánicos. Las sustancias nocivas presentes en la vinaza se deben en gran parte a la materia orgánica representada por azúcares no degradados, carbohidratos no fermentados, compuestos recalcitrantes, restos de levaduras, y una variedad de compuestos inorgánicos (Rosillo y col, 2000).

El gran poder de contaminación de las vinazas se ve favorecido por varias razones como son:

- Existencia de olores desagradables.
- Alta acidez, afectando condiciones bioquímicas de suelos y aguas.
- Alto grado de concentración de sólidos volátiles y fijos, lo que favorece procesos de sedimentación donde son evacuados.
- Elevada demanda biológica de oxígeno (DBO), el cual se define como la cantidad de oxígeno que los microorganismos responsables de la estabilización (oxidación) de la materia orgánica requieren, su valor representa una medida de la concentración de materia biodegradable en el agua

Debido a su elevado contenido de materia orgánica, la vinaza constituye un material altamente contaminante si se dispone directamente a un cuerpo de agua, ya que los valores de DQO y $DBO_{5,20^{\circ}C}$ para un contenido de sólidos del 10% m/m son 116.000 y 41.200ppm respectivamente, lo cual hace necesario su tratamiento antes de ser eliminado. En la Tabla 2, se relacionan algunas de las propiedades

tomadas en cuenta para evaluar la capacidad contaminante de la vinaza (García y Rojas, 2005).

Tabla 2. Comparación de características contaminantes de la vinaza diluida (10%) y concentrada (60%).

Características	Unidades	Concentración	
		10%	60%
DQO	mg/L	116000	590000
DBO	mg/L	41200	240000
pH	Adim	4,5	4,5
SST	mg/L	8990	53900
SSV	mg/L	7100	-
Sulfatos (como SO ₄)	mg/L	5626	33750
Fosforo (como P)	mg/L	97	580

Fuente: (García y Rojas, 2005).

La coloración de la vinaza es producto de la presencia de compuestos fenólicos recalcitrantes derivados de las melazas usadas en la fermentación. Su coloración oscura no permite la fotosíntesis por el bloqueo de los rayos solares causando deterioro a la vida acuática. Estos compuestos fenólicos recalcitrantes representan gran parte de la DQO presente en la vinaza e incluyen además sustancias tales como ácido gálico, melanoides y ácidos tánicos, que no son degradados por tratamientos biológicos.

2.15 Posibles usos de las vinazas

Existen varias posibilidades de aprovechamiento de las vinazas, sin embargo, se ha señalado la necesidad de pre-tratamientos adecuados antes de poder aprovechar los elementos nutritivos que este tipo de material contiene. Por

lo que se recomienda diferentes formas de emplear la vinaza como enmienda orgánica para complementar la fertilización del suelo:

- En compost con bagazo, cascarilla de arroz y cachaza;
- Convertida en humus;
- Mezclada con cal a valores de pH entre 10,5 y 12,5 con adición de cachaza carbonatada y/o ácido fosfórico para precipitar los sólidos que pueden usarse como fertilizante, mientras que la fase clarificada sería usada como riego.
- Mezclada con residuos vegetales de alto en contenido celulosa (por ejemplo el bagazo).
- Tratada en lagunas, para su posterior aplicación al suelo como agua de riego.
- Producción de proteína unicelular, a través de fermentación aeróbica.
- Producción de gas metano, a través de fermentación anaeróbica.
- Producción de: componentes de raciones animales, empleo de la levadura como fertilizante e Incinerado para producir fertilizante.
- Utilización agrícola del residuo "in natura", sustituyendo total o parcialmente las fertilizaciones minerales.

Ahora bien, investigaciones realizadas en Italia señalan que es posible tratar biotecnológicamente los residuos industriales, entre ellos la vinaza, para lo cual se plantea el uso de complejos enzimáticos que permiten convertir efluentes orgánicos industriales en abonos orgánicos susceptibles de ser conservados por largos periodos de tiempo sin que se alteren sus características y su poder fertilizante (Brignoli, 1993).

En algunos estudios realizados se indica que la adición de multienzimas, para el compostaje de materiales orgánicos provenientes de la agroindustria de la caña de azúcar, mejora la solubilidad de fósforo, calcio y magnesio, y provoca un incremento del nitrógeno total del compost sólido obtenido, se refieren específicamente a la cachaza y el bagazo. (Pimentel y Rivero, 2011).

CAPITULO III

MARCO METODOLOGICO

En ésta sección se describe la metodología empleada la cual incluye nivel, diseño, técnicas y procedimientos que permitieron llevar a cabo la ejecución del presente trabajo. El nivel de la investigación es descriptiva (Hernández y col, 2006), ya que, se deseó primeramente detallar la vinaza, con sus características fisicoquímicas y microbiológicas, para luego evaluar con la información obtenida en las caracterizaciones, su posible uso como medio complementario en la fermentación, tipo sumergida, empleando *Aspergillus niger*, especificando las condiciones óptimas de crecimiento de dicho microorganismo y teniendo como parámetro de referencia la estimación de la producción de ácido cítrico.

En lo que respecta al diseño de la presente investigación es experimental, ya que, se realizó la manipulación de variables (independientes) y se midió el efecto sobre las variables dependientes a través de métodos científicos aprobados en gacetas oficiales nacionales o métodos estándar aprobados internacionalmente (Hernández y col 2006).

A continuación se describe los procedimientos o técnicas que se llevaron a cabo en la realización de ésta investigación.

1.- MATERIAL BIOLÓGICO Y RESIDUO INDUSTRIAL

1.1.- *Aspergillus niger*.

La cepa utilizada en la investigación de producción de ácido cítrico pertenece al género *Aspergillus niger*, la cual fue proporcionada por el Centro de

Investigación Microbiológicas Aplicadas CIMA-UC, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo.

1.2.- Residuo Industrial (Vinaza).

Las muestras del residuo industrial (vinaza) fueron donadas por la destilería, ubicada en la región central, específicamente en el Estado Yaracuy, de la República Bolivariana de Venezuela.

2.- CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE LA VINAZA.

Se procedió a realizar la caracterización físico-química y microbiológica del residuo industrial con la finalidad de conocer la naturaleza del mismo y las condiciones iniciales con las cuales se efectuaron los ensayos.

2.1.-Caracterización Físico-Química de la vinaza.

Se realizó la caracterización físico-química de la vinaza en parámetros como: Demanda Biológica de Oxígeno($DBO_{5,20^{\circ}C}$), Demanda Química de Oxígeno (DQO), Sólidos Totales (ST), Sólidos Suspendidos Totales (SST), Sólidos Disueltos Totales (SDT), Nitrógeno total, Fósforo Reactivo (Orto PO_4^{2-}), Fenoles, Sulfatos (SO_4^{2-}), Azúcares Reductores, Ácido cítrico y pH, detallándose los procedimientos a continuación:

2.1.1.- Demanda química de oxígeno (DQO).

Una alícuota de 1 mL de vinaza se trasvasó a un balón de 50 mL y se completó con agua destilada. 0,5 mL de ésta solución se colocó en el vial de determinación de DQO y se adicionó 1,5 mL de agua destilada (Factor de dilución 1/4). Se agitó el vial hasta disolver el sólido, teniendo cuidado de no tocar la parte de vidrio ya que la reacción es exotérmica, luego el vial se colocó en un digestor por 120 min a 150°C y después se dejó enfriar a temperatura ambiente, para efectuar la lectura siguiendo la metodología del espectrofotómetro HACH 2800.

2.1.2.- Demanda biológica de oxígeno (DBO_{5días,20°C}).

Se vertió 2 L de agua destilada en una fiola del mismo volumen y se añadió 2 mL de solución de fosfato, MgSO₄, CaCl₂ y FeCl₃. Luego se llevó esta solución a una temperatura de 20°C, tapándola con un tapón de algodón y se mantuvo en aireación durante 3 horas, para garantizar que la concentración de oxígeno disuelto estuviese cercana a 8 mg/L. Volúmenes de la muestra de vinaza (0,5 y 1 mL) se adicionaron a agua completando el volumen hasta 300 mL con agua de dilución anteriormente preparada. Seguidamente se agregó 2 mL de una solución de sulfato manganoso (MnSO₄) y 2 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄), se agitó para disolver el precipitado y se tomaron 100 mL de cada una de las muestras para titular con una solución de tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃·5H₂O) 0,025 N. Como indicador del punto final de la titulación se agregó almidón. (Clesceri y col, 1998).

2.1.3.-Nitrógeno Total.

Una alícuota de 1 mL de vinaza se trasvasó a un balón de 50 mL y se completó con agua destilada. De ésta solución se tomaron 10 mL, se colocaron en un tubo Keldahl, y se procedió a digerir en una manta a 350°C hasta que los humos blancos desaparecieron. Luego la solución digerida se trasvasó al equipo

de destilación Keldahl, añadiendo 15 mL de NaOH 30%p/v. Los valores de NH₃ se incorporaron a la solución de ácido bórico, mediante el arrastre con vapor de agua y el punto final de la colecta se realizó hasta la observación del cambio de color de morado a verde, el volumen colectado (50 mL), se tituló con H₂SO₄ 0,02 N (Clesceri y col, 1998).

2.1.4.- Sólidos totales.

Se colocaron los crisoles a 100 ± 5 °C en una estufa durante una hora, luego se colocaron en un desecador por 15 min, y finalmente se pesaron en una balanza analítica, determinándose así el peso inicial. Seguidamente alícuotas de 5 mL de vinaza, se colocaron en los crisoles y se llevaron a la estufa a 100 ± 5 °C durante 1 hora, luego de enfriamiento, los crisoles se enfriaron en un desecador por 15 min y se pesaron en una balanza analítica. La concentración de sólidos totales se obtuvo mediante la diferencia de peso final menos peso inicial (Clesceri y col, 1998).

2.1.5.- Sólidos disueltos.

Se colocaron los crisoles a 180 ± 5 °C en una estufa durante una hora, luego se colocaron en un desecador por 15 min, y finalmente se pesaron en una balanza analítica, determinándose así el peso inicial. Seguidamente se filtraron alícuotas de 5 mL de vinaza en papel Watman N40, y los filtrados se colocaron en crisoles y se calentó en estufa a 180 ± 5 °C durante 1 hora. Los crisoles, se enfriaron en un desecador por 15 min y se pesaron en una balanza analítica para obtener el peso final. La concentración de sólidos disueltos se obtuvo mediante la diferencia de peso final menos peso inicial (Clesceri y col, 1998).

2.1.6.- sólidos fijos totales.

Se procedió de la misma manera que el punto 2.1.4, con calentamiento en mufla a 550°C durante 1 hora (Clesceri y col, 1998).

2.1.7.- Sólidos fijos disueltos.

Se colocaron crisoles a $(550 \pm 5)^{\circ}\text{C}$ en una mufla por 1 hora y luego de enfriar en un desecador por 15 min, se pesaron los crisoles en una balanza analítica y así obtuvo el peso inicial. Seguidamente alícuotas de 5 mL de vinaza filtrados en papel Watman N 40, se transfirieron a los crisoles y se llevó a la estufa a $(180 \pm 5)^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora, para luego pasarlos a la mufla a 550°C durante 1 hora. Los crisoles se enfriaron en un desecador por 15 min y se pesó en una balanza analítica para obtener el peso final. La concentración de sólidos fijos disueltos se obtuvo mediante la diferencia de peso final menos peso inicial (Clesceri y col, 1998).

2.1.8.- Sólidos fijos suspendidos y solidos suspendidos totales.

Los valores correspondientes a éstos dos parámetros, se obtuvieron mediante la diferencia de los valores correspondientes a solidos fijos totales y fijos disueltos y solidos totales y solidos disueltos.

2.1.9.- Fenoles.

1 mL de vinaza se disolvió y completó hasta 100 mL con agua destilada en un balón aforado de 100 mL. Luego 5 mL de ésta solución y se llevaron a una fiola de 20 mL, aplicándose a metodología Hydrocheck p-nitroanilina como sigue: se añadió 5 gotas de reactivo A obteniéndose una coloración amarilla, luego se añadió una cucharada de reactivo B hasta disolver el sólido y decolorar la solución

y seguidamente se añadió 5 gotas del reactivo C variando la coloración de la solución de amarillo a naranja dependiendo de la concentración de fenoles presentes en la muestra, seguidamente se midió la absorbancia a 445 nm en un espectrofotómetro HACH 2800.

2.1.10.- Fosforo Reactivo (Orto- PO_4^{2-}).

1mL de vinaza se llevó a 50 mL en un balón aforado, luego en un vial del kit de fosforo reactivo (Orto- PO_4^{2-}) HACH Método TNT 844 y se añadió 0,5 mL de la solución preparada, se tapó el vial y se agitó 3 veces para luego colocarlo en una plancha de calentamiento a 100°C por 1 hora. Después de enfriamiento, al vial se le añadió 0,2 mL de reactivo B y seguidamente se incorporó el reactivo C se agitó y después de 10 min, se procedió a medir la concentración de éste parámetro en el espectrofotómetro HACH 2800.

2.1.11.- Sulfatos (SO_4^{2-}).

1mL de vinaza se llevó a 100 mL en un balón aforado, se aplicó la metodología Método Sulfaver 8051 HACH la cual se describe a continuación: se vertió 10 mL de ésta solución en el envase medidor para éste parámetro, seguidamente se añadió el contenido de un sobre de reactivo Sulfaver 4 y se agitó hasta que se disolviera el reactivo, después de 5 min se procedió a medir el parámetro en el espectrofotómetro HACH 2800.

2.1.12.- Hierro Total.

1mL de vinaza y se llevó a 50 mL en un balón aforado, aplicándose la metodología Ferover HACH la cual se describe a continuación: se vertió 10 mL de ésta solución en el envase medidor para este parámetro, seguidamente se añadió

el contenido de un sobre de reactivo Ferrover hasta que se disolviera el reactivo, después de 3 min se procedió a medir el parámetro en el espectrofotómetro HACH 2800.

2.1.13.- Biomasa por el Método de Peso Seco.

Se secó un papel de filtro a 75°C por 2 horas y se dejó enfriar por 30 minutos en un desecador, seguidamente se pesó el papel en una balanza analítica. Luego se filtró 10 mL del medio de fermentación y el filtrado se colectó en un Erlenmeyer de 20 mL; seguidamente se colocó el papel filtro sobre una placa de Petri y se dejó secar, a 75°C por 2 horas, y enfriar por 30 min en un desecador. Finalmente luego de pesar el papel de filtro en una balanza analítica se determinó la biomasa por diferencia de peso. En el Apéndice A (pág. 124 a la 148), se muestran los tiempos de toma de muestra en la determinación de éste parámetro para los diferentes ensayos que se realizaron.

2.1.14.- Curva de calibración para la determinación de ácido cítrico (Método Saffran-Densted, 1948).

Se disolvió 400 mg de ácido cítrico en un balón aforado de 1000 mL con agua destilada, de la solución anterior se efectuó diluciones en tubos con tapa de rosca, conteniendo 0,075., 0,15., 0,225., 0,3., 0,375 mL de la solución patrón de ácido cítrico de 400 mg/L. Luego se completó cada tubo hasta un volumen de 0,375 mL con agua destilada, incluyendo un sistema blanco conteniendo únicamente agua destilada. A cada tubo, se adicionó 2,25 mL de anhídrido acético y se calentó en un baño de María a 60°C durante 10 minutos. Seguidamente se agregó 0,375 mL de piridina y los tubos se calentaron nuevamente en baño de María por 40 minutos. La reacción se detuvo al sumergir los tubos en un recipiente de agua con hielo durante 5 min y luego de enfriamiento, se realizó las lecturas a una longitud de onda de 420 nm en espectrofotómetro HACH 2800.

2.1.15.-Determinación de ácido cítrico (Método Saffran-Denstedt, 1948) de la vinaza.

1 mL del filtrado obtenido del proceso de obtención de biomasa, se llevó a 50 mL a un balón aforado, 0,375 mL de ésta solución se transfirió a un tubo con tapa de rosca y se aplicó la metodología anteriormente descrita en el apartado 2.1.14

2.1.16.- Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores con Glucosa (Método 3,5-dinitrosalicílico, DNS).

Se pesó 1g de Glucosa anhidra en la balanza analítica y se transfirió a un balón aforado, se agregó agua destilada y se completó a 100 mL. Se prepararon diluciones de 0.,100., 200., 300., 400., 500., 600., 700., 800., 900 y 1000 mg/L a partir de la solución madre (10 g/L) anteriormente preparada. Luego se determinó los azúcares reductores por el método DNS (Miller 1959) el cual se describe a continuación: 0,5 mL de reactivo DNS previamente preparado, se adicionaron a 0,5 mL de las soluciones patrones anteriormente preparadas, luego los tubos se colocaron en agua a 100°C durante 5 min, y luego se enfriaron con agua y hielo durante 5 min. Finalmente, se adicionó 5 mL de agua destilada y se midió su absorbancia a 540 nm en un espectrómetro HACH 2800.

2.1.17.- Azúcares Reductores por Método DNS (Técnica de Miller, 1959).

1 mL del filtrado para la obtención de biomasa se llevó a 50 mL en un balón aforado con agua destilada. Luego se tomó 0,5 mL de dicha solución y se procedió a medir los azúcares reductores siguiendo la metodología del apartado 2.1.16.

2.1.18.- Determinación de pH.

Se tomaron 5 mL del filtrado para la obtención de biomasa y se colocaron en un beaker de 20 mL de capacidad. Se calibró el pH-metro y a continuación se lavó los electrodos varias veces con agua destilada. Se sumergió los electrodos en el recipiente con la muestra y efectuó la determinación de pH con un equipo modelo Sper Scientific (Clesceri y col, 1998).

2.1.19.- Acidez titulable.

Se midió el volumen restante del filtrado de biomasa en un cilindro graduado de 10 mL, se añadió 3 gotas de indicador de fenolftaleína y se tituló con NaOH 0,1 N, hasta viraje del color de la muestra a rosado (Clesceri y col, 1998).

2.2.-Caracterización Microbiológica

La caracterización microbiológica de la vinaza se realizó con la finalidad de conocer si la misma poseía microorganismos y aplicar un pre-tratamiento previo a la vinaza.

2.2.1 Aislamiento de colonias en la muestras de vinaza mediante el Método de estriación en placas de Petri.

2.2.1.1 Preparación del agar nutritivo en placas de Petri y cuñas de agar.

Se prepararon 300 mL de agar nutritivo (HIMEDIA, India), de acuerdo a las instrucciones indicadas por el fabricante. Una vez disuelto el medio, se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 psi, durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, el

medio se enfrió en un baño de agua hasta ser tolerable al contacto y se vertió en placas de Petri y en tubos con tapa de rosca (cuñas) estériles, hasta su solidificación.

2.2.1.2 Método de siembra por estría en placas de Petri.

Mediante el uso de un asa de siembra esterilizada se transfirió una alícuota de vinaza, realizándose una serie de estrías paralelas no superpuestas sobre una placa con agar nutritivo solidificadas. La placa fue incubada a 37°C durante 24 horas, una vez transcurrido este tiempo, las diferentes colonias formadas, se sembraron en las cuñas de agar, los cuales fueron incubadas a 37°C por 48 h y posteriormente preservadas a temperatura ambiente.

2.2.1.3 Observación de colonias bacterianas en las placas de Petri.

Las características macroscópicas de los microorganismos de la vinaza aislados de las placas de Petri, se determinó a simple vista o con lupa, determinándose su forma, tamaño, elevación, borde, apariencia y color.

3.- Caracterización del *Aspergillus niger*.

3.1.- Caracterización micro y macro morfológica del *A. niger*.

La cepa de *A. niger*, obtenida de cultivos de Agar Dextrosa-Sabouraud, se sembró en placas de Petri selladas y en cuñas, se incubó a 25°C durante 8 a 20 días. Luego se procedió a detallar las características del mismo, procediendo de la siguiente manera: se cortó un trozo de cinta adhesiva y colocó sobre la placa Petri

para que el hongo se adhiriera a la cinta, luego ésta cinta, se colocó en un porta objetos, añadiéndole 3 gotas de azul de lactofenol y se observó al microscopio.

3.2.- Crecimiento del *A. niger* en medio selectivo con Sacarosa como única fuente de carbono.

El crecimiento de *A. niger* en medio selectivo tiene como finalidad conocer si el hongo excreta ácido cítrico.

Para el montaje del sistema se preparó el siguiente bioreactor: en un Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 300 mL de agua destilada, pH = 6,06, se adicionaron: 440,4 mg de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 57,4 mg de $NaNO_3$; 206,8 mg de KH_2PO_4 ; 2,06 g de *A. niger* y 35 g de sacarosa como única fuente de carbono.

Para la toma de muestras se retiraron alícuotas de 10 mL, las cuales se filtraron en papel filtro Watman 4.0, seco y pesado con anterioridad para la medición de biomasa, siguiendo la metodología 2.1.13 y del filtrado se tomó 1 mL y se diluyó en 50 mL con agua destilada para la medición de azúcares reductores siguiendo la metodología 2.1.17. Para la determinación de la concentración de ácido cítrico se utilizaron 0,375 mL del filtrado, siguiendo la metodología 2.1.15. Para la determinación del pH, se colocó en un beacker el resto del filtrado y se siguió la metodología explicada en el apartado 2.1.18. El tiempo de toma de muestras para la determinación de Biomasa fueron: 0, 1, 4 y 7 días y para los demás parámetros (pH, Azúcares Reductores, Acido Cítrico) fueron: 0, 1, 2, 4, 7 y 8 días.

En los días donde no se realizó la medición de biomasa, muestras de 10 mL se colocaron en tubos Falcon de 15 mL de capacidad y se centrifugaron a 4000 rpm por 30 min, el sobrenadante se sometió a la determinación de los demás parámetros como se indicó en el párrafo anterior.

4.-Optimización de las condiciones de crecimiento *A. niger*.

4.1.- Pruebas de viabilidad de *A. niger* a diferentes diluciones de vinaza

Dicha prueba se realizó con la finalidad de saber si *A. niger* es capaz de crecer frente a la vinaza y conocer la dilución a la cual deja de hacerlo.

Se prepararon tubos de ensayo con tapa de rosca, con 20 mL de diferentes concentraciones de vinaza (5., 10., 20., 50., 70 y 100 %v/v) ajustando el pH a 6,0-6,2 con una solución de NaOH 0,1 N, y se esterilizó en un autoclave a 120°C, 15 psi por 15 min. Luego con un asa estéril se realizaron raspados en una placa de Petri con agar Sabouraud donde previamente se creció el hongo. Estos raspados se transfirieron a los tubos que contenían las diferentes diluciones de vinaza y se incubaron durante 3 a 5 días, a temperatura ambiente y aerobiosis.

4.2.- Crecimiento del hongo *A. niger* en vinaza a diferentes pH.

En tres Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 50 mL de vinaza, (esterilizada en autoclave a 120°C, 15 psig por 15 min) el pH fue ajustado a: 4,10; 5,0 y 6,13 con una solución de NaOH 0,1 N. Luego con la ayuda de una asa estéril se cortó un pequeño trozo de micelio de *A. niger* pre-crecido en agar Sabouraud y se

colocó en la superficie del líquido, incubándose las fiolas de 3 a 5 días, a temperatura ambiente y aerobiosis y se determinó el pH en el cual el hongo mostró el mayor crecimiento.

4.4.- Concentración de vinaza para la biosíntesis de ácido cítrico, empleando *A. niger*.

4.4.1.- Uso de la Vinaza para la biosíntesis de ácido cítrico, en diferentes medios de fermentación, empleando *A. niger*.

Se prepararon dos recipientes conteniendo 300 mL de vinaza estéril, uno de ellos se suplementó con sales y el otro no. El pH de la vinaza se ajustó aproximadamente 6, con NaOH 1 N y se añadió una porción pesada del micelio pre-crecido en agar Sabouraud. La tabla 3 detalla la composición del sistema fermentativo.

Tabla 3. Preparación de bioreactores para la obtención de ácido cítrico con vinaza como sustrato, usando *A. niger* como agente fermentativo.

Condiciones iniciales del ensayo	Con adición de Sales	Sin adición sales
Vinaza 100%, Estéril	300 mL	
pH (Adim)	6,06	6,08
Temperatura (°C)	Ambiente	
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g)	0,7085	-
KH ₂ PO ₄ (g)	0,3096	-
MgSO ₄ (g)	0,1023	-
Micelio de <i>A. niger</i> (g)	2,04	1,90
Aireación	Forzada	

Para la evaluación de la fermentación se procedió de la siguiente manera: a) Alícuotas de 10 mL, se filtraron para la determinación de biomasa (metodología 2.1.13); b) 1 mL de filtrado se diluyó en 50 mL con agua destilada en un balón aforado y se siguió la metodología 2.1.17 para la determinación de los azúcares reductores. Para la determinación de la concentración de ácido cítrico se tomaron 0,375 mL del filtrado y se aplicó la metodología 2.1.15. Y en la determinación del pH, se colocó en un beacker el resto del sobrenadante y se siguió la metodología explicada en el apartado 2.1.18. El tiempo de toma de muestras para la determinación de Biomasa, pH, Azúcares Reductores y Ácido Cítrico fueron: 0, 1, 2, 3 y 4 días.

4.4.2.- Producción de ácido cítrico a diferentes diluciones de vinaza, suplementadas con sacarosa.

Se prepararon tres recipientes con 220 mL cada uno con vinaza esterilizada, ajustadas a diluciones de: 5., 10 y 20 % v/v. El pH de la vinaza se ajustó aproximadamente 6, con NaOH 1 N. La tabla 4 detalla las condiciones iniciales de los ensayos.

Tabla 4. Condiciones del sistema fermentativo (bioreactores) para la obtención de ácido cítrico, usando vinaza a diferentes diluciones y suplementada con sacarosa.

Condiciones iniciales	Porcentajes de dilución (%v/v)		
	5	10	20
pH (Adim)	6,01	6	6,01
Micelio de <i>A. niger</i> (g)	1,97	2,11	2,05
Volumen de vinaza (mL) (Estéril)	220		
Temperatura (°C)	Ambiente		
Aireación	Aireador		
Sacarosa (g)	35,02	35,03	35,01

Para la determinación de biomasa, alícuotas de 10 mL, se filtraron en papel de filtro Watman N40, previamente seco y pesado con anterioridad, siguiendo la metodología 2.1.13, 1 mL de filtrado se diluyó en 50 mL con agua destilada para la medición de azúcares reductores y concentración de ácido cítrico, siguiendo las metodologías 2.1.17 y 2.1.15 respectivamente. El tiempo de toma de muestras para la determinación de Biomasa fueron: 0, 1, 4 y 7 días

Para la determinación del pH, se colocó en un beacker el resto del filtrado y se siguió la metodología explicada en el apartado 2.1.18. En los días donde no se realizó la medición de biomasa, muestras de 10 mL se colocaron en tubos Falcon de 15 mL de capacidad y se centrifugaron a 4000 rpm por 30 min. Luego el sobrenadante, se sometió a la determinación de los demás parámetros como se indicó en el párrafo anterior. El tiempo de toma de muestras para los parámetros (pH, Azúcares Reductores, Ácido Cítrico) fueron: 0, 1, 2, 4, 7 y 8 días.

4.4.3.-Preparación de bioreactores para la biosíntesis del ácido cítrico empleando *A. niger*, a diferentes diluciones de vinaza, suplementadas con sacarosa y pre-tratamiento biológico.

4.4.3.1.- Pre-tratamiento biológico de la vinaza para remoción de fenoles.

Debido a que la muestra del residuo industrial posee altas concentraciones de fenoles y éste es un agente bactericida y fungicida, el tratamiento se realizó para disminuir y determinar la influencia de la concentración de fenoles, presentes en la vinaza, en el proceso de biosíntesis de ácido cítrico empleando *A. niger* como microorganismo productor de esta molécula. Para ello se dispuso de 4 cepas de microorganismos que se detallan en la tabla 6 y se realizaron los ensayos en vinaza al 10% v/v.

Tabla 5. Microorganismos para prueba de remoción de fenoles en vinaza al 10%v/v.

Tipo de microorganismo	Genero	Proveedor
Hongo	<i>Penicillium</i> sp.	CIMA UC
Bacterias	Indeterminado.	CIMA-UC
Hongo B	Indeterminado	Laboratorio de Biotecnología del departamento de Biología de FACYT.
Hongo C	Indeterminado	Laboratorio de Biotecnología del departamento de Biología de FACYT.

4.4.3.2.- Ensayo para remoción de fenoles en vinaza al 10% con *Penicillium sp.*

En un bioreactor con 300 mL de vinaza esterilizada, ajustada a pH 6,12 con NaOH 1 N, se adicionó 1,93 g de micelio del hongo *Penicillium sp.* pre-crecido en agar Sabouraud y se incubó bajo condiciones aeróbicas y a temperatura ambiente.

Para la determinación de fenoles, alícuotas de 5 mL se centrifugaron a 4000 rpm por 15 min y 1 mL de sobrenadante, se diluyó en 100 mL con agua destilada en un balón aforado del mismo volumen para obtener una solución (1/100). Seguidamente 5 mL de la solución antes mencionada, se transfirió a fioles de 20 mL y se aplicó el método de la p-nitroanilina para determinar fenoles (metodología 2.1.9). El tiempo de toma de las alícuotas fueron 0, 1, 2, 3, 4, 7, 9, 10, 11 y 14 días.

4.4.3.3.- Viabilidad y aclimatación de cepas bacterianas degradadoras de fenoles en vinaza al 5%v/v.

Las cepas bacterianas degradadoras de fenoles, fueron suministradas en cuñas de agar blando. Con la ayuda de un asa estéril se cortó un trozo de agar de la zona que presentaba la mayor concentración de bacterias y se colocó en 20 mL vinaza estéril al 5%v/v, en condiciones de aerobiosis, durante 3 días.

Para la determinación de fenoles se realizó el mismo procedimiento en el apartado 4.3.2 y la metodología 2.1.9. El tiempo de toma de las alícuotas fueron 0, 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12 y 13 días.

4.4.3.4.- Ensayo para remoción de fenoles en vinaza al 10% con Hongos de podredumbre blanca.

Dos bioreactores con 300 mL de vinaza esterilizada, ajustada a pH aproximadamente 6 con NaOH 1 N, se inocularon cantidades determinadas de micelio de los hongos B y C pre-crecidos en agar Sabouraud y bajo condiciones aerobias. La tabla 7 detalla las condiciones iniciales. Para la toma de muestras, se realizó el mismo procedimiento indicado en el apartado 2.1.9 para la remoción de fenoles. El tiempo de toma de las alícuotas fueron 0, 1, 2, 3, 4, 7, 8, y 9 días.

Tabla 6. Condiciones iniciales para el ensayo de remoción de fenoles en vinaza al 10%v/v con hongos B y C

Condiciones iniciales del ensayo	Hongo B	Hongo C
Vinaza 10% estéril	300 mL	
pH (Adim)	6	6,03
Temperatura (°C)	Ambiente	
Micelio de hongos de podredumbre blanca (g)	2,35	2,52
Aireación	Aireador	

4.4.3.5.- Comportamiento de *Penicillium sp.*, en vinaza a diferentes porcentajes de dilución.

Una vez demostrado que *Penicillium sp.*, presentaba la mayor remoción de fenoles al 10%v/v, se propuso estudiar su comportamiento a diluciones de 5, 10 y 20 %v/v de vinaza. La Tabla 8, detalla las condiciones iniciales de los ensayos.

Para la toma de muestras y determinación de fenoles, se realizó el mismo procedimiento indicado en el apartado 2.1.9. El tiempo de toma de las alícuotas fueron 0, 1, 2, 3, 4 y 7 días. Adicionalmente se realizaron determinaciones de DQO al inicio y final de los ensayos (tiempo 0 y 7 días), siguiendo la metodología del apartado 2.1.1.

Tabla 7. Condiciones iniciales para la remoción de fenoles en vinaza a diferentes porcentajes de dilución, empleando *Penicillium sp.*

Condiciones iniciales	Porcentaje de dilución de vinaza (%v/v)		
	5	10	20
pH (Adim)	6,12	6,01	6,08
Micelio de <i>Penicillium sp.</i> (g)	2,2	2,17	2,27
Volumen de vinaza estéril (mL)	300		
Temperatura (°C)	Ambiente		
Aireación	Aireador		
Tiempo de incubación	2 semanas		

4.4.3.7.- Producción de ácido cítrico empleando vinaza suplementada con Sacarosa y pre-tratada biológicamente con *Penicillium* sp.

Una vez que la vinaza, fue tratada con *Penicillium* sp., ésta se sometió a centrifugación a 4000 rpm por 30 min, luego fue esterilizarla a 120°C, 15 psig por 15 min y suplementada con 35 g de sacarosa. En cada bioreactor se inoculo una cantidad determinada de *A. niger*, incubándose durante 2 semanas y determinándose la producción de ácido cítrico. La tabla 8 detalla las condiciones de los ensayos.

Para determinar los parámetros de estos sistemas, se retiraron 10 mL de filtrándose en papel de filtro Watman N40, seco y pesado con anterioridad. El filtro se pesó para la determinación de biomasa (metodología 2.1.13) y del filtrado 1 mL se diluyo a 50 mL con agua destilada y los azucares reductores y ácido cítrico se determinaron según la metodología 2.1.17 y 2.1.15. Para la determinación del pH, del mismo filtrado se siguió la metodología explicada en el apartado 2.1.18. El tiempo de toma de muestras para la determinación de Biomasa fueron: 0, 1, 3 y 5 días y para los demás parámetros (pH, azucares reductores y ácido cítrico) fueron: 0, 1, 3, 5, 6, 7 y 8 días.

En los días donde no se realizó la medición de biomasa por el método de peso seco, las muestras de 10 mL se colocaron en tubos Falcon de 15 mL de capacidad y se centrifugaron a 4000 rpm por 30 min. Luego se realizó la determinación de los demás parámetros como se indicó en el párrafo anterior. Una vez que se obtuvieron estos resultados, se procedió a calcular la producción diaria y máxima de ácido cítrico en vinaza a diferentes diluciones, suplementadas con sacarosa, con y sin pre-tratamiento biológico.

Tabla 8. Condiciones iniciales para determinar la influencia de concentración de fenoles en la biosíntesis de ácido cítrico empleando *A. niger* en vinaza a diferentes diluciones.

Condiciones iniciales	Porcentaje de dilución de vinaza (%v/v)		
	5	10	20
pH (Adim)	5,98	6,00	6,01
Micelio de <i>A. niger</i> (g)	1,52	1,56	1,59
Volumen de vinaza estéril (mL)	220		
Temperatura (°C)	Ambiente		
Aireación	Aireador		
Sacarosa (g)	35,06	35,00	35,01
Tiempo de incubación	2 semanas		

4.4.3.8.- Estimación de la producción de ácido cítrico una bajo condiciones óptimas para el crecimiento de *A. niger*.

Una vez obtenido la concentración de vinaza en la cual se detectó la mayor producción de ácido cítrico, se procedió a realizar los ensayos correspondientes en un intervalo mayor de tiempo para comprobar que el microorganismo excretaba dicho ácido.

Para la determinación de cada uno de los parámetros se tomaron 10 mL de muestra y se filtró por papel filtro Watmman 4.0, previamente seco, limpio y pesado para la determinación de biomasa (metodología 2.1.13), luego del filtrado se tomaron 0,375 mL de muestra y se aplicó la metodología 2.1.15 para ácido

cítrico, para la determinación de azúcares reductores se aplicó la metodología 2.1.17. El volumen restante de la muestra se transfirió a una fiola de 20 mL y se aplicó la metodología 2.1.19 para la determinación de acidez titulable. El tiempo de toma de muestras para la determinación de Biomasa fueron: 0, 1, 3, 7, 8, 9, 14, 15 y 17 días y para los demás parámetros (pH, azúcares reductores y ácido cítrico) fueron: 0, 1, 2, 3, 7, 8, 9, 14, 15 y 17 días.

Tabla 9. Condiciones iniciales para la estimación de la producción de ácido cítrico empleado *A. niger*, sin tratamiento biológico, con vinaza al 10% v/v

Condiciones iniciales	Vinaza al 10% v/v
pH (Adim)	6
Micelio de <i>A. niger</i> (g)	4,56
Volumen de vinaza (mL) (Estéril)	500
Temperatura (°C)	Ambiente
Aireación	Aireador
Sacarosa (g)	79,55
Tiempo de incubación	2 semanas

CAPITULO IV

PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la vinaza

4.1. Caracterización Físico-química de la vinaza.

La tabla 10 muestra los valores de los parámetros determinados en la vinaza, con la finalidad de conocer si la misma es aprovechable para la producción de ácido cítrico.

Tabla 10. Caracterización Físico-Química de la vinaza.

Parámetro	Unidad	Valor	Decreto 883
DBO _{5días,20°C}	mg/L	26.400	60
DQO	mg/L	104.000	350
pH	Adim	4,58	6 a 9
Ácido cítrico	mg/L	201,742	N/A
Azúcares Reductores	g/L	23,70	N/A
Hierro Total	mg/L	31	10
Fosforo reactivo (PO ₄ ⁻) (Orto)	mg/L	3.495	Fosforo Total 10 mg/L
Nitrógeno total	mg/L	420	40
Sulfatos	mg/L	5.400	1.000
Fenoles	mg/L	1.405,77	0,5
Sólidos totales (105°C)	mg/L	101.200	N/A
Sólidos disueltos (105°C)	mg/L	99.420	N/A
Sólidos suspendidos (105°C)	mg/L	1.800	80
Sólidos fijos totales (550°C)	mg/L	4.040	N/A
Sólidos fijos disueltos (550°C)	mg/L	3.620	N/A
Sólidos fijos suspendidos (550°C)	mg/L	420	N/A

Nota: Decreto 883. Gaceta Oficial 5.021. 1995

La vinaza es un subproducto de la destilación de alcoholes, por consiguiente se trata como un residuo líquido industrial. Según lo observado en la tabla 10, dichos parámetros físico-químicos sobrepasan los valores máximos establecidos en el Decreto 883 para descargas de efluentes líquidos a cuerpos de agua. Por ejemplo, en el caso de la alta concentración de la $DBO_{5\text{días}, 20^{\circ}\text{C}}$ (24.600 mg/L), los valores máximos permisibles, en sus artículos 10 y 15, son 60 y 350 mg/L para cuerpos de agua y redes cloacales respectivamente. Por lo que si éste residuo se descarga a un cuerpo de agua, ya sea, un río, lago o embalse, los microorganismos presentes tendría que requerir mucho oxígeno para oxidar la materia orgánica que se encuentra en la vinaza.

Con respecto a la demanda química de oxígeno (DQO) y sólidos disueltos totales (104.000 mg/L-DQO y 99.420 mg/L-SDT), los valores obtenidos evidencian una alta concentración de compuestos contaminantes, es decir, de difícil degradación y remoción por parte de la biota, por ende, para el tratamiento y disminución de éstos parámetros se necesitan operaciones unitarias de mayor complejidad. El bajo pH presente en la vinaza (pH = 4,58), la hace altamente contaminante y corrosivo e impacta sobre el equilibrio CO_2 -carbonato, el cual rompe la capacidad amortiguadora del agua y por ende la alcalinidad es prácticamente nula. El intervalo de pH tolerable para la vida acuática saludable, es entre 6 y 8 respectivamente, por lo que éste pH representa un peligro inminente si se descarga a un cuerpo de agua.

Los azúcares reductores en éste caso, es de 23,70 g/L; resultado que difiere de investigadores como: Seluy y col, 2012, los cuales reportaron valores entre 6-10 g/L para vinazas cerveceras. Otros como Baldiris y col, 2012, reportaron cantidades de 75,3 g/L para vinazas de caña de azúcar, por lo que la variabilidad del contenido de éste parámetro, depende de un gran número de factores tales como: tipo de alcohol a obtener (ron, cerveza, y otros), materia

prima a fermentar (melaza de caña o remolacha), suelo en donde se realizó la siembra de la caña para obtener la melaza, microorganismo fermentador (levadura, bacteria entre otros), agua de riego a utilizar en la siembra de caña y el tiempo y tipo de muestreo que se le haya realizado a la misma según condiciones de la planta o destilería.

El valor de azúcares reductores en la vinaza analizada (23,70 g/L) es bajo para la producción de ácido cítrico, se ha reportado (Scheachter, 2009) que *A. niger* genera altos rendimientos en la producción del ácido cuando la concentración de azúcares se ubica entre 120 a 250 g/L. Sin embargo, en este trabajo se evaluará si el *A. niger* empleado es capaz de producir el ácido cítrico aun conociendo las características fisicoquímicas determinadas en este efluente.

Por otra parte, la vinaza posee una alta concentración de fenoles (1450 mg/L). Este parámetro se ha vuelto prioritario para su control o remoción debido a su toxicidad para los microorganismos y otras formas de vida, aun a concentraciones menores de 200 mg/L (Li y Humphrey 1989). La presencia de éstos fenoles en la vinaza, está relacionada con su color marrón oscuro debido a la presencia de melanoidinas y otros compuestos fenólicos (Ferreira, 2009). La presencia de α -Cresol, m-cresol, p-cresol, hidroquinona, pirogalol, hidroxianisol, hidroxitolueno, pentaclorofenol y n-hidroxiresorcinol, han sido usualmente reportadas en vinazas. Estas sustancias fenólicas son frecuentemente tóxicas para los microorganismos usados en los bio-tratamientos de efluentes y son altamente recalcitrantes, persisten en el suelo y retienen propiedades antioxidantes (Migo y col, 1993; Pérez y col, 2006; Chandra y col., 2008; Mohana y col, 2009).

Por otro lado por contener altos contenidos de nutrientes y sales, no es conveniente agregar fuentes externas de nutrientes al medio de vinaza para la fermentación de ácido cítrico empleando *A. niger*. Según varios autores concentraciones mayores de 0,2 a 1 g/L de fuentes de nitrógeno y fosfato respectivamente, aumentan la formación de ácido oxálico, la esporulación y disminuye el rendimiento de ácido cítrico (Currie y col, 1947).

En función de los resultados mostrados en la tabla 10, la vinaza, por poseer azúcares (23,70 g/L) y nutrientes como nitrógeno y fósforo 3456 y 420 mg/L respectivamente, puede ser aprovechada como medio de cultivo para *A. niger* y así obtener ácido cítrico, ya que, es una materia prima de fácil acceso, es producida como residuo industrial a grandes cantidades y adicionalmente, este aprovechamiento del residuo ayudaría a contribuir en la minimización de los grandes volúmenes de vinaza que se acumulan y que se obtienen en el proceso de destilación de alcoholes. Así como también evitar el posible impacto ambiental que éste provocaría, si entrase en contacto con algún cuerpo de agua.

4.2 Caracterización Microbiológica de la vinaza.

En la caracterización microbiológica de la vinaza, se observaron cuatro colonias microbianas con morfologías diferentes, las cuales se distinguen por su forma, elevación, borde, apariencia y color. Las características de estos morfotipos bacterianos se detallan a continuación:

Tabla 11. Características macroscópicas de los microorganismos aislados de la vinaza.

Colonia	Morfología
1	Colonias circulares grandes, bordes regulares, color blanco grisáceo.
2	Colonias circulares pequeñas, convexas, bordes regulares.
3	Colonias pequeñas, puntiformes y traslúcidas.
4	Colonias grandes de color blanco grisáceo, pastosas, pliegues irregulares.

En función de los resultados obtenidos, la vinaza contiene microorganismos autóctonos, por consiguiente, para la realización de los ensayos posteriores, la vinaza se sometió a esterilización para garantizar que *Aspergillus niger* se encontrara solo en el medio, sin la competición de otros microorganismos por las fuentes de carbono presentes en la vinaza.

4.3 El Microorganismo *Aspergillus niger*

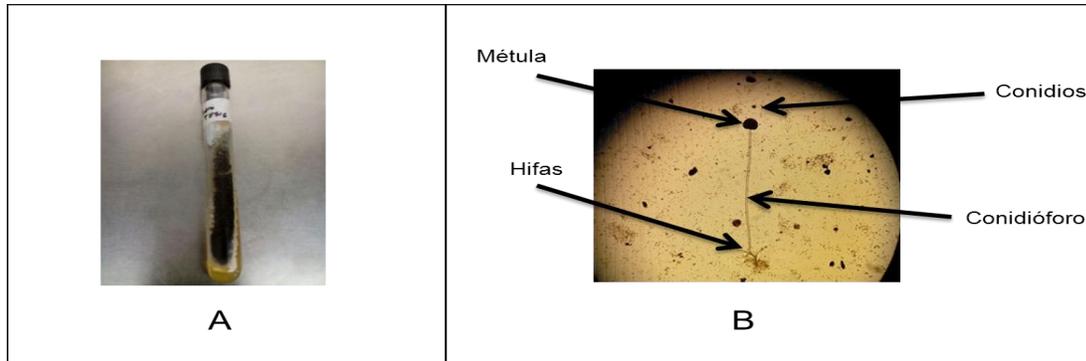


Figura 9. Caracterización macro y micro morfológica de *A. niger* sembrado en cuña en: (A) con agar Sabouraud. (B). imagen al microscopio de luz.
Fuente: Pedro Lugo (2015).

En la figura 9A se puede observar a nivel macroscópico el hongo ocupando el espacio superficial del agar cuyo aspecto físico es de color blanco en los bordes y negro en el centro, lo cual indica que el hongo todavía se encuentra en fase de crecimiento, aunque ya se encuentra maduro. Observando las características microscópicas del hongo (figura 9B), se muestra una estructura filamentosa (hifa), cabeza conoidal y conidios globosos. Vega y col, 2002, reportan características de *A. niger* similares a las reportadas en este trabajo. Con estos resultados se confirma que la cepa suministrada (*A. niger*) es una cepa pura.

4.4 Producción de ácido cítrico en medio selectivo con sacarosa como única fuente de carbono, empleando *A. niger*.

Con la finalidad de conocer si la cepa produce ácido cítrico en un medio mínimo con sacarosa como única fuente de carbono, se colocó un sistema a escala de laboratorio por un tiempo de incubación de 8 días. Adicionalmente se realizaron determinaciones de pH, azúcares reductores y biomasa. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 10, 11 y 12.

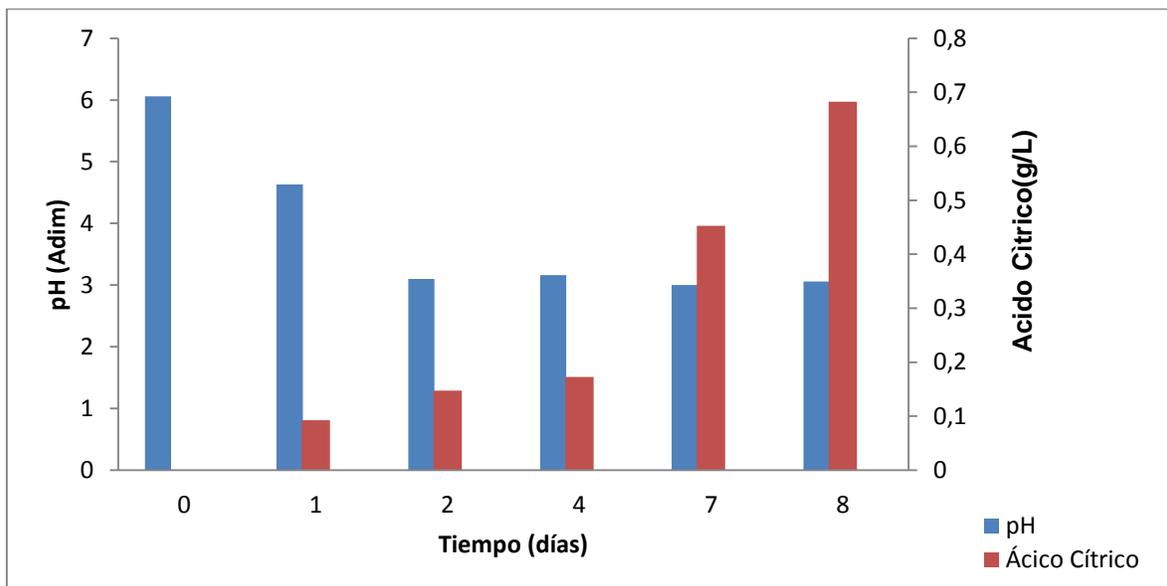


Figura 10. Variación del pH y producción de ácido cítrico, en medio selectivo con sacarosa como única fuente de carbono, empleando *A. niger*.

Fuente: Pedro Lugo (2015).

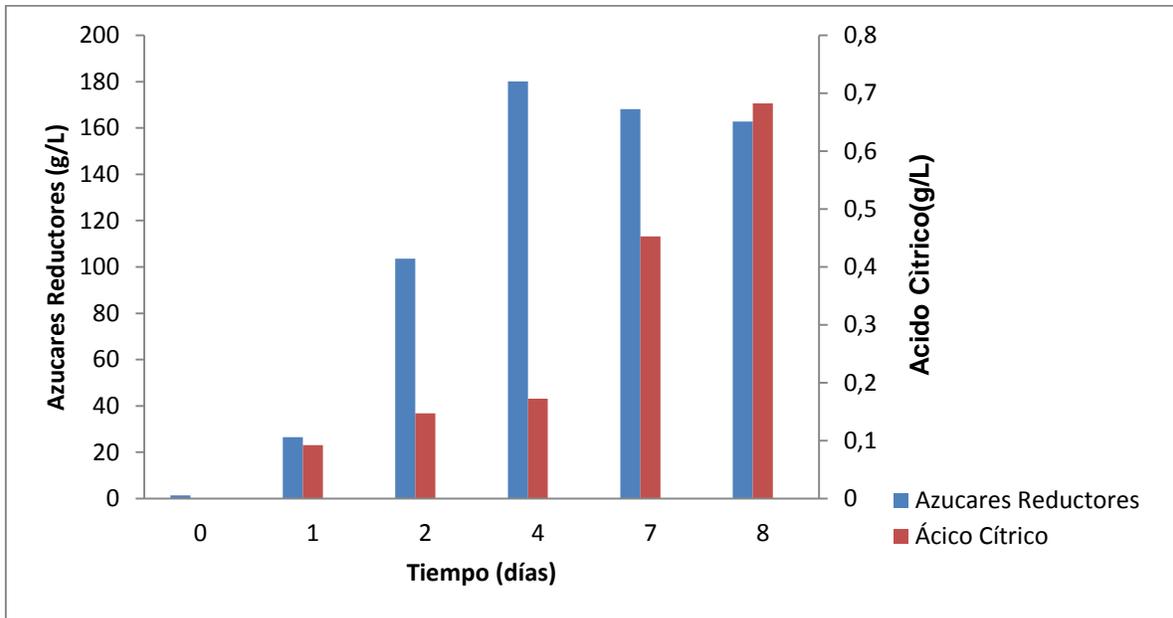


Figura 11. Variación en las concentraciones de los Azúcares reductores y ácido cítrico, en medio selectivo con sacarosa como única fuente de carbono, empleando *A. niger*.

Fuente: Pedro Lugo (2015).

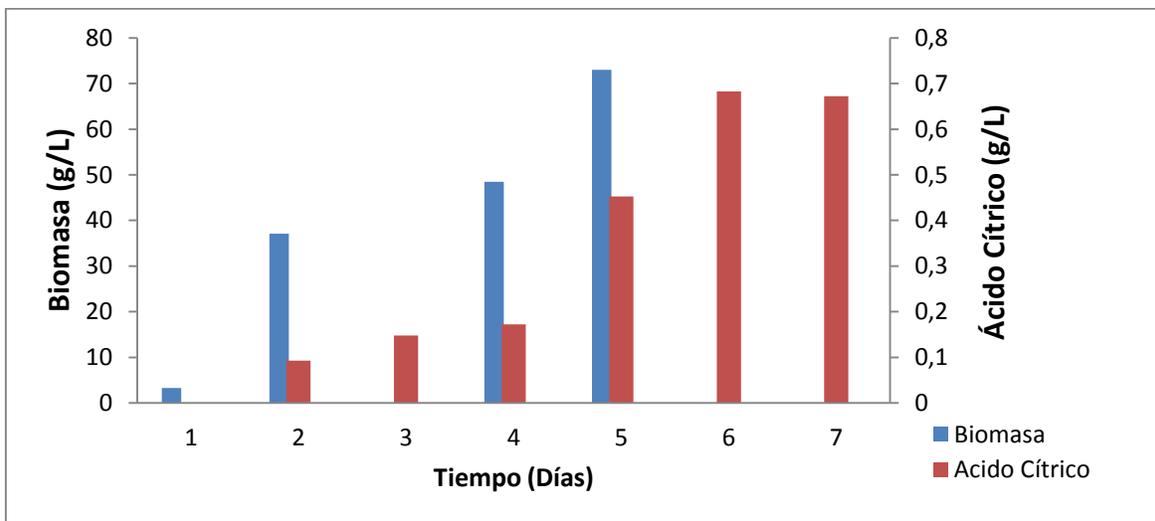


Figura 12. Incremento de la Biomasa y producción de Ácido Cítrico, en medio selectivo con sacarosa como única fuente de carbono, empleando *A. niger*.

Fuente: Pedro Lugo (2016).

En la figura 10, el pH, empieza a descender a las 24 horas, esto puede ser debido no solo a la excreción al medio de ácido cítrico, sino también a la formación de otros ácidos como el ácido glucónico, que se manifiesta en la fase exponencial del hongo, la cual convierte una pequeña cantidad de glucosa en dicho ácido (Schaechter, 2009). Otros investigadores como Roukas y Harvey, 1988, encontraron en melazas de remolacha usando cultivos continuos, que el ácido glucónico se encontraba en mayor proporción a pH mayores de 2,5, mientras que a pH de intervalos de 1,8 a 2., el ácido cítrico, fue el predominante. El descenso de pH también puede deberse a la presencia de otros ácidos del ciclo del ácido cítrico, como el isocítrico, succínico, fumarico, málico, oxálico, generados durante la oxidación completa de la fuente carbonada. El CO₂ también puede hacer descender el pH del medio debido a que éste se disuelve en el agua formando ácido carbónico (H₂CO₃).

En la figura 11, se muestra que la concentración de ácido cítrico se hace mayor respecto al tiempo de incubación, generando además azúcares reductores para sus necesidades fisiológicas. También se puede observar, que desde el cuarto al sexto día de incubación aproximadamente, se tiene un máximo de concentración de azúcares reductores (180,11 g/L), lo cual nos da un intervalo de tiempo en donde la sacarosa alcanza un mínimo en su concentración, es decir, el hongo ha desdoblado en mayor proporción la sacarosa.

En el cuarto día, empieza un aumento en la concentración de ácido cítrico en el medio (figura 11). Este comportamiento se puede explicar debido a que durante la fermentación, se activa un transportador de glucosa de baja afinidad que participa en el mecanismo por el cual el *A. niger* responde a altas concentraciones extracelulares de glucosa sintetizando y acumulando ácido cítrico (Torres y col, 1996). En este ensayo, el proceso de biosíntesis del ácido cítrico se inicia al cuarto día de incubación (0,147 g/L) aumentando progresivamente su

concentración a ocho días de incubación (0,682 g/L). Caso similar fue reportado por Garibay y col, 2004, en donde el proceso de biosíntesis tiene una duración de 5 a 8 días y adicionalmente menciona que la producción de este compuesto depende de la cepa de *A. niger* a utilizar, así como también su capacidad de adaptación a bajos pH, temperatura, nutrientes y otros factores que afectan el proceso de biosíntesis.

La producción máxima de ácido cítrico en éste medio selectivo con sacarosa como única fuente de carbono, fue de 0,682 g/L (ver figura 11), rendimiento bajo en comparación con lo reportado por Jerneć y col, 1982, que utilizaron un medio químico definido conteniendo: sacarosa (100–140 g/L); NH_4NO_3 (1,5–2,5 g/L) ; KH_2PO_4 (0,25–1,0 g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,25 g/L); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (40.0 mg/L) y $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (6.0 mg/L), determinando un rendimiento de 110 g/L. Otros como Qazi y col 1990, estudiaron la máxima producción de ácido cítrico en medios sintéticos en un estudio piloto (500 L y un tanque fermentador agitado) y determinaron una concentración de ácido cítrico de 60 y 80 g/L respectivamente. Darouneh y col 2009, reportaron concentraciones de ácido cítrico de 60 a 100 g/L en 10 a 20 días de incubación usando medio selectivo con sales y sacarosa como única fuente de carbono.

La Figura 12, muestra que la biomasa producida durante el ensayo tiene una tendencia al crecimiento desde el primer día (3,274 g/L) hasta el quinto día de incubación (73,020 g/L), sin embargo, es difícil identificar las fases de crecimiento del hongo, debido a que se tomaron pocas medidas en éste ensayo.

Los resultados obtenidos del sistema de medio selectivo con sacarosa como única fuente de carbono, nos demuestra que *A. niger*, es capaz de producir ácido cítrico en un medio rico en azúcares y bajas concentraciones de sales minerales. Consecuentemente, se realizaron ensayos bajo las condiciones anteriormente señaladas, para monitorear la producción de ácido cítrico empleando vinaza como sustrato, al variar el pH, porcentaje de dilución de la vinaza, sales y si es necesario suplementar con algún compuesto azucarado.

4.3 Optimización de las condiciones de crecimiento *A. niger* en vinaza.

4.3.1 Pruebas de Viabilidad del hongo *A. niger* a diferentes porcentajes de dilución de vinaza.

Las pruebas efectuadas constataron que el hongo es capaz de crecer frente a la vinaza en un intervalo de porcentajes de dilución. Los resultados de las pruebas de viabilidad se muestran en la figura 13.

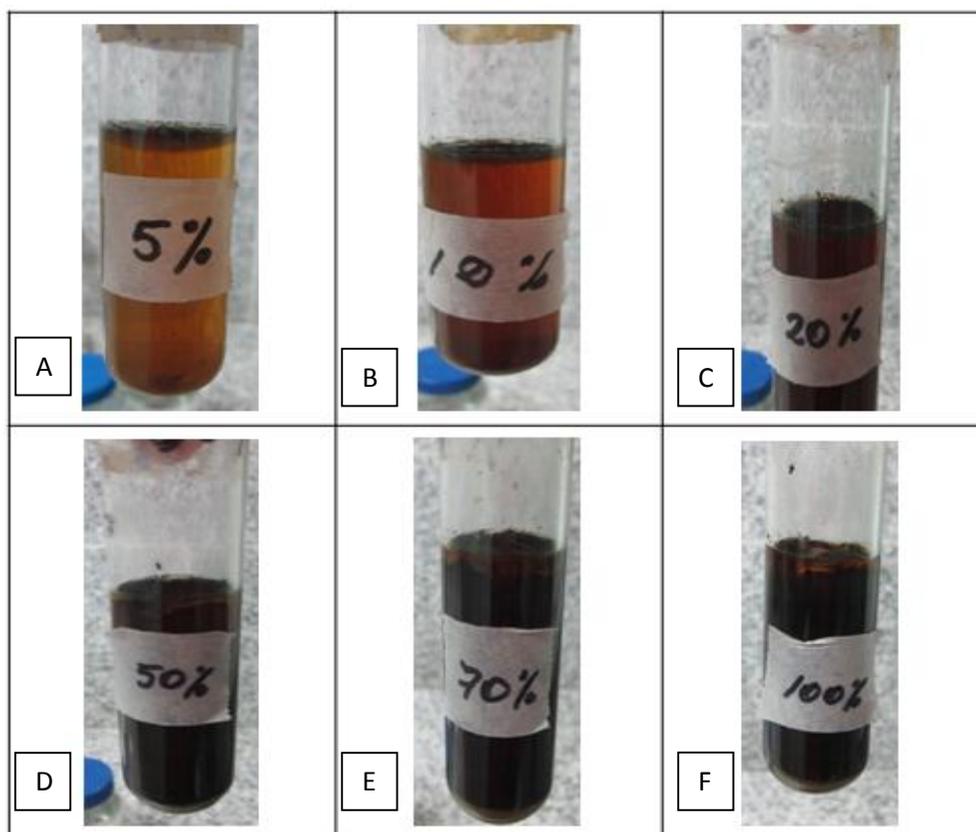


Figura 13. Crecimiento de *A. niger* en Vinaza esterilizada a diferentes porcentajes de dilución (%v/v) A, B, C, D, E y F (5%, 10%, 20 %, 50%, 70% y 100% respectivamente).

Fuente: Pedro Lugo (2016).

Como se puede observar en la figura 13, el hongo es capaz de crecer en cualquiera de los porcentajes de dilución (%v/v) evidenciándose como una capa y coloración oscura en la superficie del líquido; la variación de pH fue mínima oscilando entre 6 a 6,18. Resultado que corrobora lo obtenido por Oliveira y Col, 2012, en donde el *A. niger* pudo crecer en un bio-reactor de lecho empacado, con bagazo de caña e impregnado con vinaza al 80% de humedad y Bastos y Col, 2015, que usaron vinaza y bagazo de caña para la producción de ácido cítrico en un cultivo de estado sólido, empleando *A. niger*.

4.3.2 Crecimiento de *A. niger* en vinaza a diferentes pH.

Tabla 12. Crecimiento de *A. niger* en vinaza a diferentes valores de pH.

pH (pH \pm 0,01) Adim	Crecimiento del Hongo <i>Aspergillus niger</i> en vinaza al 100%
4,10	-
5,02	-
6,13	+

(+) Crecimiento, (-) Sin crecimiento

De los resultados mostrados en la tabla 12, el pH de crecimiento del hongo frente a la vinaza se sitúa en pH = 6, inhibiéndose el crecimiento a pH menores que éste hasta un lapso de 15 días de incubación. El resultado puede ser debido a que el hongo, es un microorganismo ambiental (mas no crecido en vinaza), por consiguiente, no está adaptado a condiciones de pH tan bajos y al tipo de sustrato empleado para este estudio. Caso similar fue reportado por Roukas y Alichanidis, 1988, que demuestran que el pH inicial del crecimiento óptimo del hongo en un medio de cultivo empleando melaza como fuente de carbono, fue de 6,5. Shetty y col, 2006, menciona que el pH inicial de crecimiento depende del medio utilizado, para medios selectivos que contiene agua destilada, sales y azúcares como fuente de carbono, el pH se encuentra en un intervalo de 2,5 a 3,5; mientras que en el caso de los medios con melazas, el pH inicial es aproximadamente neutro o ligeramente ácido. Adicionalmente, el crecimiento va a depender del tipo de hongo a utilizar, y de las condiciones del medio.

En el caso de cepas fúngicas, Garassini 1964, reporta que se puede obtener mayor cantidad de ácido cítrico si se comienza el desarrollo de la cepa a pH menores de 4; para otros investigadores como Doelger y col, 1934, el pH más indicado oscila en un intervalo de 1,6 a 2,2. Sin embargo, por las características fisicoquímicas de la vinaza empleada en este estudio (variabilidad en el pH, DQO, DBO₅días,20°C, contenido de azúcares y sales) y el tipo de cepa del hongo, es posible que se generen bajos rendimientos con respecto a los reportados por la literatura.

4.3.3 Producción de ácido cítrico empleando *A. niger* en vinaza como sustrato.

Para la realización de este ensayo se suplementó la vinaza con sales minerales, que tradicionalmente se utilizan para la producción de ácido cítrico, las cuales se detallaron en la tabla 3 del apartado 4.4.1. Los resultados se representan en las figuras: 14., 15., 16 y 17. Para mayor información dirigirse al apéndice A.

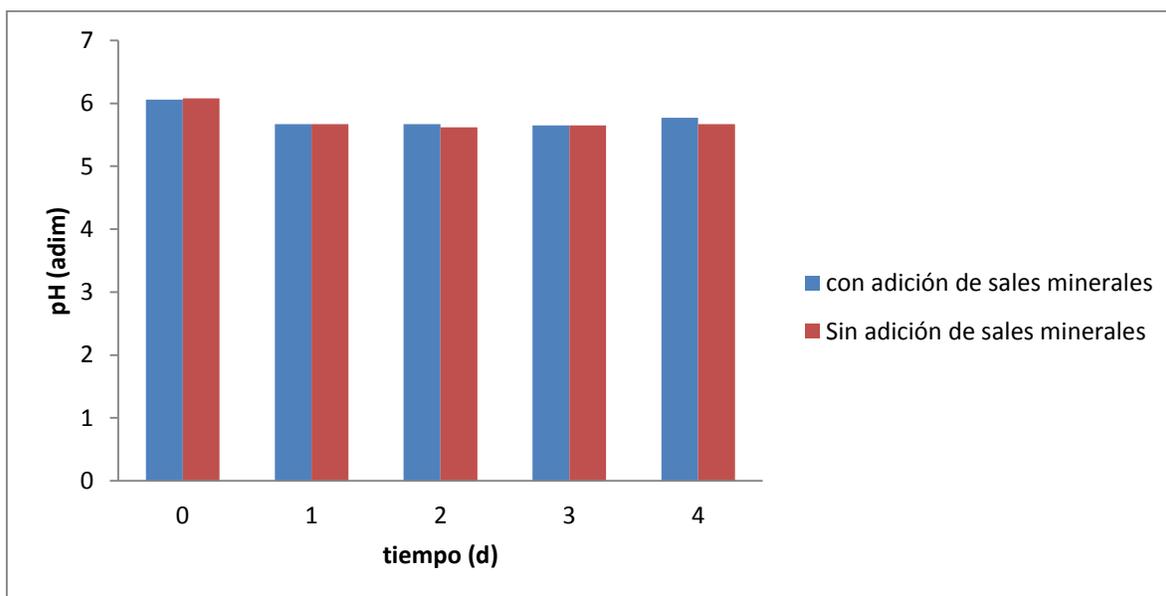


Figura 14. Variación de pH en fermentación con vinaza como sustrato, empleando *A. niger*.

Fuente: Pedro Lugo (2015).

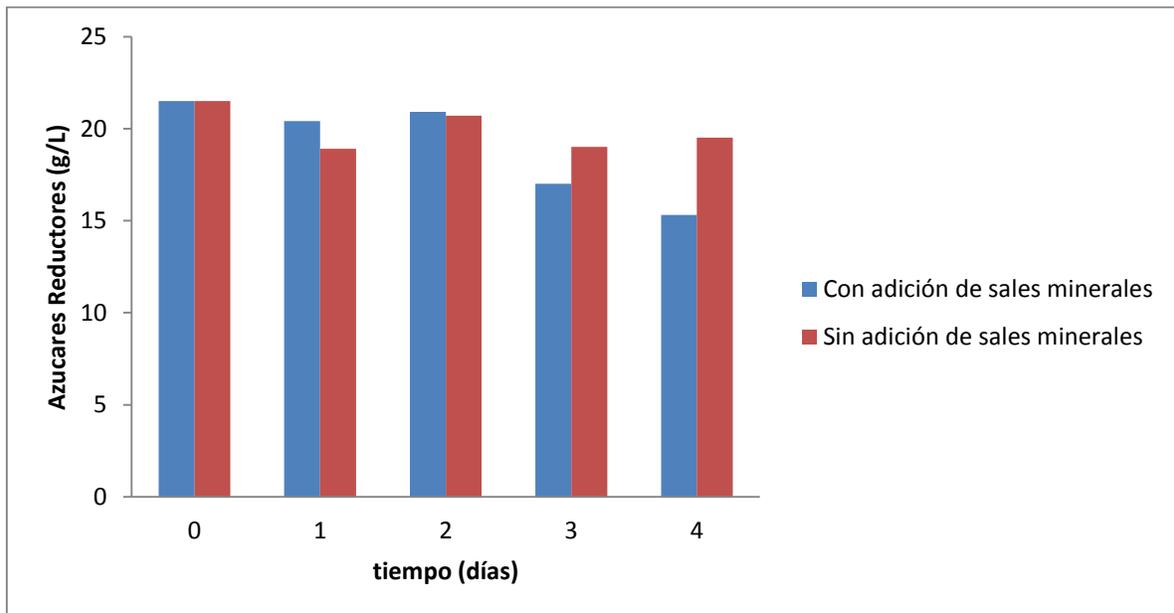


Figura 15. Variación de la concentración de Azucares Reductores en fermentación con vinaza como sustrato, empleando *A. niger*.

Fuente: Pedro Lugo (2015).

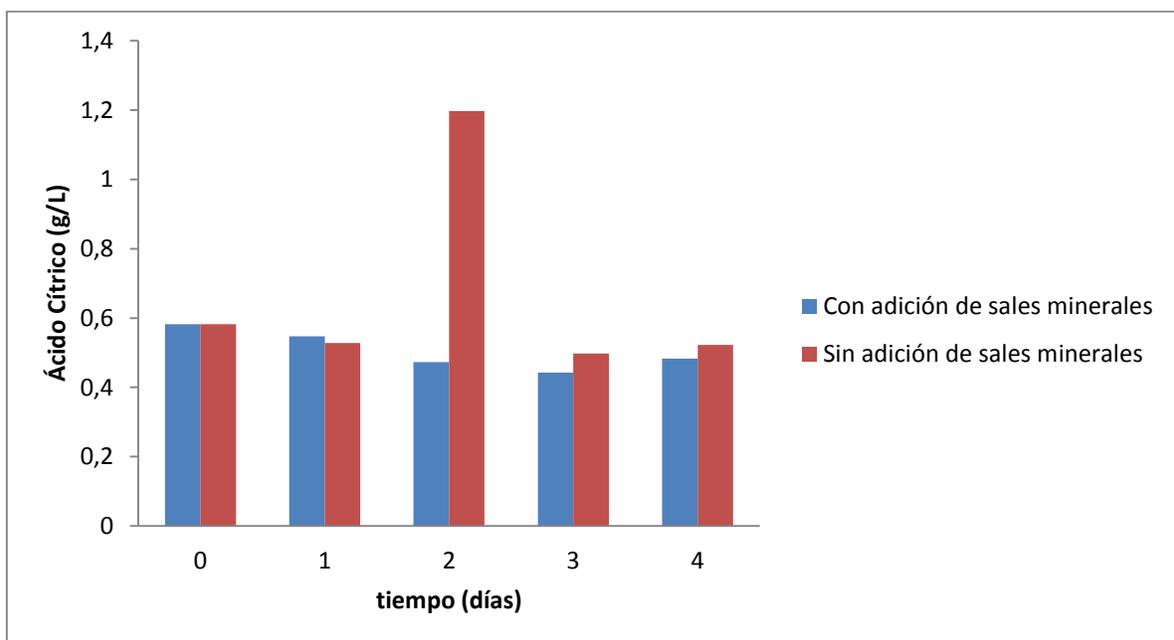


Figura 16. Variación de la concentración de ácido cítrico en fermentación con vinaza como sustrato, empleando *A. niger*.

Fuente: Pedro Lugo (2015).

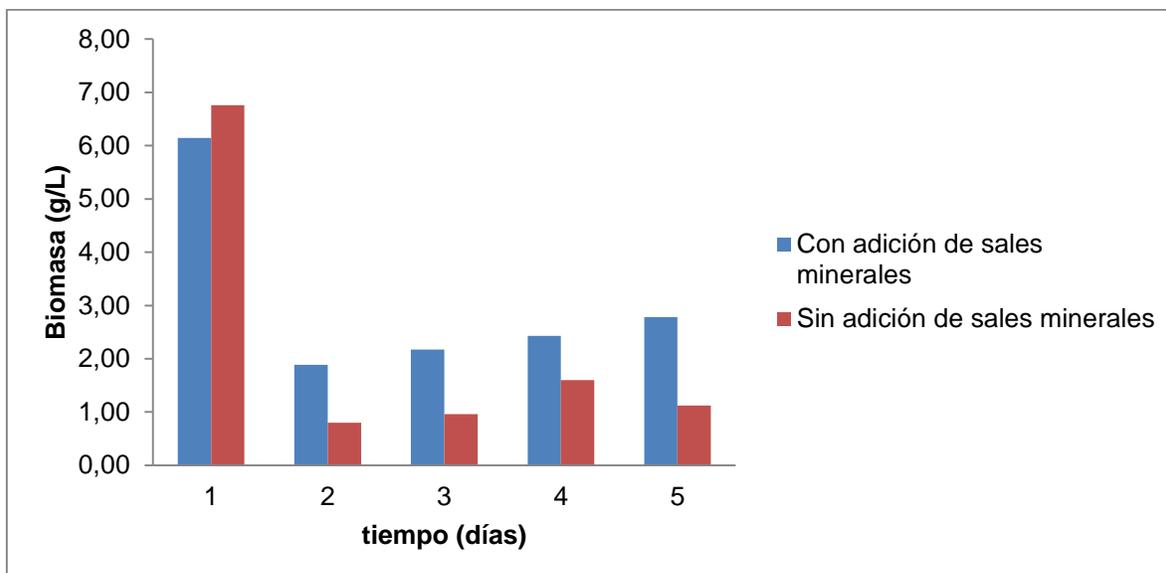


Figura 17. Variación de la Biomasa en fermentación con vinaza como sustrato, empleando *A. niger*.

Fuente: Pedro Lugo (2015).

En la figura 14, muestra una disminución del pH más acentuada en el sistema donde no se adicionó nutrientes y sales minerales, desde pH = 6,08 a tiempo 0 días de incubación, hasta pH=5,67 al cuarto día de incubación. En comparación al sistema con adición de los mismos, el cual fue de: pH = 6,06 a tiempo 0 días de incubación, hasta pH=5,77 al cuarto día de incubación. Estos resultados van en concordancia con la figura 16, el cual arroja valores de ácido cítrico mayores en el sistema sin adición de sales minerales (1,197 g/L) que el sistema sin adición de los mismos.

La figura 15, muestra un mayor consumo de azúcares reductores en el sistema de adición de sales minerales, desde inicio de la biosíntesis (tiempo 0) de 21,15 g/L a 15,31 g/L al cuarto día de incubación. En comparación al sistema sin adición de sales minerales el cual fue de 21,51 g/L a 0 días de incubación hasta 19,51 g/L al cuarto día de incubación. Dichos resultados son coherentes con la producción de biomasa (figura 17), ya que, a mayor contenido de nutrientes y sales en el medio de cultivo, el hongo crece y metaboliza la fuente de carbono con

una producción mínima o casi nula de ácido cítrico. Esto concuerda con Garassini, 1964 y Garibay y col, 2004 en donde una restricción de nutrientes tiende a aumentar la producción de ácido cítrico

En las figuras 16 y 17 la fermentación con vinaza sin adición de sales minerales, presentó una máxima producción de ácido cítrico (1,197 g/L) al segundo día de incubación y una baja concentración de biomasa (0,80g/L) respectivamente. Adicionalmente se puede observar, que en el sistema con adición de sales minerales, el ácido cítrico disminuyó desde 0,582 (0 días) a 0,482 g/L (cuatro días de incubación) respectivamente, lo cual concuerda con Garassini, 1964, en donde indica que, los medios muy ricos en nitrógeno y fosfato, producen disminución de ácido cítrico, debido a un gran desarrollo micelial, formando gruesas capas que impiden la buena aireación del medio, bajo rendimiento y el hongo solo utiliza la fuente carbonada para fines de crecimiento. El sistema sin adicionar sales minerales, podría representar una ventaja, ya que, se aprovechan las sustancias propias de la vinaza para el proceso de fermentación. Sin embargo, la concentración de ácido cítrico disminuye a los días subsiguientes, esto puede ser debido a diferentes hipótesis como:

- 1.- La vinaza no se sometió a ningún tratamiento previo para eliminación de metales, como por ejemplo el Fe^{2+} el cual, es un cofactor de la enzima acotinasa durante el proceso de producción de ácido cítrico (Stryer L., 1985). El ión ferroso forma un quelato con el citrato para convertirlo en ácido isocítrico y posteriormente sufrir descarboxilación oxidativa, por lo que puede ser que la concentración de éste ión en el medio, todavía sea alta y este disminuyendo el rendimiento de la reacción. Concordancia

2.- El destino del ácido cítrico en el medio es desconocido y es posible que pueda estar siendo sometido a metabolización por parte del *A. niger* y así disminuir su concentración en el medio.

3.- La cepa de *A. niger* no se sometió a una etapa de aclimatación frente al sustrato que se quería fermentar, ya que, el hongo fue pre-crecido en agar Sabouraud, y luego se transfirió al medio, es decir, el hongo se cultivó inicialmente en un medio con todas las condiciones ambientales para su buen desarrollo a otro donde no hay tales condiciones o no es su ambiente natural. La aclimatación de un microorganismo a un medio extraño o complejo es importante, ya que, le da al microorganismo, tiempo para que pueda detectar las nuevas condiciones ambientales del medio y así pueda adaptar eficientemente su maquinaria enzimática para utilizar los nutrientes del nuevo medio de cultivo.

4.- La estimación de la concentración de ácido cítrico se realizó siguiendo la metodología de Saffran-Denstedt, 1948, midiendo por espectrofotometría a una longitud de onda de 400-420 nm, región del espectro electromagnético correspondiente al amarillo y la vinaza posee un color marrón por lo que puede estar interfiriendo en las mediciones. Adicionalmente, el contenido de proteínas y otros compuestos carbonados en la vinaza, cuya presencia es sugerida debido a que de los bio-reactores emanaban olores desagradables, provenientes e indicativos de aminas (particularmente aminas biógenas) que usualmente son de tonos amarillos y podrían inducir a cálculos erróneos. Para la eliminación de éste tipo de interferencias se debe agregar ácido tricloroacético al 5% v/v. (Saffran y Denstedt, 1948).

La producción de ácido cítrico empleando vinaza como sustrato fue de 1,1997 g/L, valor bajo respecto a los rendimientos reportados con otras fuentes

carbonadas, como por ejemplo la melaza, donde se reportan valores cercanos a 100 g/L (Sikander y col, 2002). No obstante, es importante indicar que los rendimientos en la producción de éste metabolito, depende de la cepa a utilizar, del medio a fermentar y de otros factores ya indicados anteriormente.

4.3.4 Producción de ácido cítrico, a diferentes porcentajes de dilución (%v/v) de vinaza, suplementada con sacarosa y empleando *A. niger*.

Visto los resultados de baja producción de ácido cítrico en vinaza a 100%v/v, e intentando mejorar la productividad, se decidió, adicionar sacarosa a diferentes porcentajes de dilución de vinaza.

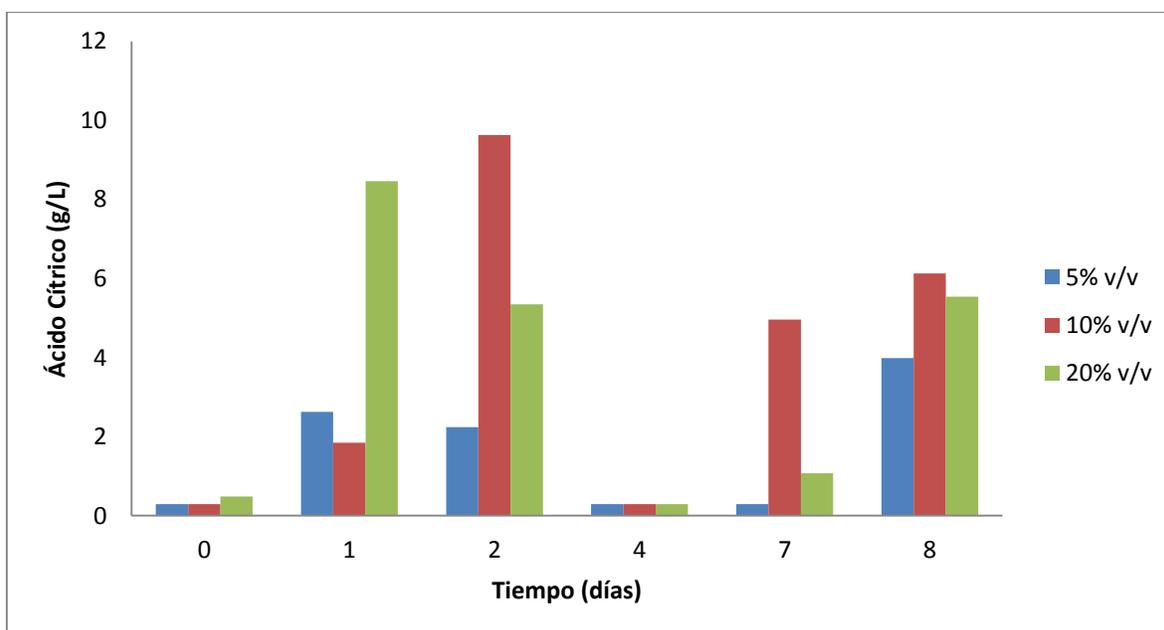


Figura 18. Producción de ácido cítrico, empleando *A. niger*, a diferentes porcentajes de dilución (%v/v) de vinaza, suplementada con Sacarosa.

Fuente: Ing. Pedro Lugo (2016).

La figura 18, muestra que la producción de ácido cítrico alcanzó, a los 2 días de incubación, 9,627 g/L, en vinaza al 10% v/v , con valores de 5,348 g/L y 2,36 g/L para diluciones de vinaza del 20 y 5 %v/v respectivamente.

La disminución en la producción de ácido cítrico a diluciones de vinaza mayores del 10% v/v, podría ser justificado, por altos niveles de compuestos de tipo proteína u otros ácidos orgánicos, que pueden estar interfiriendo en el método empleado para la detección de éste metabolito (Saffran y Denstedt, 1948). Otra hipótesis que podría justificar los bajos rendimientos en la producción de ácido cítrico, es que en el presente trabajo no se tomó en cuenta el tiempo de mantenimiento (repiques de la cepa) en agar Sabouraud de *A. niger*, lo cual concuerda, con autores como: Doelger y Prescott, 1934., quienes realizaron siembras de *A. niger* durante 8 meses seguidos, resultando un aumento general en la acidez total a medida que se efectuaban las nuevas siembras.

Adicionalmente, la disminución puede justificarse debido a que, el hongo al estar en un ambiente mucho más extremo (20%v/v), tienda a producir ácido cítrico de una forma más rápida, metabolizándolo para sus necesidades fisiológicas, lo cual genera una disminución en la concentración de ácido cítrico. Dichos resultados concuerdan con estudios realizados por (Papagianni, 2007), donde se explica que la mayor parte de los microorganismos nativos productores de ácido cítrico, no son capaces de producir rendimientos comercialmente aceptables debido al hecho de que el ácido cítrico es un metabolito que eleva su acumulación en cantidades apreciables solamente en condiciones de desequilibrios drásticas y que al realizar cambios en su fisiología cambia la cinética de producción de ácido cítrico. Otra hipótesis podría ser que a una mayor concentración de vinaza (20%v/v), existan una mayor cantidad de sustancias, compuestos o elementos inhibitorios para la biosíntesis de ácido cítrico.

Por otro lado la producción de ácido cítrico en un medio selectivo con sacarosa como única fuente de carbono, fue de 0,625 g/L (figura 10), con vinaza sin adicionar sales minerales, el valor fue de 1,197 g/L (figura 16), mientras que, con vinaza al 10%v/v suplementada con sacarosa, el valor fue de 9,627 g/L (figura 18), lo cual hace pensar que los constituyentes de la vinaza pueden estar estimulando la producción de ácido cítrico.

La baja producción de ácido cítrico en vinaza al 5% v/v (para mayor información, dirigirse a la Tabla 32 del apéndice A), puede ser debida a varias hipótesis como:

1.- El *A. niger* no cuenta con los nutrientes y sales necesarias o no se encuentra de forma disponible para el hongo y así no pueda desarrollarse de una forma adecuada y necesariamente la expulsión de ácido decrece, lo que provoca un consumo del ácido o una acumulación para su posterior expulsión al medio. Varios investigadores (Wells y Herrick, 1938), han encontrado que las cantidades límites de nutrientes y sales son: 0,03 a 0,1% de KH_2PO_4 , de 0,01 a 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y de 0,16 a 0,32% de NH_4NO_2 , sin embargo la cepa empleada tiene una gran influencia sobre los nutrientes y sales requeridas.

2.- Una menor cantidad de metales trazas necesarios para la biosíntesis de ácido cítrico para satisfacer las necesidades de la cepa de *A. niger*. Varios investigadores (Pertman y col, 1946) han llegado a la conclusión, de que la concentración óptima de cada ión metálico para estimular la producción de ácido cítrico, varia con la cepa de *A. niger* usada.

4.3.5 Producción de Ácido Cítrico empleando *A. niger*, en vinaza a diferentes porcentajes de dilución, pre-tratada con *Penicillium* sp.

Con la finalidad de disminuir la concentración de fenoles presentes en la vinaza, ya que son bactericidas y fungicidas, se realizó un pre-tratamiento biológico utilizando *Penicillium* sp., el cual es un hongo degradador de éstos compuestos (fenoles) y de ésta manera evitar tratamientos físico-químicos, los cuales generan otros residuos y desechos altamente contaminantes.

El porcentaje de remoción de la concentración de fenoles fue de 46,61% (Mayor porcentaje de remoción en comparación a los otros microorganismos suministrados) al realizar el pre-tratamiento biológico a la vinaza, empleando *Penicillium* sp. Para mayor información, dirigirse a las tablas 39, 41, 43, 44, 46 y 48 y figuras 29, 30, 31, 32, 33, 34 y 35 del apéndice A.

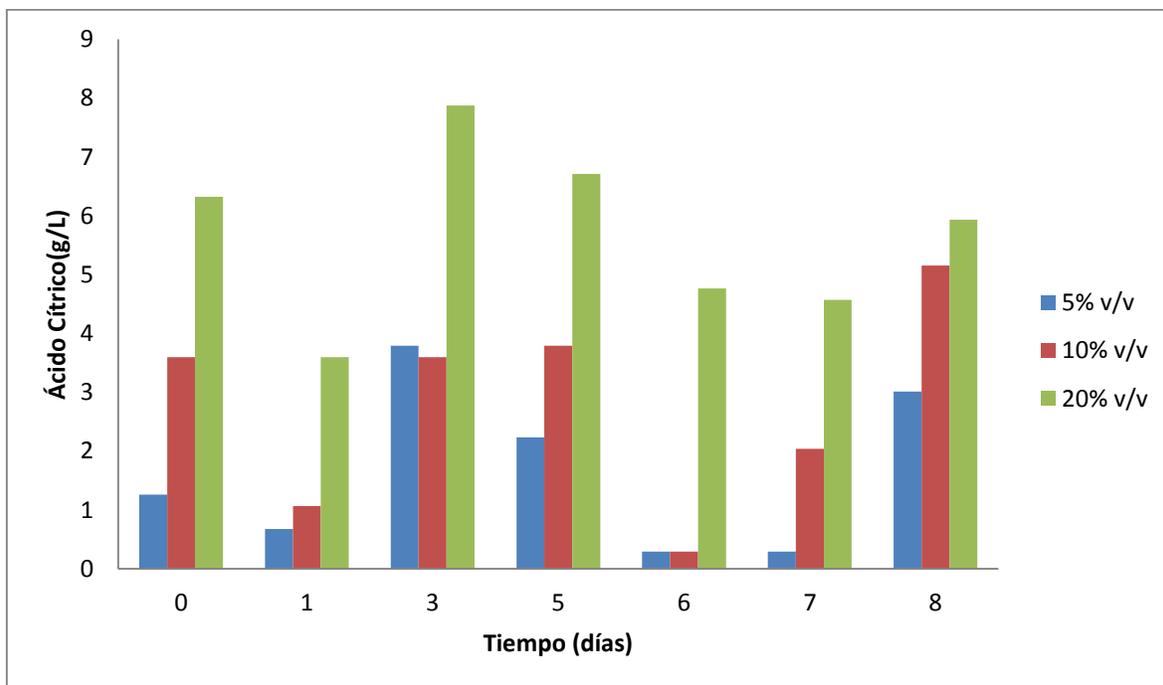


Figura 19. Variación de la producción de ácido cítrico, empleando *A. niger*, a diferentes porcentajes de dilución de vinaza (%v/v) pre-tratadas con *Penicillium* sp.

Fuente: Pedro Lugo (2016).

En la figura 19 se puede observar, que la producción máxima de ácido cítrico fue de 7,877 g/L en vinaza pre-tratada biológicamente al 20%v/v, a tres días de incubación. En los porcentajes de dilución del 5 y 10%v/v fueron: 3,792 g/L y 5,154 g/L a los 3 días y 8 días de incubación respectivamente. Todos éstos valores menores que el obtenido en diluciones de vinaza sin pre-tratamiento biológico al 10 y 20 %v/v, los cuales fueron de 9,336 g/L y 7,974 g/L respectivamente (ver figura 18).

Por lo cual, la producción de ácido cítrico disminuye ligeramente cuando se aplica el pre-tratamiento con *Penicillium* sp.. La posible justificación del descenso en la producción del ácido cítrico es que, el *Penicillium* sp., podría utilizar y por lo tanto disminuir la concentración de moléculas carbonadas entre ellos los fenoles, el medio se hace menos estresante y el *A. niger* bajo estas nuevas circunstancias,

tiene la posibilidad de utilizar en mayor proporción los azúcares disponibles para sustentar sus necesidades metabólicas y división celular, lo cual provoca una disminución en el porcentaje de azúcar disponible para sintetizar el ácido cítrico.

4.3.6 Producción de Ácido Cítrico empleando *A. niger*, en vinaza a diferentes porcentajes de dilución, con tratamiento y sin tratamiento biológico y suplementada con sacarosa.

Dicho análisis tiene como finalidad evidenciar en que tiempo *A. niger*, excreta una mayor cantidad de ácido cítrico, variando las propiedades de la vinaza usada como sustrato. Los resultados se muestran en la figura 22.

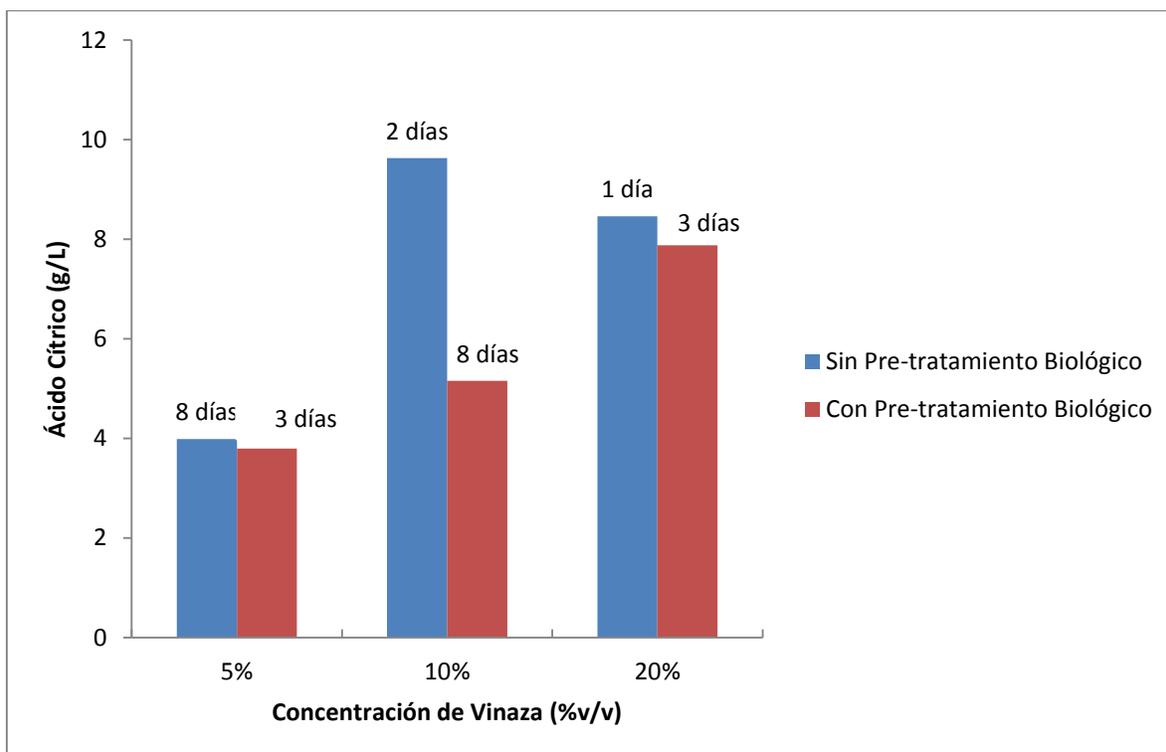


Figura 20. Producción de ácido cítrico, empleando *A. niger*, con vinaza a diferentes porcentajes de dilución (%v/v), suplementada con sacarosa.
Fuente: Ing. Pedro Lugo (2016).

La figura 20 resume la producción de ácido cítrico a diferentes porcentajes de dilución de vinaza (%v/v), a diferentes días de incubación, sin y con pre-tratamiento biológico. Se observa que en vinaza al 10% v/v sin pre-tratar biológicamente, la producción de ácido cítrico fue máxima (9,627 g/L) al segundo día de incubación. En el sistema pre-tratado se obtuvo 5,154 g/L al octavo día, estableciéndose una diferencia de 4,48 g/L (9,627 – 5,154 g/L) entre ambos sistemas; es importante señalar que el sistema sin pre-tratamiento alcanzó su máximo a los 2 días, mientras que el sistema pre-tratado lo hizo en 8 días. A diluciones del 20%, la diferencia entre los dos sistemas fue de 0,58 g/L (8,46 – 7,87 g/L a los 1 y 3 días respectivamente) y al 5% de dilución la diferencia fue de 0,195 g/L (3,987 – 3,792 g/L) a los 8 días de incubación.

La tabla 56 (apéndice A), muestran mayor detalle de los resultados obtenidos en la producción de ácido cítrico en los sistemas con tratamiento y sin tratamiento biológico.

Se escoge el porcentaje de dilución de vinaza al 10% v/v sin pre-tratamiento biológico, suplementada con sacarosa, debido a que es en ésta, donde hubo mayor concentración de ácido cítrico a menor tiempo (2 días de incubación), además que concentraciones mayores de 10% v/v, pueden interferir generando errores en la determinación de éste ácido, utilizando el método Safran-Denstedt, 1948, como fue indicado anteriormente. Adicionalmente, en el sistema sin pre-tratamiento, en altas concentraciones de fenoles, *A. niger* se encuentra sometido a situaciones estresantes, lo que probablemente impide una máxima capacidad de división celular, consumiendo menos glucosa para tales propósitos, por lo tanto hay mayor cantidad de azúcares para sintetizar el ácido cítrico.

4.4. Estimación de la producción de ácido cítrico bajo las condiciones de máximo crecimiento de *A. niger*.

Una vez obtenida las mejores condiciones para el crecimiento y obtención de ácido cítrico con vinaza, se realizó el ensayo con la finalidad de estudiarlo a un intervalo de tiempo mayor. Los resultados se muestran a continuación:

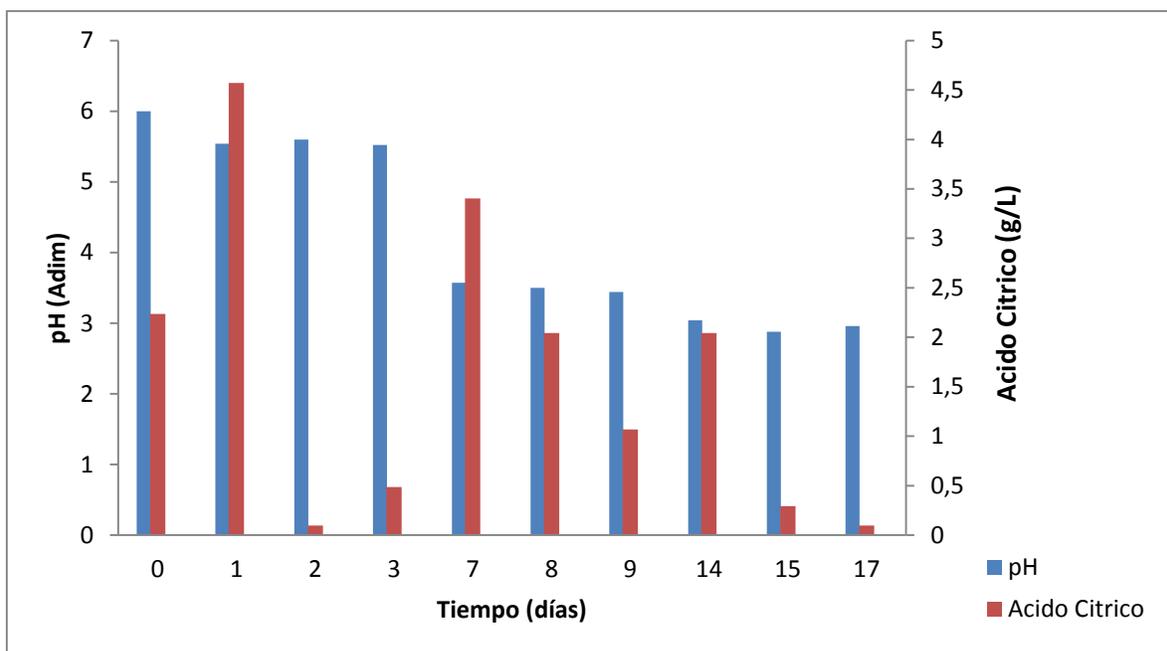


Figura 21. Variación del pH y ácido cítrico durante la fermentación, empleando *A. niger*, con vinaza al 10% v/v sin pre-tratamiento biológico.

Fuente: Pedro Lugo (2016).

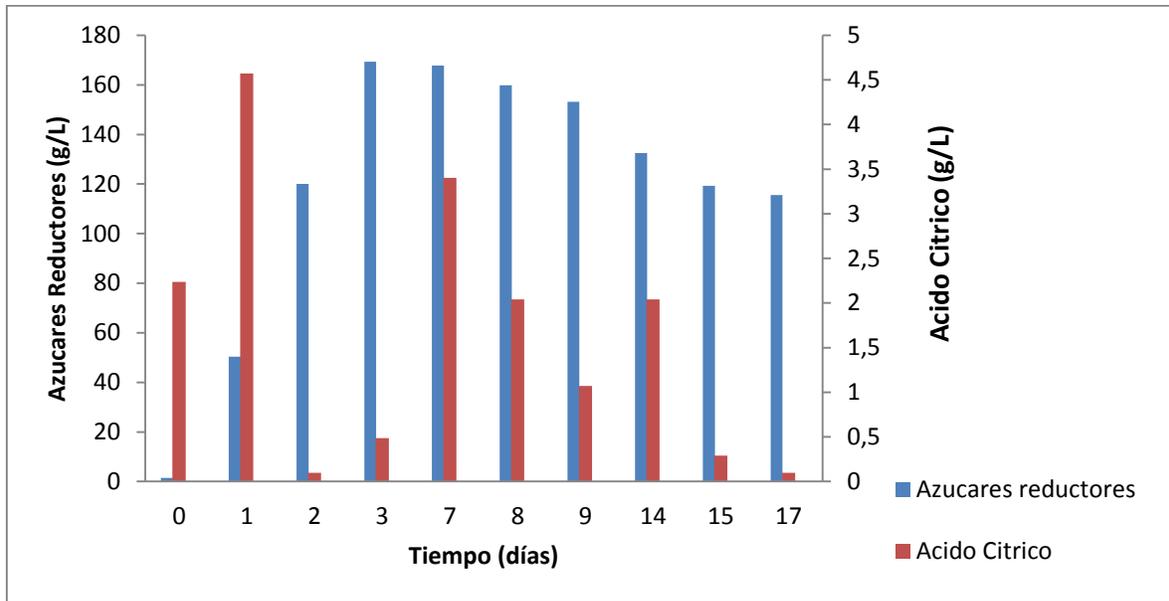


Figura 22. Variación de la concentración de los azúcares reductores y ácido cítrico durante la fermentación, empleando *A. niger*, con vinaza al 10% v/v sin pre-tratamiento biológico.

Fuente: Pedro Lugo (2016).

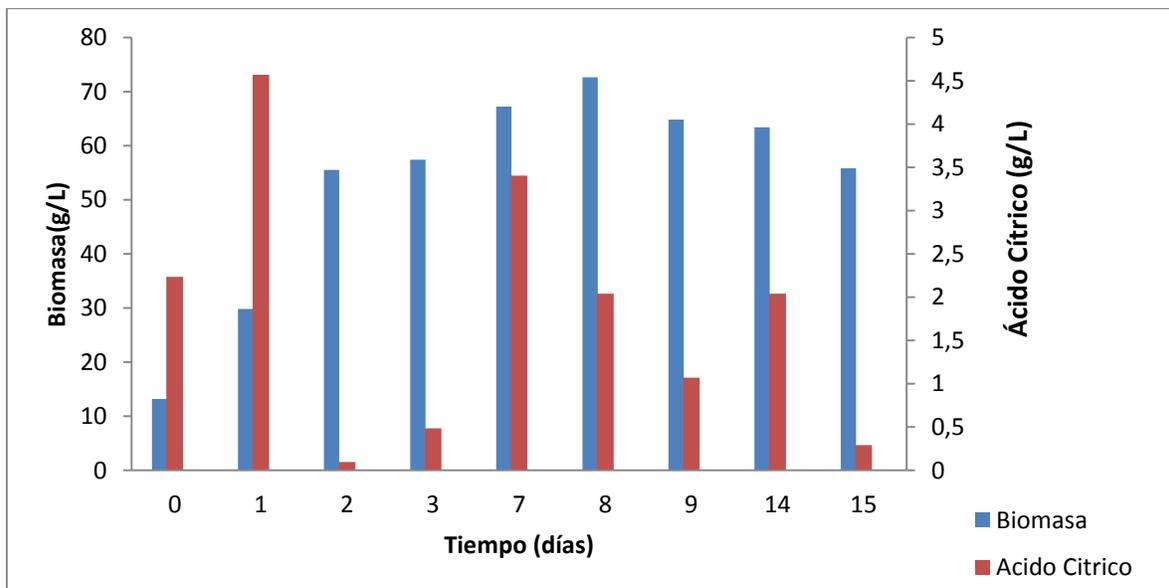


Figura 23. Variación de la concentración de Biomasa y ácido cítrico durante la fermentación, empleando *A. niger*, con vinaza al 10% v/v sin pre-tratamiento biológico.

Fuente: Pedro Lugo (2016).

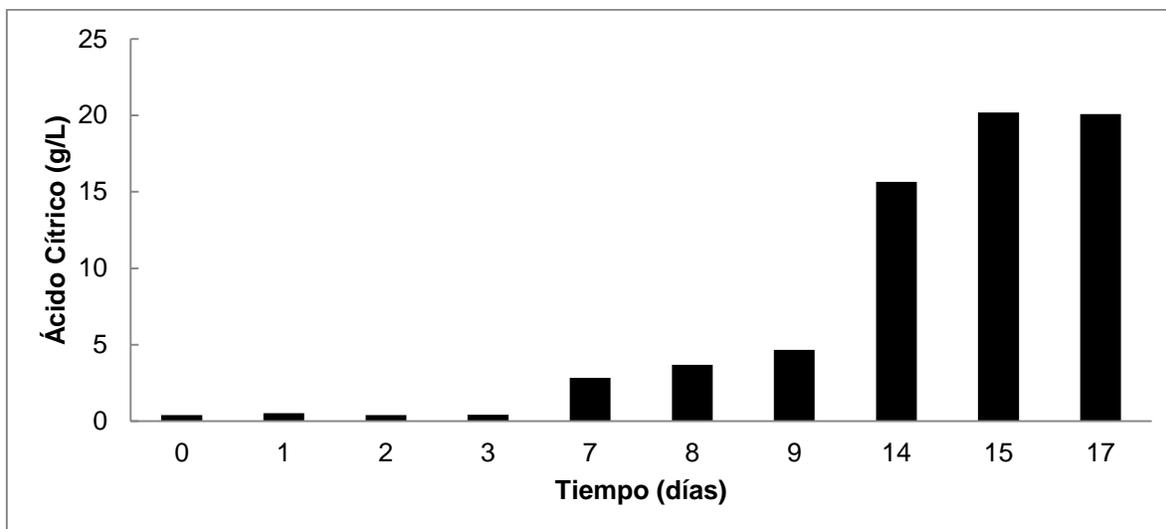


Figura 24. Variación en la concentración del ácido cítrico por método de acidez titulable durante la fermentación, empleando *A. niger*, con vinaza al 10% v/v sin pre-tratamiento biológico.

Fuente: Pedro Lugo (2016)

La figura 21, muestra una disminución de pH que se estabiliza a partir del quinto día de incubación, la cual se ubicó en el intervalo de pH de 3-4. Esto va en concordancia con la Hidrolisis de la Sacarosa por enzimas invertasas de *A. niger* y su posterior metabolización, debido a la producción de otros ácidos como: Glutámico y otros ácidos tricarbóxicos durante el ciclo de Krebs, así como también compuestos carbonados hasta llegar a CO₂ el cual a su vez forma ácido carbónico (H₂CO₃). Algunos autores (Singh y Pandey, 2009) han descrito que la expulsión de ácidos como: glucónico, oxálico, isocítrico durante el proceso de biosíntesis de ácido cítrico, puede ser inhibido por cepas mutantes de *A. niger*.

En la figura 22, muestra una máxima concentración de azúcares reductores (169,31 g/L) al tercer día de incubación en conjunto a una concentración máxima de ácido cítrico de 4,57 g/L a 1 día de incubación, esto difiere de algunos autores que han reportado producción de ácido cítrico de $99,56 \pm 3,5$ g/L empleando mieles de caña, con *Aspergillus niger* GCBT7 (Majumder y col, 2010). Por otro lado, Rivada, 2008, demostró, en un medio con melaza de remolacha y sacarosa

al 50%, que por cada 10 g/L de sacarosa en melaza, se obtiene una producción de ácido cítrico de 4 g/L. Los bajos rendimientos obtenidos, pueden deberse a muchos factores, entre los cuales pueden citarse:

1.- Altas concentraciones de azúcares en el medio que inhiben la excreción de ácido cítrico al medio de cultivo, debido a que la actividad del agua disminuye y ocurre en conjunto una plasmólisis del hongo, lo cual provocan una disminución de producción de ácido cítrico (Roukas y Liakopoulou,2002). Otras investigaciones enfatizan que a concentraciones iniciales de azúcares superiores al 20% conlleva una baja utilización de azúcar, por ende bajos rendimientos y el proceso se hace no-económico (Kapoor y col, 1983; Roukas, T., 1998; Roukas y Liakopoulou, 2002)

2.- La pre-siembra del hongo también es un factor que influye en la producción de ácido cítrico. En ésta investigación el *A. niger* se sembró en agar Sabouraud en placas Petri, mas no en un cultivo combinando cierta cantidad de azúcar conocida y de baja concentración. Se ha reportado que la siembra de *A. niger* a 1% p/v en azúcar y luego la transferencia del cultivo a una nueva concentración de 14% p/v de varios tipos de azúcares (sacarosa, maltosa, glucosa, manosa y fructosa) inducen a la acumulación de ácido cítrico (Shetty y col, 2006).

3.- Otra de las razones puede ser el tipo de azúcar utilizado, investigadores (Xu y col, 1989) encontraron que la sacarosa y la maltosa fueron las mejores fuentes de carbono, para la producción de ácido cítrico por *A. niger*. Otros investigadores (Hossain y col. 1984) señalan que la producción de ácido cítrico por *A. niger* se favorece con sacarosa como fuente de carbono, seguida de glucosa y fructosa y por último la lactosa.

4.- Los metales trazas, los cuales juegan un rol significativo en el proceso de biosíntesis. Se han encontrado que altas concentraciones de metales trazas (>5 mg/L) disminuye la concentración de ácido cítrico, mientras que bajas concentraciones (1mg/L) mejoran la producción del ácido (Perlman y Sih, 1960), (Clark y col, 1965), (Haq y col, 2002). Otros investigadores (Kubicek y Rohr, 1977) reportaron que altas concentraciones de manganeso, tenían una fuerte influencia negativa en el proceso de biosíntesis, resultando en incrementos del crecimiento celular, disminución en el consumo de azúcar y una disminución drástica en la acidogénesis. Contrariamente, una deficiencia de manganeso en el medio trae como consecuencia una alta producción de ácido cítrico, debido a que el mismo hace disminuir la actividad de enzimas involucradas en el ciclo de Krebs, con excepción de citrato sintasa, enzima responsable de la producción de ácido cítrico.

5.- La mayor producción de ácido cítrico fue al día 1, lo cual difiere de los ensayos anteriormente realizados, en donde, el hongo produce ácido cítrico el día 2 con vinaza al 10% v/v, sin pre-tratar. Esto podría deberse a que como no se realizó un control estricto de las condiciones de incubación de *A. niger*, el mismo se encuentra un poco más activo para la producción de éste metabolito. Es importante indicar que *A. niger* fue resembrado cada mes, a temperatura ambiente y en agar Sabouraud, además de un tiempo de incubación de 8 a 20 días para su maduración. Por lo que es de vital importancia, controlar la cantidad y calidad de inóculo utilizado. Se ha reportado que al realizar siembras de cepas de *A. niger* durante 8 meses seguidos, se induce un aumento general en la acidez total a medida que se efectúan las nuevas siembras (Doelger y Prescott, 1934).

6.- Debido a la composición tan variada de la vinaza, es posible la existencia de algunas sustancias o compuestos inhibitorios para la buena producción de ácido cítrico. Algunos investigadores (Hossain y col, 1985) indican que la presencia de galactosa causa inhibición en la producción de ácido cítrico

además que reduce el consumo de glucosa, ya que, interfiere en la represión de la enzima 2-oxoglutarato deshidrogenasa, enzima clave para la acumulación de ácido cítrico. Agrawal y col, 1983; han reportado que la adición de algunos inhibidores tales como fluoruro de calcio, fluoruro de sodio, fluoruro de potasio, peróxido de hidrógeno, naftaquinona, azul de metileno, malonato de sodio, ferricianuro de potasio, acetato de yodo, azida de sodio, y arseniato de sodio a los diferentes medios, disminuyeron en un 30-40% la concentración de ácido cítrico producidos en los medios fermentativos.

7.- Otro factor que podría estar influenciando, es la temperatura. El ensayo se realizó a temperatura ambiente, aunque generalmente la temperatura oscila entre 25°C a 35°C. Para algunos investigadores (Doeger y Prescott, 1938), el intervalo de temperatura óptima es de 26°C a 28°C, a 30°C o más, disminuye la producción de ácido cítrico, aunque aumenta la acidez total por formación de ácido oxálico.

8.- Otro de los factores que pueden estar influenciando en el proceso de fermentación, es la aireación del medio, la cual no se regularizó adecuadamente, debido a interferencias en el suministro de energía eléctrica, lo cual interfirieron en la calidad y toma de las muestras. En general el porcentaje de oxígeno disuelto debe ser entre 25-30% (Shetty y col, 2006).

La figura 23, se muestra que el hongo experimenta su máximo crecimiento, a los 8 días de incubación. La fase estacionaria dura aproximadamente de 8 a 14 días, por lo tanto debería de producirse la mayor concentración de ácido cítrico en éste intervalo de tiempo, lo cual lo cual no ocurre, porque hay una disminución en la concentración de ácido cítrico de 3,403 a 0,291 g/L. Estos resultados difieren de algunas referencias (Sikander y col, 2002), en donde la producción de ácido cítrico

alcanza una alta concentración al comienzo de la fase estacionaria, cuando se usa melaza como fuente de carbono.

La figura 24, es un complemento en la estimación de la producción de ácido cítrico. Se puede observar que la producción de ácido cítrico va en aumento hasta el final del periodo del ensayo, sin embargo, éstas medidas de ácido cítrico por el método de acidez titulable, no son del todo exactas, ya que no se garantiza que la producción de acidez en el medio sea exclusivamente por parte del ácido cítrico y como se indicó anteriormente, el *A. niger* puede producir otros ácidos además del cítrico, por lo que ésta estimación podría generar valores erróneos, en comparación con el método colorimétrico de Saffran-Denstedt, 1948.

Es necesario realizar un estudio más exhaustivo acerca de la fermentación de ácido cítrico empleando *A. niger*. En lo referente a enzimas responsables del proceso, es necesario conocer cuáles están siendo activadas y realizar modificaciones genéticas para aumentar el rendimiento de la producción de ácido cítrico. Se han realizado estudios (Álvarez y col, 2000) conducentes a la optimización de tal proceso fermentativo en *A. niger*. Los resultados mostraron que se necesita un mínimo de 13 enzimas responsables para la biosíntesis del ácido.

Visto todos los análisis realizados, es obvio que muchos factores deben ser estudiados para obtener un mejor panorama acerca del proceso de obtención de ácido cítrico empleando vinaza como sustrato y *A. niger* como elemento fermentativo.

Análisis Ambiental del uso de vinaza para la producción de ácido cítrico, empleando *A. niger*.

Muchas preocupaciones ambientales sobre la vinaza han sido objeto de investigaciones, debido al volumen producido por el proceso fermentativo y sus características físico-químicas, de allí, la reacción social en relación con la regulación de su eliminación y aplicaciones. Los marcos reguladores en todo el mundo han evolucionado a lo largo de los años y las disposiciones más detalladas son las de los Estados Unidos y Brasil, por ser los principales países productores de etanol y por consiguiente los más altos generadores de vinaza.

Una alternativa de uso para la vinaza, es el de la fertirrigación, en donde la vinaza contribuye principalmente al suministro de agua y funciona como un acondicionador del suelo debido a su contenido de materia orgánica y minerales. En general, la aplicación de la vinaza produce cambios físicos, químicos y microbiológicos en el suelo, debido principalmente a la influencia de la materia orgánica, lo que modifica la formación de conglomerados de agregados del suelo, la aireación, la percolación, y la retención de nutrientes.

Visto los resultados obtenidos en éste estudio, se pueden tener en cuenta el uso o la aplicación de la vinaza para tres aspectos importantes, que se enumeran a continuación:

1.-Aplicación de la vinaza como fuente de crecimiento de microorganismos.

El *A. niger*, puede adaptarse a cualquiera de los porcentajes de dilución de la vinaza, lo cual lo hace atractivo desde el punto de vista comercial, ya que se puede aprovechar los altos volúmenes de vinaza, bajo costo y su alto contenido de macronutrientes y micronutrientes, incluyendo una gran variedad de ácidos orgánicos, para la producción de ácidos orgánicos como el ácido glucónico (Ramachandran, 2008) y ácido cítrico (Bakhiet y Mokhtar, 2015).

La vinaza también puede ser utilizada como medio de crecimiento para *Penicillium* sp., el cual es ampliamente conocido por utilizarse en procesos biotecnológicos y así aprovechar los productos orgánicos que excreta al medio de fermentación.

2.- Nueva opción para el tratamiento de la vinaza, empleando el hongo *Penicillium* sp., como microorganismo capaz de reducir la carga de fenoles y DQO presentes en la vinaza.

El microorganismo que mejor se adaptó a las condiciones de la vinaza (10%v/v) fue el *Penicillium* sp., en condiciones de aerobiosis, dicho hongo logró reducir en un 46,82 % la concentración de fenoles (de 0,252 g/L a 0,134 g/L) (ver tabla 46 del apéndice A). Tomando en cuenta los altos volúmenes de vinaza que la destilería produce (aproximadamente unos 50.730.000 L-vinaza/año), la remoción de fenoles quedaría; Para un reactor de 300 mL al 10%v/v de vinaza la concentración de fenoles removida sería $(0,252-0,134)$ g/L-fenoles = 0,118 g/L. Por lo tanto: 50730000 L-vinaza/año \times 0,118 g/L \times 1kg/1000g \times 0,3 L/0,03 L-vinaza arrojaría unos 59861,4 kg-fenoles/año que se podrían remover, estas sustancias

fenólicas son altamente tóxicas y recalcitrantes para los microorganismos y son persistentes en el suelo (Migo et al., 1993; Pérez et al., 2006; Chandra et al., 2008; Mohana et al., 2009).

Por otra parte, El *Penicillium* sp., redujo en un 35,16% la DQO (de 18,2 g/L a 11,8 g/L) (ver tabla 48 del apéndice A). La mayoría de compuestos carbonados son de tipo inorgánico y difícil degradación, por lo tanto realizar un bio-tratamiento a la vinaza con *Penicillium* sp., la remoción de DQO quedaría; Para un reactor de 300 mL al 10%v/v de vinaza (18,2-11,8) g/L = 6,4 g/L. Por lo tanto: 50730000 L-vinaza/año x 6,4 g/L x 1kg/1000g x 0,3 L/0,03 L-vinaza arrojaría unos 3246720 kg-DQO/año, lo cual conlleva a una disminución considerable de compuestos como: cloruros, sulfatos, fosforo, nitrógeno, sustancias toxicas, así como también de compuestos altamente recalcitrantes, difíciles de biodegradar. Por lo que la aplicación de un tratamiento con *Penicillium* sp., abre una nueva puerta en la investigación de tratamiento de efluentes industriales con características físico-químicas con alta DQO, utilizando hongos para la degradación de compuestos contaminantes.

3.- Producción de ácido cítrico, usando vinaza al 10%v/v, suplementada con sacarosa, sin pre-tratamiento biológico y empleando *A. niger*.

En dicha investigación se pudo lograr una producción de 4,5 g/L de ácido cítrico en un tiempo de 2 días, empleando vinaza al 10%v/v, suplementada con sacarosa y sin pre-tratamiento biológico, en un reactor de 0,5 L. La cantidad de ácido cítrico producida, es de 2,25 g (4,5 g/L x 0,5L). Si asumimos una producción de vinaza de 50.730.000 L-vinaza/año y que en un fermentador de 0,5 L, conteniendo 50 mL de vinaza, la producción de éste ácido orgánico se ubicaría en 2282,85 Ton-ácido cítrico/año (50,73.10⁶ L/año x 2,25 g / 0,05 L x 1000 Ton/g).

Tomando en cuenta un costo aproximado de 6.000.000 Bf/Ton de ácido cítrico en solución, la empresa, podría estar generando $1,37 \times 10^{10}$ Bf aprovechando la vinaza, efluente de bajo costo, cuya utilización en Venezuela es casi nula, generando un producto de alto valor agregado como es el ácido cítrico tan importante para una amplia variedad de procesos productivos a nivel mundial, así como también la prevención de la contaminación de suelos y aguas por infiltración o descargas de vinaza a dichos ambientes.

Existen algunas proyecciones que dicen que para el año 2023, se podrían generar 158 billones de litros de vinaza (Prasad y col, 2016), por lo que se hace necesario tomar medidas para utilización o aprovechamiento de éste residuo.

CONCLUSIÓN

La evaluación de la vinaza de caña de azúcar, arrojó que si puede ser utilizada para la producción de ácido cítrico, obteniéndose una producción máxima de 4,5 g/L de ácido cítrico a un tiempo de 2 días de incubación, usando vinaza a un porcentaje de dilución de 10% v/v, suplementada con sacarosa y sin pre-tratar biológicamente.

RECOMENDACIONES

1.- Evaluar el uso de la vinaza para la obtención de ácido cítrico, empleando otros microorganismos capaces de producirlo y que las exigencias del microorganismo no sean tan altas en lo que respecta a concentraciones de azúcares en el medio.

2.- Hacer una caracterización físico-química con respecto a la concentración de metales como: Fe^{2+} , Mo^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} y Ca^{2+} , los cuales influyen en la biosíntesis de ácido cítrico.

3.- Evaluar el uso de la vinaza para la obtención de ácido cítrico, mediante fermentación en estado sólido.

4.- Realizar un pre-tratamiento a la vinaza de tipo físico-químico, con resinas de intercambio catiónico o con sustancias complejantes, como por ejemplo, Ferrocianuro de potasio, EDTA, etc., con la finalidad de eliminar metales presentes en la vinaza y así evaluar la producción de ácido cítrico, empleando *A. niger* u otro microorganismo.

5.- Realizar pruebas con otras sustancias altamente azucaradas, como por ejemplo melaza y combinarlas con la vinaza, y así conocer la mezcla óptima para la obtención de ácido cítrico.

6.- Realizar resiembras del hongo en agar-vinaza para la mejor adaptación del hongo al medio.

7.- Aplicar sustancias que incentivan la producción de ácido cítrico, como es el caso de metanol y conocer la concentración a la cual puede ser utilizado.

8.- Determinar el consumo de azúcares totales para así conocer mejor, la cinética de todo el proceso de biosíntesis de ácido cítrico, empleando *A. niger*.

9.- Aplicar en la medida de lo posible, una modificación genética al hongo *A. niger*, para una mejora en los rendimientos de la producción de ácido cítrico en éste microorganismo.

10.- Determinar la concentración de ácido cítrico por otras metodologías, no sujetas a tantas interferencias, como: HPLC, Cromatografía de gases y masas, para así dar a conocer resultados más precisos y exactos.

11.- Estandarizar el proceso de separación de ácido cítrico de la vinaza una vez realizada la biosíntesis.

12.- Estandarizar los procesos de tiempo de incubación, tiempo de resiembra del hongo, pH inicial, temperatura de fermentación y de incubación, caudal de aire, inóculo, nutrientes y sales.

13.- Realizar un estudio sobre el residuo que se obtiene en el proceso de obtención de ácido cítrico usando vinaza y su impacto sobre ambiente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAI. P., Bhatt C. y Viswanathan. L. (1983). **Effect of some metabolic inhibitors on citric acid production by *Aspergillus niger***. *Enzyme and Microbial Technology*. 5:373-376.
- AHMED, S., Smith, J. y Anderson, J. 1972. **Mitochondrial activity during citric acid production by *Aspergillus niger***. *Transactions of the British Mycological Society*. 59: 51-61.
- AMIR S., M. Hafidi, G. Merlina y J.C. De Revel. (2005). **Structural characterization of fulvic acids during composting of sewage sludge**. *Process Biochemistry* 40(5):1693-1700.
- ALVAREZ F., Gonzales. C. y Torres. N. (2000). **Metabolism of citric acid production by *Aspergillus niger* model definition, steady state analysis and constrained optimization of citric acid production rate**. *Biotechnology and Bioengineering*. 70:82-108.
- AUTA H., Abidoye K., Tahir H., Ibrahim A. y Aransiola S. (2014). **Citric Acid Production by *Aspergillus niger* Cultivated on *Parkia biglobosa* Fruit Pulp**. *Hindawi Publishing Corporation. International Scholarly Research Notices. Volume 2014, Article ID 762021, 8 pages*.

BAKHJET S. y Mokhtar E. (2015). **Production of Citric Acid by *Aspergillus niger* Using Sugarcane Molasses as Substrat.** [Documento en línea]. Disponible en: <http://jjbs.hu.edu.jo/files/v8n3/Paper%20Number%208m.pdf> [Consulta: 20/10/2015].

BALDIRIS,L., López, E., Castillo,J., y Caicedo L. (2012). **Biodegradación de la vinaza de caña de azúcar con cepas de los hongos *Schyzophyllum commune* y *Trichoderma viride*.** [Documento en línea]. Disponible en:<http://revistas.usc.edu.co/index.php/Ingenium/article/viewFile/191/176> [Consulta: 12/08/2015].

BASTOS, R., Morais, D. y Volpi, M.(2015). **Influence of solid moisture and bed height on cultivation of *Aspergillus niger* from sugarcane bagasse with vinasse.** Brazilian Journal Of Chemical Engineering 32, 337-384.

BODDY L., Berges T., Barreau C., Vainstain M., Jobson, M., Balance, D., y Peberdy, J. (1993). **Purification and characterization of an *Aspergillus niger* invertase and its DNA sequence.** Current Genetics. 24:60-66.

BRIGNOLI, P.1993. **Biotechnologie.** Quaderni Andromeda. Dimensión Natura. 3(4). Italia.

CHANDRA, R.; Bharagava, R. N. & Rai, V. (2008). **Melanoidins as major colourant in sugarcane molasses based distillery effluent and its degradation.** Bioresource Technology, (99), 4648-4660.

- CHAVES, M. (1985). **LAS VINAZAS EN LA FERTILIZACION DE LA CAÑA DE AZUCAR**. Trabajo Publicado por DIECA en Boletín Informativo No. 21. Año 3. 1985 y El Agricultor Costarricense. 43 (3-4): 59-61. 1985.
- CLARK, D., Ito, K. y Tymchuk. (1965). **Effect of potassium ferrocyanide on the chemical composition of molasses mash used in the citric acid fermentation**. Biotechnology and Bioengineering. 7:269-278.
- CLESCERI, L. (1998). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Washington D.C: Editorial American Public Health Association.
- CRUEGER, W. y Crueger, A. (1989). **Biotechnology: A textbook of industrial Microbiology**. Second Edition. Ed Thomas D. Brock p134.
- CURRIE, J. N. (1947). **The citric acid fermentation of *Aspergillus niger***. Journal of Biological Chemistry. 31:15.
- DAROUNEH, E., Alavi, A., Vosoughi, M., Arjmand, M., Seifkordi A. y Rajabi, R. (2009). **Citric acid production: Surface culture versus submerged culture**. [Documento en línea]. Disponible en:http://www.academicjournals.org/article/article1380285527_Darouneh%20et%20al.pdf [Consulta: 12/07/2016].
- DECRETO 883. (1995). **Normas para la Clasificación y el Control de la Calidad de los Cuerpos de Agua y Vertidos o Efluentes Líquidos**. Gaceta oficial N° 5.021.

DOELGER, W., y Prescott, S.(1934). **Acid Citric Fermentation**. Industrial Engineering. Chemistry, 26, pp. 1142-1149.

ELIZONDO, L., y Manzanares, R. (2009). **Obtención de ácido cítrico por medio de fermentación sumergida a partir de Aspergillus nigeratcc 16404 utilizando suero de leche como medio de cultivo de fermentación**. [Documento en línea]. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/2608/1/16101588.pdf>[Consulta: 12/08/2015].

EVANS, C, Scragg A. y Ratledge, C. (1983). **A comparative study of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and non oleaginous yeasts**. European Journal of Biochemistry. 130: 195- 204.

FERREIRA, L. F. R. (2009). **Fungi biodegradation of vinasse from industrial sugarcane processing**. Thesis. Brazil: University of Sao Paulo - ESALQ.

GARASSINI. L., (1964). **Microbiología Tecnológica**. Ediciones De la Biblioteca de la Universidad Central de Venezuela. pp: 143-148

GARIBAY, M., Ramirez R. y Canales A. (2004). **Biología alimentaria**. [Libro en línea]. Disponible en: https://books.google.co.ve/books?id=2ctdvBnTa18C&pg=PA556&lpg=PA556&dq=bacterias+productoras+de+acido+citrico&source=bl&ots=_qA61itGwh&sig=I60fwJUizuNQwbwy9X9jN3Pk68w&hl=es&sa=X&ved=0CBsQ6AEwAGoVChMlveCF8_OuyAIVDG0-

Ch19TAAI#v=onepage&q=bacterias%20productoras%20de%20acido%20citrico&f=false [Consulta: 12/08/2015].

GARCÍA, A., y Rojas, C. (2005). **Posibilidades de Uso de la Vinaza en la Agricultura de Acuerdo con su Modo de Acción en los Suelos.** [Documento en línea]. *Disponible en:* http://www.tecnicana.org/pdf/2006/tec_v10_no17_2006_p3-13.pdf [Consulta: 10/08/2015].

GOMEZ, R., Schnabel, I., y Garrido, J. (1988). **Factores que afectan la producción de ácido cítrico en cultivo sumergido por *Aspergillus niger* 110.** [Documento en línea]. *Disponible en:* <http://elfosscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/Biotecnol%20Apl/1988/5/1/p%2018%20-%2030%20.pdf> [Consulta: 15/08/2015].

HAQ. I., Ali. S., Qadeer. M. y Iqdal. J. (2002). **Effect of cooper ions on mould morphology and citric acid productivity by *Aspergillus niger* using molasses based médium.** *Process Biochemistry.* 37:1085-1090.

HARRIS, D. (2003). **Análisis químico cuantitativo.** España: Editorial Reverté.

HERNÁNDEZ, I. (2002). **La influencia del alcohol en la Sociedad.** [Documento en línea]. *Disponible en:* <http://www.euskomedia.org/PDFAnlt/osasunaz/05/05177190.pdf> [Consulta: 10/08/2015].

HERNÁNDEZ, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2006). **Metodología de la investigación**. México: McGraw-Hill/Interamericana editores, S.A.

HOSSAIN. M., Brooks. J. y Maddox. I. (1984). **The effect of sugar source on citric acid production by *Aspergillus niger***. Applied Microbiology and Biotechnology 19:393-397.

HOSSAIN. M., Brooks. J. y Maddox. I. (1985). **Galactose inhibition of citric acid production from glucose by *Aspergillus niger***. Applied Microbiology and Biotechnology. 22:98-102.

JERNEJC, K., A. Cimerman, A. Perdih. (1982). **Citric acid production in chemically defined media by *Aspergillus niger***. Applied microbiology and biotechnology 14:29–33.

JERNEJC, K., Perdih, A. y Cimerman, A. (1992). **Biochemical composition of *Aspergillus niger* mycelium grown in citric acid productive and no productive conditions**. Journal of Biotechnology. 25: 341-8.

KAPOOR. K., Chaudary. K., Tauro. P. (1983). **Acid Citric in: Prescott and Dunn`s Industrial Microbiology**. UK: MacMillan Publishers Ltd, p: 709-747.

KARAFFA, L. y Kubiceck, P. (2003). ***Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box?** Applied Microbiology and Biotechnology. 61:189-196.

- KUBICEK C. y Rohr M. (1977). **Influence of manganese on enzyme synthesis and citric acid accumulation in *Aspergillus niger***. European journal of applied microbiology and biotechnology. 4:167-175.
- KUBICEK, C., Schreferl-Kunar, G., Wohrer, W. y Rohr, M. (1988). **Evidence for a cytoplasmatic pathway of oxalate biosynthesis in *Aspergillus niger***. Applied and Environmental Microbiology. 54: 633-7.
- KUBICEK, C. y Rohr, M. (1989). **Citric acid Fermentation**. Journal. Critical Reviews in Biotechnology. 4 : 331-373.
- LI, J., y Humphrey A. (1989). **Kinetic and fluorometric behavior of a phenol fermentation**. Biotechnology Letters. 11 (3): 177-182.
- LOPEZ, C., Zuluaga A., Herrera, S., Ruiz, A. y Medina, V. (2006). **Producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger* nrrl 2270 a partir de suero de leche**. [Documento en línea]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v73n150/a04v73n150.pdf>. Consulta: 10/08/2015].
- LUTZONI, F., Kauff, F., Cox, C., Mclaughlin, D., Celio, G., Dentinger, B., Padamsee., M y col. (2004). **Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcelular traits**. American journal of botany. 91 (10): 1446-1480.

- MADIGAN, M., Martinko, J., y Parker, J. (2003). **Brock: Biología de los microorganismos**. 10ma. Ed. Prentice Hall. España. pp: 482-487.
- MAJUMDER L., Khalil, M., Munshi K., Alam K., Rashid H., Begum R. y Alam N. (2010). **Citric Acid Production by *Aspergillus niger* Using Molasses and Pumpkin as Substrate**. [Documento en línea]. Disponible en: <http://www.idosi.org/ejbs/2%281%2910/1.pdf> [Consulta: 10/08/2015].
- MIGO, V. P.; Matsumura, M.; Del Rosario, E. J. & Kataoka, H. (1993). **Decolourization of molasses waste water using an inorganic flocculent**. Journal of Fermentation and Bioengineering, (75) 438–442.
- MILLER G. (1959). **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar**. The Journal of Analytical Chemistry. 31, 426.
- MOHANA, S.; Acharya, B. K. Y Madamwar, D. (2009). **Distillery spent wash: treatment technologies and potential applications**. Journal of Hazardous Materials, (163), 12-25.
- MOHAIBES, M., y Heinonen, H. (2004). **Aerobic thermophilic treatment of farm slurry and food wastes**. Bioresource Technology. 95(3):245-254.
- OLIVEIRA, A., Victor de Carvalho M. y Bastos, R. (2012). **Cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse with vinasse**. Bioscience Journal. Uberlândia, v. 28, n. 6, p. 889-894.

PANDE, H. P. y Sinha, B. K. 1997. **Uso de los desechos de la destilería como fertilizantes. Sugarce, agroindustrial alternatives.** New Delhi: Oxford & IBH publishing. Co.Pvt. Ltd. (Resumen tomado de International Sugar Journal. 99(1180): 201

PAPAGIANNI. M. (2007). **Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling.** [Documento en línea]. Disponible en:<http://membrane.ustc.edu.cn/class/ref1/3%20Advances%20in%20citric%20acid%20fermentation%20by%20Aspergillus%20niger-%20Biochemical%20aspects,%20membrane%20transport%20and%20modeling.pdf>[Consulta: 10/08/2015].

PÉREZ, S. R.; Savón, R. C.; Diaz, M. S. & Kourouma, A. (2006). **Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para la decoloración de efluentes industriales.** Revista Mexicana de Micología, (23), 9-15

PEKSEL, A., Torres. N., Liu, J., Juneau, G. y Kubicek, C. (2002). **^{13}C -NMR analysis of glucose metabolism during citric acid production by *Aspergillus niger*.** Applied Microbiology and Biotechnology. 58:157-63.

PERLMAN, D., Dorrell, W. y Johnson, M. (1946). **Effect of metallic ions on the production of citric acid by *Aspergillus niger*.** Archives of Biochemistry and Biophysics., 10, 131-143.

PERLMAN, D. y Sih, C. (1960). **Fungal synthesis of citric, fumaric and itoconic acids.** In: **Progress in Industrial Microbiology. Vol 2. Interscience Publishers.** New York. P:169-194.

PIMENTEL, H., y Rivero, C. (2011). **Parámetros de calidad de un material orgánico obtenido a partir de vinaza con el uso de un activador multienzimático.** [Documento en línea]. Disponible en: <http://venesuelos.org.ve/index.php/venesuelos/article/view/96>. [Consulta: 12/08/2015].

PRASAD, M. y Shih, K. (2016). **Environmental Materials and Waste: Resource Recovery and Pollution Prevention.** PP: 21-22

QAZI, G., Gaid, C., Chaturvedi,S., Chorpa,C, Trager, M., Onken, U. (1990). **Pilot-scale citric acid production with Aspergillus niger under several conditions.** Journal of Fermentation and Bioengineering. 69:72–74.

RAMACHANDRAN, S. (2008). **Use of spores of Aspergillus niger obtained by Solid-state fermentation for the production of gluconic acid.** [Documento en línea]. Disponible en: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00729882/document> [Consulta: 15/09/2015].

RAPER, K. y Fennel, D. (1965). **The genus Aspergilli.** New york, Williams & Wilkins.

RITTMANN, B. y McCarty, P. (2001). **Biotecnología del medio ambiente**. McGraw-Hill, Inc. PP: 20-24.

RIVADA, F. (2008). **Planta Industrial de Producción de Ácido Cítrico a partir de Melazas de Remolacha**. [Documento en línea]. Disponible en: <http://rodin.uca.es/xmlui/bitstream/handle/10498/6411/34254675.pdf?sequence=1>. [Consulta: 15/09/2015].

RYWINSKA, A., Rynowicz, W., Zarawska, B. y Skrzypinski, A. (2010). **Comparison of citric acid production from glycerol and glucose by different strains of *Yarrowia lipolytica***. The World Journal of Microbiology and Biotechnology. 20: 1217-1224.

ROSILLO, C., Bajay S., y Rothman, H. (2000). **Industrial Uses of Biomass Energy: The example of Brazil**. London, UK CRC Press, pp. 133-137.

ROUKAS, T. y Alichanidis, E. (1988). **The effect of pH on the production of acid citric from beet molasses by surface fermentation**. 8th International Biotechnology Symposium. P-218.

ROUKAS, T., L. Harvey. (1988). **The effect of pH on production of citric and gluconic acid from beet molasses using continuous culture**. Biotechnology Letters. 10:289-294.

ROUKAS, T.(1998). **A new substrate for citric acid production by *Aspergillus niger***. Applied Biochemistry and Biotechnology. 74:43-53.

ROUKAS, T., Liakopoulou-Kyriakides, M.(2002). **Optimization study for the production of citric and gluconic acid from fig water extract by *Aspergillus niger* in surface fermentation**. Food Biotechnology. 16:17-28.

RUBIO M., y MALDONADO, M. (1995). **Purification and characterization of an *Aspergillus niger* invertase and its DNA sequence**. Current Microbiology. 31:80-83.

SAFFRAN, M. y Denstedt, O. (1948). **A rapid method for the determination of citric acid**. Department of Biochemistry, McGill University, Montreal, Canada.

SCHEACHTER, M. (2009). ***Encyclopedia of Microbiology***. Third Edition. Volume 1. Edit. Elsevier. USA. Pp: 424

SELUY, L., Firman, P., y Isla, M. (2012). **Impacto de la hidrólisis de azúcares no-reductores en la producción de etanol a partir de vinazas cerveceras**. Documento en línea]. Disponible en: <http://www.congresos.unlp.edu.ar/index.php/CCMA/7CCMA/paper/viewFile/1075/281>.

SIKANDER, A., Ikram-ul-Haq., Qadeer, M.A.y Iqbal J. (2002). **Production of citric acid by *Aspergillus niger* using cane molasses in a stirred fermentor.**

[Documento en línea]. Disponible en:
<http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v5n3-3/994> [Consulta: 08/07/2016].

SINGH, P. y Pandey, A. (2009). **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation.** Editorial Springer. [Libro en línea]. Disponible en:

<https://books.google.co.ve/books?id=35i0LKOBTVoC&pg=PA43&lpg=PA43&dq=production+of+acid+citric+by+trichoderma+viride&source=bl&ots=f0dqZ5iZ8s&sig=nDZ1tifJ0hRiZ6TeyZA11rRkRLc&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiyvvr9efNAhUDqx4KHRFcBWAQ6AEIZjAJ#v=onepage&q=production%20of%20acid%20citric%20by%20trichoderma%20viride&f=false> [Consulta: 08/07/2016].

STRYER, L. (1985). **Bioquímica.** Segunda Edición. Editorial Reverté. España. pp. 262-279.

SHETTY, K., Paliyath, G., Pometto, A., y Levin, R. (2006). **Food Biotechnology.** *Second Edition.* Disponible en:

<https://books.google.co.ve/books?id=ePLBQAAQBAJ&pg=PA1702&lpg=PA1702&dq=aspergillus+niger+Shetty&source=bl&ots=n0kvvZyvcl&sig=JpU5WvIBh4gU3G6pUp3q0Ytgxo&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjIPXpurvJAhWEYiYKHdPYCy0Q6AEIUjAH#v=onepage&q=aspergillu%20niger%20Shetty&f=false>. [Consulta: 15/09/2015].

SOCCOL, C., Vanderberghe, L., Rodrigues, C. y Pandey, A. (2006). **New perspectives for citric acid production and applications.** Food Technology and Biotechnology. 44:141-149.

TORRE, S. (2008). *Utilización de ácido cítrico en limpieza de pintura* .[Documento en línea]. Disponible en:<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/13397/Tesis%20de%20M%C3%A1ster.pdf?sequence=1>[Consulta: 15/09/2015].

TORRES, N. (1994). **Modelling approach to control of carbohydrate metabolism during citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. I. Model definition and stability of the steady state.** Biotechnology & Bioengineering 44: 104-111.

TORRES, N., Riol-Cimas, J., Wolschek M., y Kubicek C. (1996). **Glucose transport of *Aspergillus niger*: the low affinity carrier is only formed during growth on high glucose concentrations.** Applied Microbiology and Biotechnology. 44:790–794.

VEGA, A., Valdés, L. y Rendón A. (2002). **Caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus niger* y Evaluación de la Producción de Ácido Cítrico.** [Documento en línea]. Disponible en:<http://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/revista-universidad-eafit/article/viewFile/845/753> [Consulta: 15/11/2015].

WELLS, P. y Herrick, H. (1938). **The citric acid industry**. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 30: 255-262.

XU, D., Madrid. C., Rohr. M. y Kubicek. P. (1989). **The influence of type and concentration of the carbón source on production of citric acid by *Aspergillus niger***. Applied Microbiology and Biotechnology. 30:553-558.

APÉNDICES
APÉNDICE A
DATOS EXPERIMENTALES

1. Caracterización físico-química de la vinaza.

Tabla 13. Datos obtenidos para determinar la DQO de la vinaza

Volumen de muestra ($V_m \pm 0,1$) mL	Factor de dilución Adim.	Medición colorimétrica de DQO ($DQO \pm 0,1$) mg/L
0,5	2/0,500	526

Tabla 14. Datos obtenidos para determinar la $DBO_{5\text{días},20^\circ\text{C}}$ de la vinaza

Volumen de muestra ($V_m \pm 0,0003$) mL	Volumen de la botella Winkler (mL)	Factor de dilución Adim.	Oxígeno disuelto inicial ($O_{Di} \pm 0,01$) ppm	Oxígeno disuelto final ($O_{Df} \pm 0,01$) ppm
0,1000	330	0,000303	8,6	1,14

Tabla 15. Datos obtenidos para determinar la cantidad de sólidos totales en la vinaza

Volumen de muestra ($V_m \pm$ $0,01$) mL	Peso de la cápsula vacía ($m_{cv} \pm 0,0001$) g	Peso de la cápsula con muestra evaporada ($m_{ce} \pm 0,0001$) g
5,00	58,8541	59,3602

Tabla 16. Datos obtenidos para determinar la cantidad de sólidos disueltos totales en la vinaza

Volumen de muestra ($V_m \pm 0,01$) mL	Peso de la cápsula vacía ($m_{cv} \pm 0,0001$) g	Peso de la cápsula con muestra evaporada ($m_{ce} \pm 0,0001$) g
5,00	25,7295	26,2266

Tabla 17. Datos obtenidos para determinar la cantidad de sólidos totales fijos en la vinaza

Volumen de muestra ($V_m \pm 0,002$) mL	Peso de la cápsula vacía ($m_{cv} \pm 0,0001$) g	Peso de la cápsula con muestra calcinada ($m_{cc} \pm 0,0001$) g
10,000	23,1552	23,1956

Tabla 18. Datos obtenidos para determinar la cantidad de sólidos disueltos fijos en la vinaza

Volumen de muestra ($V_m \pm 0,002$) mL	Peso de la cápsula vacía ($m_{cv} \pm 0,0001$) g	Peso de la cápsula con muestra calcinada ($m_{cc} \pm 0,0001$) g
10,000	23,6001	23,6363

Tabla 19. Datos obtenidos para determinar fenoles en la vinaza

Volumen de muestra ($V_m \pm 0,1$) mL	Factor de dilución Adim.	Absorbancia (Fenoles $\pm 0,100$)
5,0	1/100	1,290

Tabla 20. Datos obtenidos para determinar la cantidad de nitrógeno en la vinaza

Volumen de muestra ($V_m \pm 0,01$) mL	Factor de dilución (Adim)	Volumen de ácido sulfúrico utilizado en la titulación ($V_a \pm 0,05$) mL	Concentración del ácido sulfúrico (moL/L)
10,00	1/50	1,30	0,02

Tabla 21. Datos obtenidos para determinar azucares reductores en la vinaza

Volumen de muestra ($V_m \pm 0,001$) mL	Factor de dilución (Adim)	Absorbancia (Azucares reductores $\pm 0,100$) (mg/L)
0,5	1/50	0,218

Tabla 22. Datos obtenidos para determinar sulfatos en la vinaza

Volumen de muestra ($V_m \pm 0,01$) mL	Factor de dilución Adim.	Lectura del equipo ($SO_4^{2-} \pm 0,1$) mg/L
10,00	1/100	54

Tabla 23. Datos obtenidos para determinar hierro total en la vinaza

Volumen de muestra ($V_m \pm 0,01$) mL	Factor de dilución Adim.	Lectura del equipo (Fe total $\pm 0,1$) mg/L
10,00	1/50	0,62

2.- Crecimiento del hongo *A. niger* en medio selectivo con sacarosa como única fuente de carbono.

Tabla 24. Variación de la absorbancia de azúcares reductores y ácido cítrico en la fermentación con medio selectivo con sacarosa como única fuente de carbono y empleando *A. niger*.

Valores Promedio (Por Triplicado)	
Absorbancia Azúcares Reductores (Abs_{AR}± 0,001) Adim	Absorbancia de Ácido Cítrico (Abs_{AC}± 0,001) Adim
0,000	0,000
0,251	0,018
1,021	0,029
1,787	0,034
1,667	0,090
1,613	0,136
1,604	0,134

Tabla 25. Variación del pH, concentración de azúcares reductores y ácido cítrico en la fermentación con medio selectivo con sacarosa como única fuente de carbono y empleando *A. niger*.

Tiempo (días)	Valores Promedios (Por triplicado)		
	(pH± 0,01) Adim	Azúcares Reductores (C_{AR}± 0,02) g/L	Ácido Cítrico (C_{AC}± 0,007(g/L))
0	6,06	1,41	0,000
1	4,63	26,51	0,092
2	3,10	103,51	0,147
4	3,16	180,11	0,172
7	3,00	168,11	0,452
8	3,06	162,71	0,682

Tabla 26. Variación de la biomasa en la fermentación con medio selectivo con sacarosa como única fuente de carbono y empleando *A. niger*.

Tiempo (días)	Valores Promedios (Por Triplicado)
	Biomasa ($C_{Bio} \pm 0,009$) g/L
0	3,274
1	37,100
4	48,493
7	73,020

3.- Producción de ácido cítrico con vinaza como sustrato, con y sin adición de sales minerales y empleando *A. niger*.

Tabla 27. Variación de la absorbancia de azúcares reductores y ácido cítrico en la fermentación con vinaza como sustrato, sin adición de sales minerales y empleando *A. niger*.

Valores Promedio (Por Triplicado)	
Absorbancia Azúcares Reductores ($Abs_{AR} \pm 0,001$) Adim	Absorbancia de Ácido Cítrico ($Abs_{AC} \pm 0,001$) Adim
0,201	0,116
0,190	0,109
0,195	0,094
0,156	0,088
0,139	0,096

Tabla 28. Variación de la absorbancia de azúcares reductores y ácido cítrico en la fermentación con vinaza como sustrato, sin adición de sales minerales y empleando *A. niger*.

Valores Promedio (Por Triplicado)	
Absorbancia Azúcares Reductores (Abs_{AR}± 0,001) Adim	Absorbancia de Ácido Cítrico (Abs_{AC}± 0,001) Adim
0,201	0,116
0,175	0,105
0,193	0,239
0,176	0,099
0,181	0,104

Tabla 29. Variación en pH, concentración de azúcares reductores, ácido cítrico y biomasa en la fermentación con vinaza como sustrato, con adición de sales minerales y empleando *A. niger*.

Tiempo (días)	Valores Promedios (Por Triplicado)			
	pH (pH± 0,01) (adim)	Azúcares Reductores (C_{AR}± 0,02) (g/L)	Ácido Cítrico (C_{AC}± 0,007) (g/L)	Biomasa (C_{Bio}± 0,009) (g/L)
0	6,06	21,51	0,582	0,614
1	5,67	20,41	0,547	0,188
2	5,67	20,91	0,472	0,218
3	5,65	17,01	0,442	0,243
4	5,77	15,31	0,482	0,278

Tabla 30. Variación en pH, concentración de azúcares reductores, ácido cítrico y biomasa en la fermentación, con vinaza como sustrato, sin adición de sales minerales y empleando *A. niger*.

Tiempo (días)	Valores Promedios (Por Triplicado)			
	pH (pH \pm 0,01) Adim	Azúcares Reductores (C _{AR} \pm 0,02) (g/L)	Ácido Cítrico (C _{AC} \pm 0,007) g/L	Biomasa (C _{Bio} \pm 0,009) g/L
0	6,08	21,51	0,582	0,675
1	5,67	18,91	0,527	0,800
2	5,62	20,71	1,197	0,096
3	5,65	19,01	0,497	0,160
4	5,67	19,51	0,522	0,112

4.- Producción de ácido cítrico con vinaza a diferentes porcentajes de dilución (%v/v), suplementada con sacarosa, sin pre-tratamiento biológico y empleando *A. niger*.

Tabla 31. Variación de la absorbancia de azúcares reductores y ácido cítrico en vinaza a diferentes porcentajes de dilución (%v/v), suplementada con sacarosa, sin pre-tratamiento biológico y empleando *A. niger*.

Valores Promedios (Por Triplicado)					
Absorbancia de ácido cítrico (Abs _{AC} \pm 0,001) Adim			Absorbancia de azúcares reductores (Abs _{AR} \pm 0,001) Adim		
5%v/v	10%v/v	20%v/v	5%v/v	10%v/v	20%v/v
0,001	0,001	0,002	0,086	0,087	0,114
0,013	0,009	0,043	0,227	0,260	0,232
0,011	0,049	0,027	0,970	0,827	0,93
0,001	0,001	0,001	1,756	1,636	1,381
0,001	0,025	0,005	1,698	1,560	1,241
0,020	0,031	0,028	1,754	1,550	1,196

Tabla 32. Variación de pH, concentración de azúcares reductores y ácido cítrico en la fermentación con vinaza al 5%v/v, sin pre-tratamiento biológico, suplementada con sacarosa y empleando *A. niger*.

Tiempo (días)	Valores Promedios (Por Triplicado)		
	pH (pH \pm 0,01) Adim	Azúcares Reductores (C _{AR} \pm 0,02) (g/L)	Ácido cítrico (C _{AC} \pm 0,007) (g/L)
0	6,01	10,01	0,291
1	4,98	24,11	2,625
2	4,32	98,41	2,236
4	4,08	177,01	0,291
7	3,47	171,21	0,291
8	3,44	176,81	3,987

Tabla 33. Variación de la Biomasa en la fermentación con vinaza al 5%v/v, sin pre-tratamiento biológico, suplementada con sacarosa y empleando *A. niger*.

Tiempo (días)	Valores Promedios (Por Triplicado)
	Biomasa (C _{Bio} \pm 0,009) g/L
0	6,548
1	45,893
4	50,346
7	48,853

Tabla 34. Variación de pH, concentración de azúcares reductores y ácido cítrico en la fermentación con vinaza al 10%v/v, sin pre-tratamiento biológico, suplementada con sacarosa, empleando *A. niger*.

Tiempo (días)	Valores Promedios (Por triplicado)		
	pH (pH \pm 0,01) Adim	Azúcares Reductores (C _{AR} \pm 0,02) (g/L)	Ácido Cítrico (C _{AC} \pm 0,007) (g/L)
0	6,00	10,11	0,291
1	5,15	27,41	1,847
2	4,51	84,11	9,627
4	4,28	165,01	0,291
7	3,43	157,41	4,959
8	3,26	156,41	6,126

Tabla 35. Variación de la biomasa en la fermentación con vinaza al 10%v/v, sin pre-tratamiento biológico, suplementada con sacarosa y empleando *A. niger*.

Tiempo (días)	Valores Promedios (Por Triplicado)
	Biomasa (C _{Bio} \pm 0,009) g/L
0	7,423
1	44,680
4	56,426
7	57,673

Tabla 36. Variación de pH, concentración de azúcares reductores y ácido cítrico en la fermentación con vinaza al 20%v/v, sin pre-tratamiento biológico, suplementada con sacarosa, empleando *A. niger*.

Tiempo (días)	Valores Promedios (Por Triplicado)		
	pH (pH \pm 0,01) Adim	Azúcares Reductores (C _{AR} \pm 0,02) (g/L)	Ácido cítrico (C _{AC} \pm 0,007) (g/L)
0	6,01	12,81	0,486
1	5,22	24,61	8,460
2	4,62	94,41	5,348
4	3,5	139,51	0,291
7	3,26	125,51	1,069
8	3,31	121,01	5,543

Tabla 37. Variación de la biomasa en la fermentación con vinaza al 20%v/v, sin pre-tratamiento biológico, suplementada con sacarosa y empleando *A. niger*.

Tiempo (días)	Valores Promedios (Por Triplicado)
	Biomasa (C _{Bio} \pm 0,009) g/L
0	8,427
1	45,086
4	82,966
7	69,440

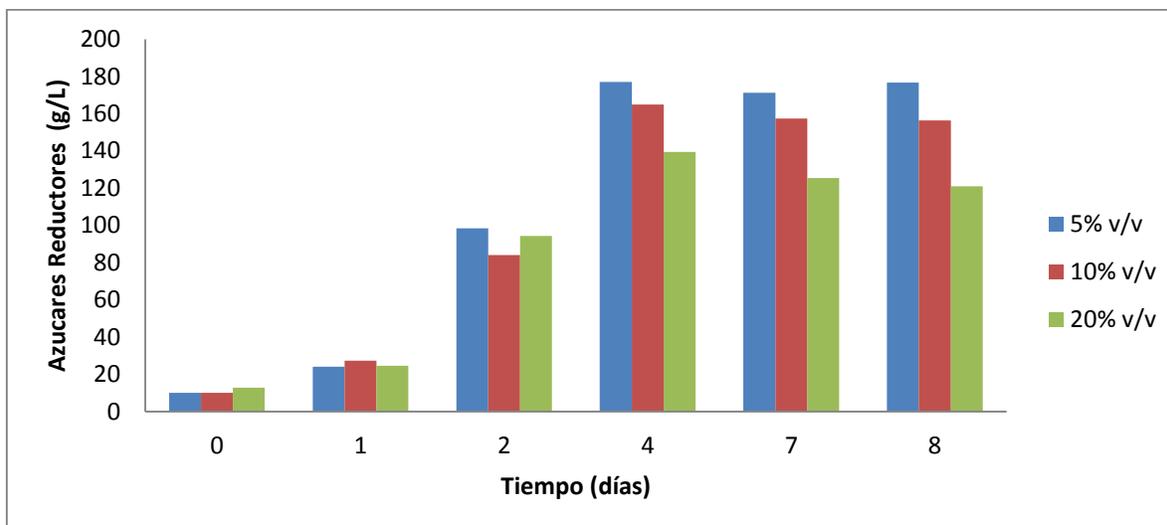


Figura 25. Variación de la concentración de los azúcares reductores, en la fermentación con vinaza a diferentes porcentajes de dilución, suplementada con sacarosa, sin pre-tratamiento biológico y empleando *A. niger*.

Fuente: Pedro Lugo (2015).

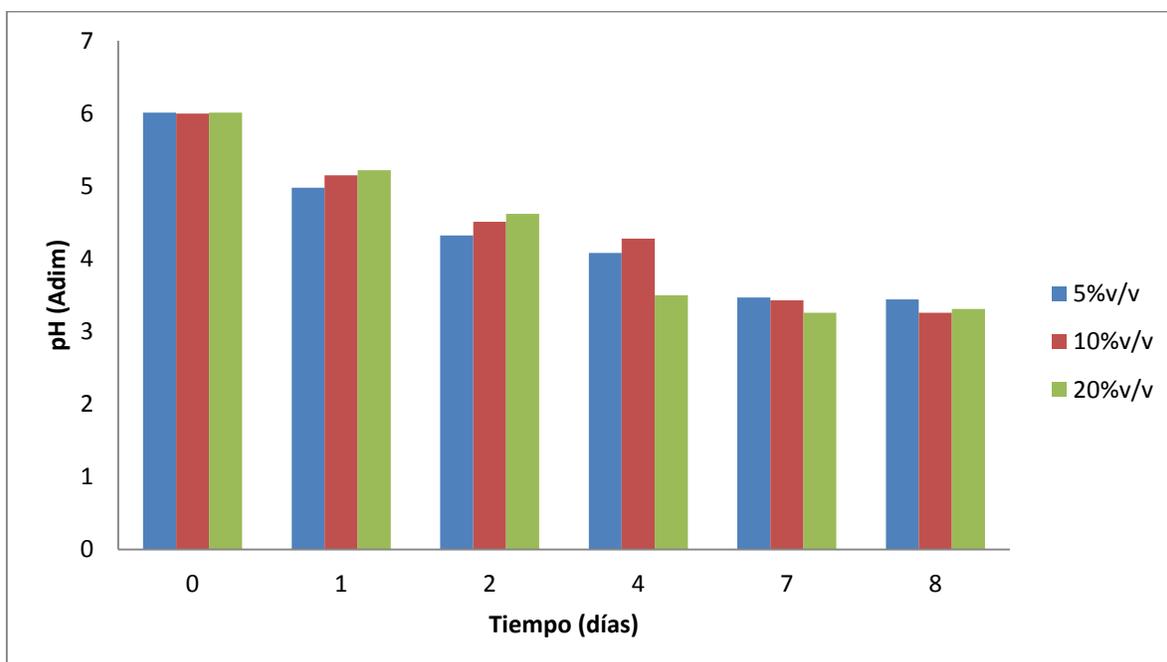


Figura 26. Variación de la concentración del pH, en la fermentación con vinaza a diferentes porcentajes de dilución (%v/v), suplementada con sacarosa, sin pre-tratamiento biológico y empleando *A. niger*.

Fuente: Pedro Lugo (2015).

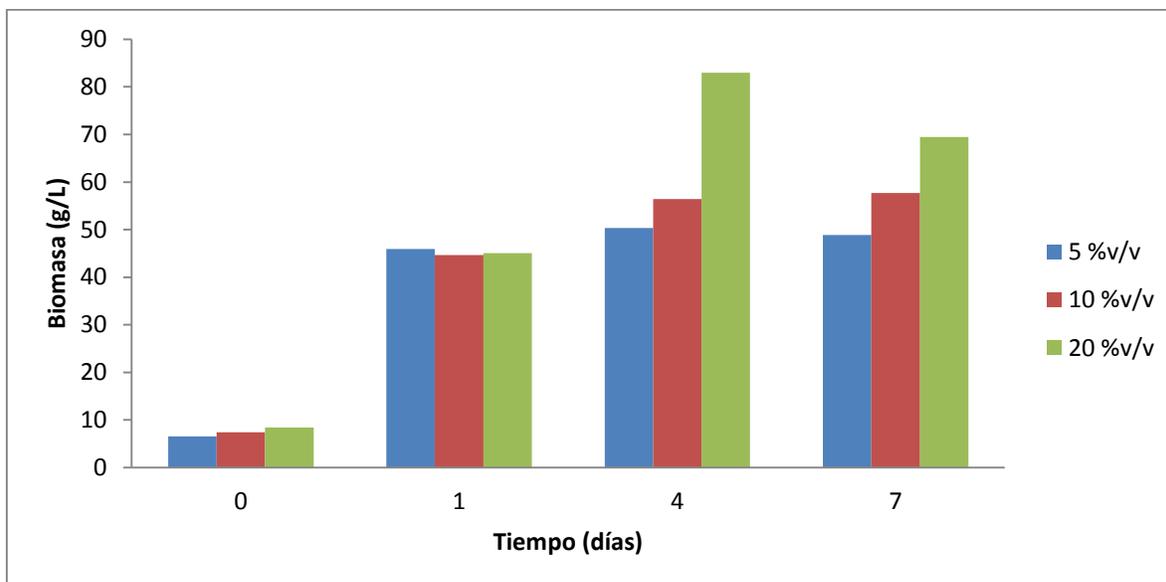


Figura 27. Variación de la Biomasa en la fermentación de ácido cítrico, empleando *A. niger*, con vinaza suplementada con sacarosa, a diferentes porcentajes de dilución y sin pre-tratamiento biológico.

Fuente: Pedro Lugo (2015).

4.- Pre-tratamiento biológico a la vinaza 10%v/v, empleando diferentes microorganismos.



Figura 28. (A) *Penicillium* sp., en agar-agar con vinaza al 10% v/v.

(B) *Penicillium* sp., en agar Sabouraud.

Fuente: Pedro Lugo (2016).

Tabla 38. Variación de la absorbancia de fenoles en el pre-tratamiento de la vinaza al 10% v/v, utilizando el hongo *Penicillium* sp.

Valores Promedios (Por Triplicado)	
Tiempo (días)	Absorbancia de fenoles (Abs_F±0,001) Adim
0	0,212
1	0,211
2	0,245
3	0,206
4	0,186
7	0,172
9	0,163
10	0,154
11	0,139
14	0,141

Tabla 39. Variación del pH y fenoles en el pre-tratamiento con vinaza al 10% v/v, utilizando el hongo *Penicillium* sp.

Tiempo (días)	Valores Promedios (Por Triplicado)		
	pH (pH ± 0,01) Adim	Fenoles (C_F± 0,0002) g/L	Remoción de fenoles (%)
0	6,12	0,1773	46,16
1	6,30	0,1762	
2	7,30	0,2154	
3	7,60	0,1704	
4	7,91	0,1474	
7	8,00	0,1312	
9	8,38	0,1208	
10	8,49	0,1104	
11	8,53	0,0931	
14	8,56	0,0955	

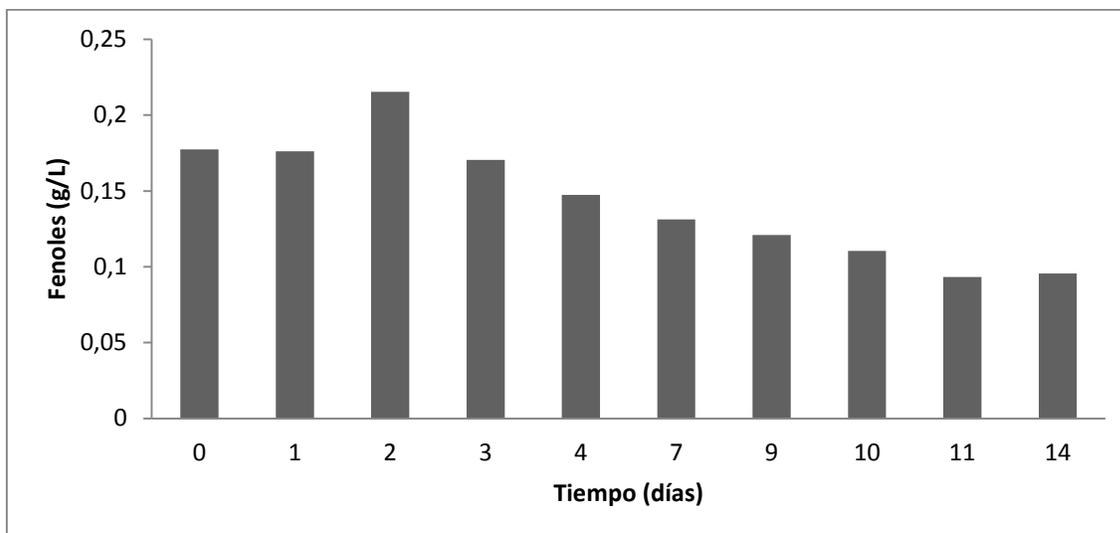


Figura 29. Variación de la concentración de fenoles en el pre-tratamiento con vinaza al 10% v/v, empleando *Penicillium* sp.

Fuente: Pedro Lugo (2016).

Tabla 40. Variación de la absorbancia de fenoles en el pre-tratamiento de vinaza al 10% v/v, utilizando el Bacterias degradadoras de fenoles.

Valores Promedios (Por Triplicado)	
Tiempo (días)	Absorbancia de fenoles (Abs_F±0,001) Adim
0	0,282
1	0,321
2	0,340
5	0,254
6	0,233
7	0,209
8	0,223
9	0,239
12	0,232
13	0,216

Tabla 41. Variación del pH y fenoles en el pre-tratamiento con vinaza al 10%v/v, empleando bacterias.

Tiempo (días)	Valores Promedios (Por Triplicado)		
	pH (pH \pm 0,01) Adim	Fenoles (C _F \pm 0,0002) g/L	Remoción de fenoles (%)
0	5,63	0,2581	29,49
1	5,65	0,3031	
2	7,12	0,3250	
5	8,26	0,2258	
6	8,40	0,2016	
7	8,47	0,1739	
8	8,48	0,1900	
9	8,64	0,2085	
12	8,71	0,2004	
13	8,77	0,1820	

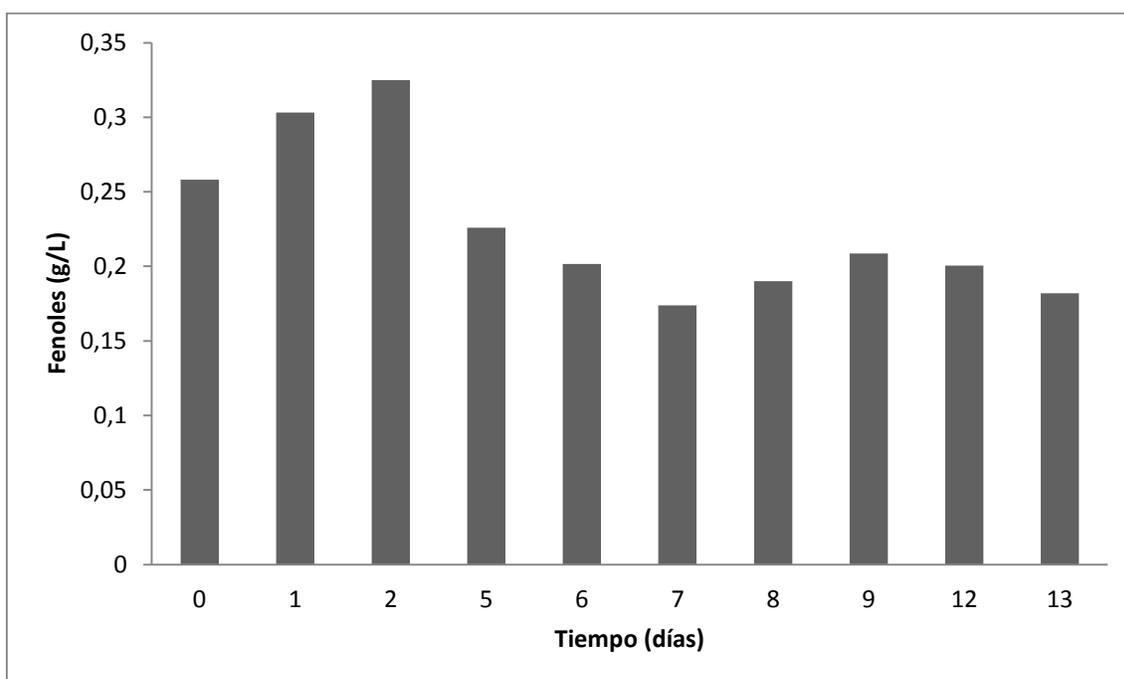


Figura 30. Variación de la concentración de fenoles en el pre-tratamiento con vinaza al 10% v/v, empleando *Bacterias*.

Fuente: Pedro Lugo (2016)

Tabla 42. Variación de la absorbancia de fenoles para el pre-tratamiento de vinaza al 10% v/v, empleando el Bacterias.

Valores Promedios (Por Triplicado)		
Tiempo (días)	Absorbancia de fenoles ($Abs_{F\pm 0,001}$) Adim	
	Hongo B	Hongo C
0	0,252	0,240
1	0,257	0,262
2	0,22	0,235
3	0,178	0,231
4	0,166	0,219
7	0,234	0,185
8	0,223	0,197
9	0,230	0,198

Tabla 43. Variación del pH y fenoles en el pre-tratamiento con vinaza al 10%v/v, empleando hongo de podredumbre blanca (Hongo B)

Tiempo (días)	Valores Promedios (Por Triplicado)		
	pH ($pH \pm 0,01$) Adim	Fenoles ($C_{F\pm 0,0002}$) g/L	Remoción de fenoles (%)
0	6,00	0,2235	11,35
1	6,09	0,2292	
2	7,30	0,1866	
3	8,05	0,1381	
4	8,00	0,1243	
7	8,32	0,2027	
8	8,02	0,1900	
9	8,12	0,1981	

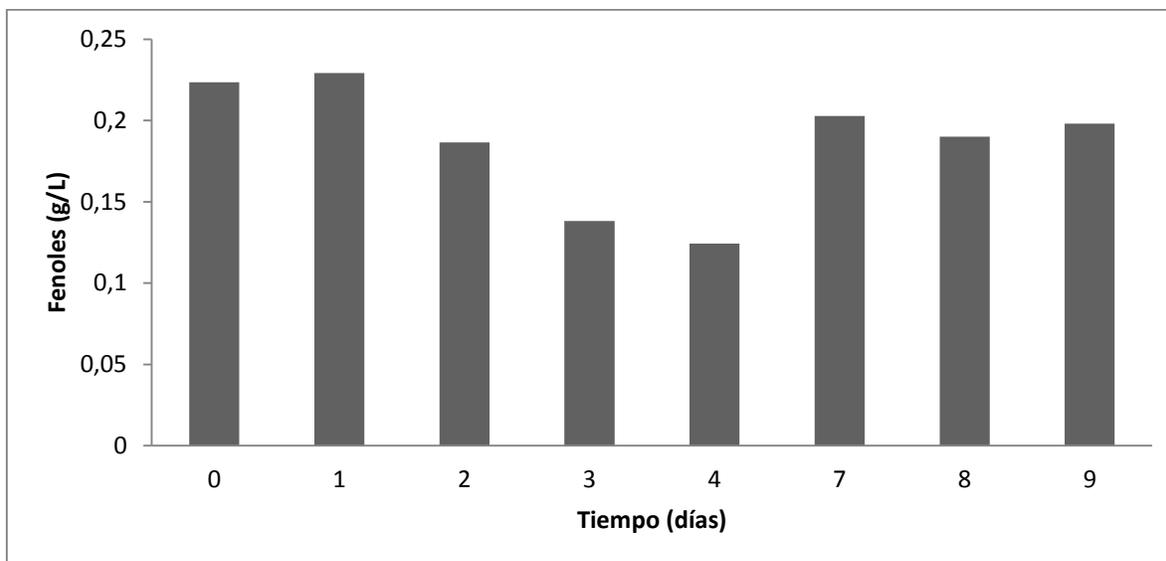


Figura 31. Variación de la concentración de fenoles en el pre-tratamiento con vinaza al 10% v/v, empleando hongo de podredumbre blanca (hongo B).

Fuente: Pedro Lugo (2016).

Tabla 44. Variación del pH y fenoles en el pre-tratamiento con vinaza al 10%v/v, empleando hongo de podredumbre blanca (Hongo C)

Tiempo (días)	Valores Promedios (Por Triplicado)		
	pH (pH \pm 0,01) Adim	Fenoles (C _F \pm 0,0002) g/L	Remoción de fenoles (%)
0	6,03	0,2096	23,10
1	6,08	0,2350	
2	6,95	0,2039	
3	7,25	0,1993	
4	8,02	0,1854	
7	8,09	0,1462	
8	7,97	0,1600	
9	8,11	0,1612	

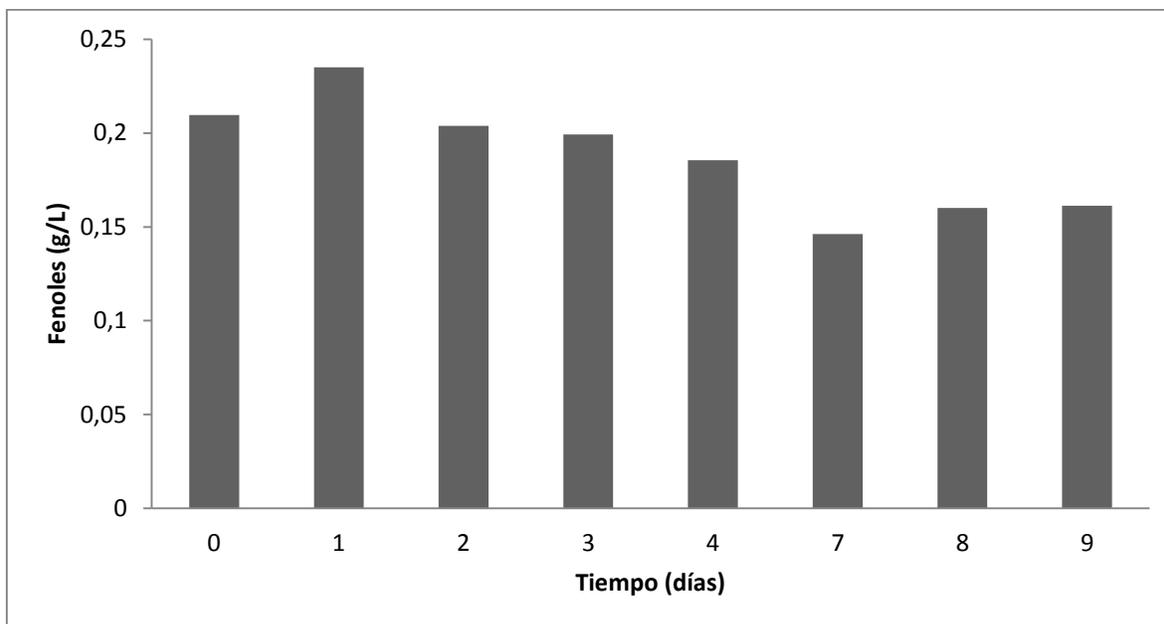


Figura 32. Variación de la concentración de fenoles en el pre-tratamiento con vinaza al 10% v/v, empleando hongo de podredumbre blanca (hongo C).

Fuente: Pedro Lugo (2016).

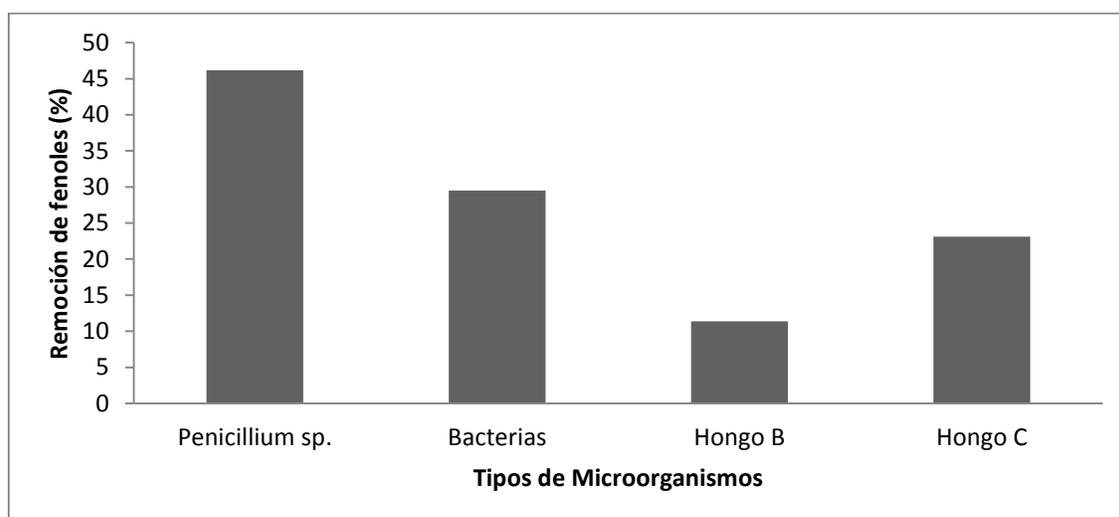


Figura 33. Porcentaje de remoción de fenoles (%) con vinaza al 10% v/v, ejercida por *Penicillium* sp; Bacterias; Hongo B y C.

Fuente: Pedro Lugo (2016).

Tabla 45. Variación de la absorbancia en el pre-tratamiento biológico a la vinaza, a diferentes porcentajes de dilución (%v/v) y empleando *Penicillium sp.*

Valores Promedios (Por Triplicado)		
Absorbancia de fenoles		
(Abs_F±0,001) Adim		
5%v/v	10%v/v	20%v/v
0,088	0,277	0,488
0,110	0,195	0,399
0,111	0,223	0,398
0,085	0,200	0,399
0,083	0,199	0,385
0,083	0,175	0,416

Tabla 46. Variación del pH y concentración de fenoles durante el pre-tratamiento con vinaza, a diferentes porcentajes de dilución (%v/v) y empleando *Penicillium sp.*

Tiempo (días)	Valores Promedios (Por Triplicado)					
	pH (pH ± 0,01) Adim			Fenoles (C_F± 0,0002) g/L		
	5% v/v	10% v/v	20% v/v	5% v/v	10% v/v	20% v/v
0	6,12	6,01	6,08	0,034	0,252	0,495
1	7,26	6,12	6,00	0,059	0,157	0,393
2	7,87	7,71	6,34	0,060	0,190	0,391
3	7,88	7,47	7,39	0,030	0,163	0,393
4	8,34	8,38	8,13	0,028	0,162	0,376
7	8,46	8,55	8,32	0,028	0,134	0,412
Remoción de fenoles (%)				16,77	46,61	16,75

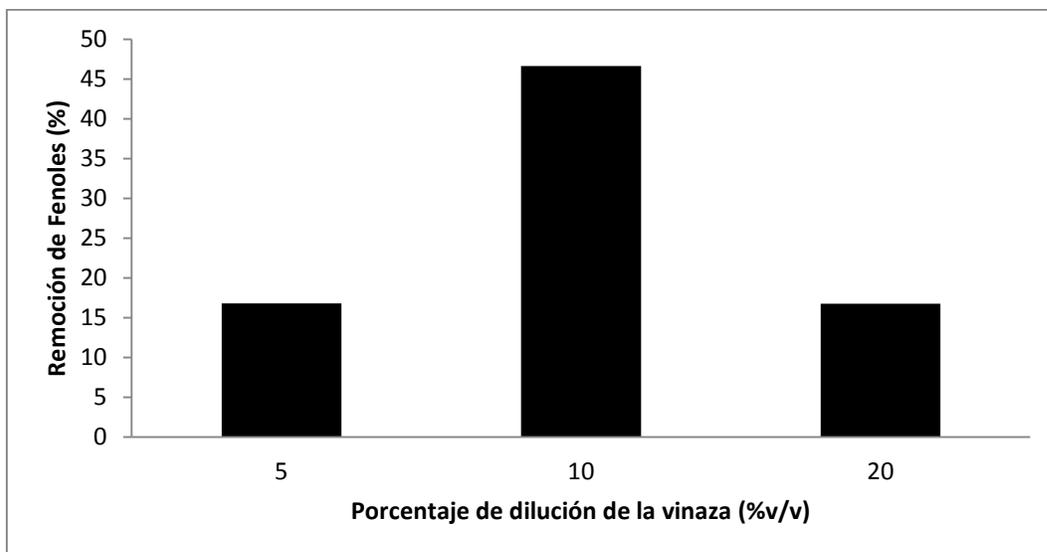


Figura 34. Porcentaje de Remoción de fenoles (%), a diferentes porcentajes de dilución de vinaza (%v/v) y empleando *Penicillium* sp.

Fuente: Pedro Lugo (2016).

Tabla 47. Variación de la absorbancia de DQO en el pre-tratamiento biológico a la vinaza, a diferentes concentraciones y empleando *Penicillium* sp.

Valores Promedios (Por Triplicado)			
Porcentajes de dilución de vinaza (%v/v)	Absorbancia (Adim)		Factor de dilución
	Inicial	Final	
5	45	39	200
10	91	59	200
20	125	108	200

Tabla 48. Variación de la concentración de DQO en el pre-tratamiento a la vinaza, a diferentes porcentajes de dilución (%v/v) y empleando *Penicillium* sp.

Porcentaje de Dilución de la vinaza (%v/v)	Valores Promedios (Por Triplicado)			
	DQO (DQO \pm 0,1) g/L		Remoción (DQO \pm 0,1) g/L	Remoción (%)
	Inicial	Final		
5	9,0	7,8	1,2	13,33
10	18,2	11,8	6,4	35,16
20	25	21,6	3,4	13,60

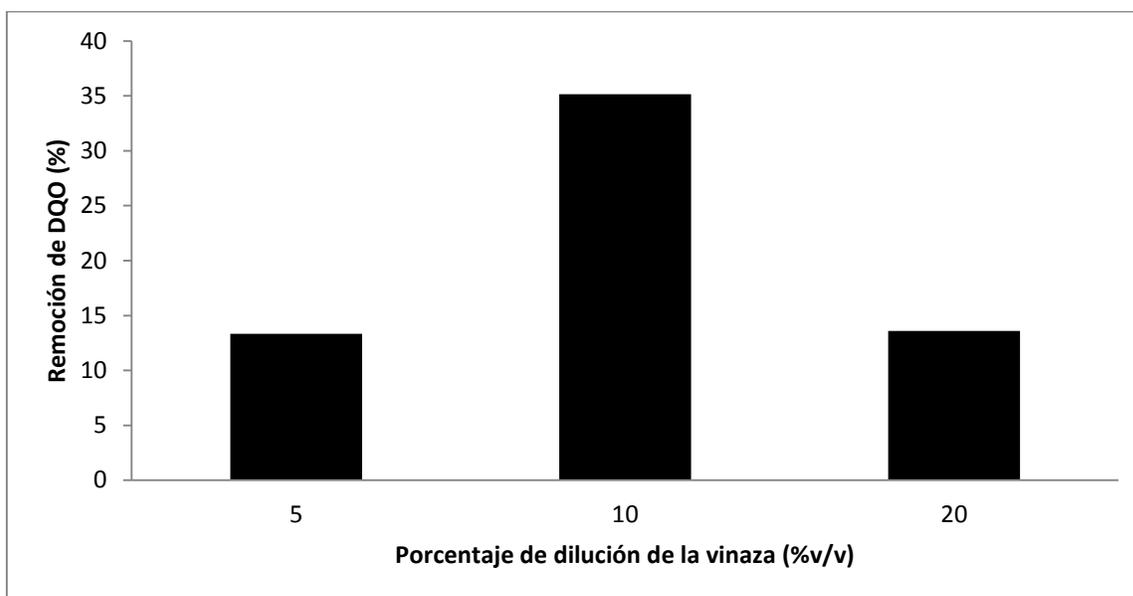


Figura 35. Remoción de DQO (Demanda Química de Oxígeno) en el pre-tratamiento de la vinaza a diferentes porcentajes de dilución empleando *Penicillium* sp.

Fuente: Pedro Lugo (2016).

6.- Producción de ácido cítrico con vinaza a diferentes porcentajes de dilución, suplementada con sacarosa, pre-tratada biológicamente y empleando *A. niger*.

Tabla 49. Variación de la absorbancia para ácido cítrico y azúcares reductores, en la fermentación de ácido cítrico, usando vinaza a diferentes porcentajes de dilución (%v/v), suplementada con sacarosa, pre-tratada biológicamente y empleando *A. niger*.

Valores Promedios (Por Triplicado)					
Absorbancia de ácido cítrico (Abs_{AC}±0,001) Adim			Absorbancia de azúcares reductores (Abs_{AR}±0,001) Adim		
5%v/v	10%v/v	20%v/v	5%v/v	10%v/v	20%v/v
0,001	0,001	0,002	0,086	0,087	0,114
0,013	0,009	0,043	0,227	0,26	0,232
0,011	0,049	0,027	0,970	0,827	0,93
0,001	0,001	0,001	1,756	1,636	1,381
0,001	0,025	0,005	1,698	1,56	1,241
0,02	0,031	0,028	1,754	1,55	1,196

Tabla 50. Variación del pH, concentración de azúcares reductores y ácido cítrico en la fermentación con vinaza al 5%v/v, pre-tratada biológicamente y empleando *A. niger*.

Tiempo (días)	Valores Promedios (Por Triplicado)		
	pH (pH \pm 0,01) Adim	Azúcares Reductores (C _{AR} \pm 0,02) (g/L)	Ácido cítrico (C _{AC} \pm 0,007) (g/L)
0	5,98	1,610	1,264
1	3,54	162,11	0,680
3	3,00	202,81	3,792
5	3,52	208,11	2,236
6	3,69	164,81	0,291
7	3,45	168,31	0,291
8	3,50	167,81	3,014

Tabla 51. Variación de la Biomasa en la fermentación con vinaza al 5%v/v, pre-tratada biológicamente y empleando *A. niger*.

Tiempo (días)	Valores Promedios (Por Triplicado)
	Biomasa (C _{Bio} \pm 0,009) g/L
0	7,275
1	63,567
3	63,006
5	50,953

Tabla 52. Variación del pH, concentración de azúcares reductores y ácido cítrico en la fermentación con vinaza al 10%v/v, pre-tratada biológicamente y empleando *A. niger*.

Tiempo (días)	Valores Promedios (Por Triplicado)		
	pH (pH \pm 0,01) Adim	Azúcares Reductores (C _{AR} \pm 0,02) (g/L)	Ácido cítrico (C _{AC} \pm 0,007) (g/L)
0	6,00	1,51	3,598
1	3,69	84,91	1,069
3	3,15	180,41	3,598
5	3,67	204,91	3,792
6	3,84	163,11	0,291
7	3,56	167,31	2,042
8	3,60	163,61	5,154

Tabla 53. Variación de la biomasa en la fermentación con vinaza al 10%v/v, pre-tratada biológicamente y empleando *A. niger*.

Tiempo (días)	Valores Promedios (Por Triplicado)
	Biomasa (C _{Bio} \pm 0,009) g/L
0	7,814
1	61,853
3	61,800
5	45,553

Tabla 54. Variación del pH, concentración de azúcares reductores y ácido cítrico en la fermentación con vinaza al 20%v/v, pre-tratada biológicamente y empleando *A. niger*.

Tiempo (días)	Valores Promedios (Por Triplicado)		
	pH (pH \pm 0,01) Adim	Azúcares Reductores (C _{AR} \pm 0,02) (g/L)	Ácido cítrico (C _{AC} \pm 0,007) (g/L)
0	6,01	2,41	6,321
1	4,06	122,71	3,598
3	3,40	184,11	7,877
5	3,89	182,81	6,710
6	4,03	143,51	4,765
7	3,82	136,71	4,570
8	3,92	138,51	5,932

Tabla 55. Variación de la Biomasa en la fermentación con vinaza al 20%v/v, pre-tratada biológicamente y empleando *A. niger*.

Tiempo (días)	Valores Promedios (Por Triplicado)
	Biomasa (C _{Bio} \pm 0,009) g/L
0	8,599
1	62,066
3	83,166
5	68,253

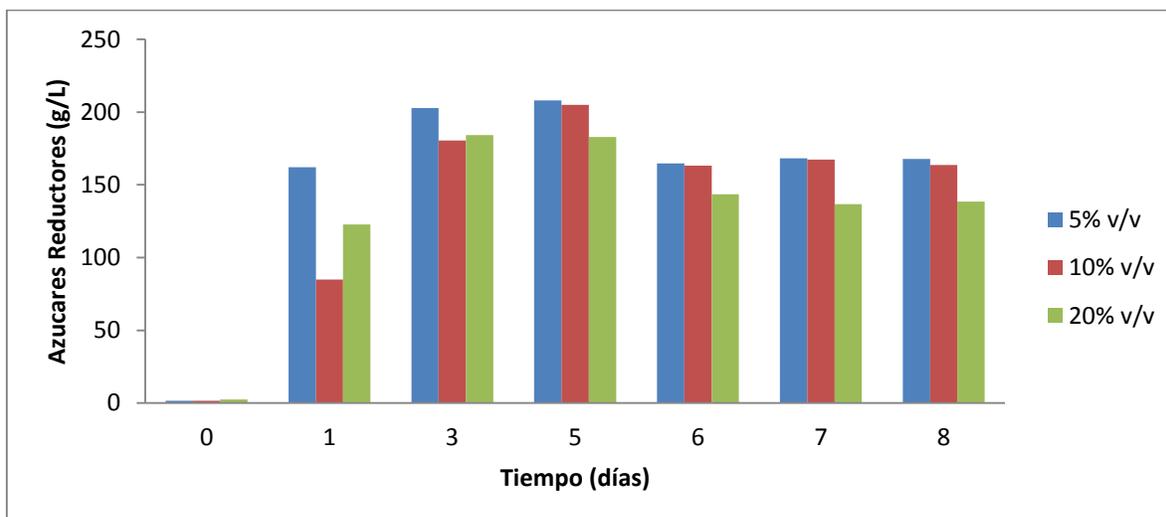


Figura 36. Variación de la concentración de los Azúcares Reductores, en la fermentación con vinaza a diferentes porcentajes de dilución (%v/v), suplementada con sacarosa, con pre-tratamiento biológico y empleando *A. niger*.

Fuente: Pedro Lugo (2016).

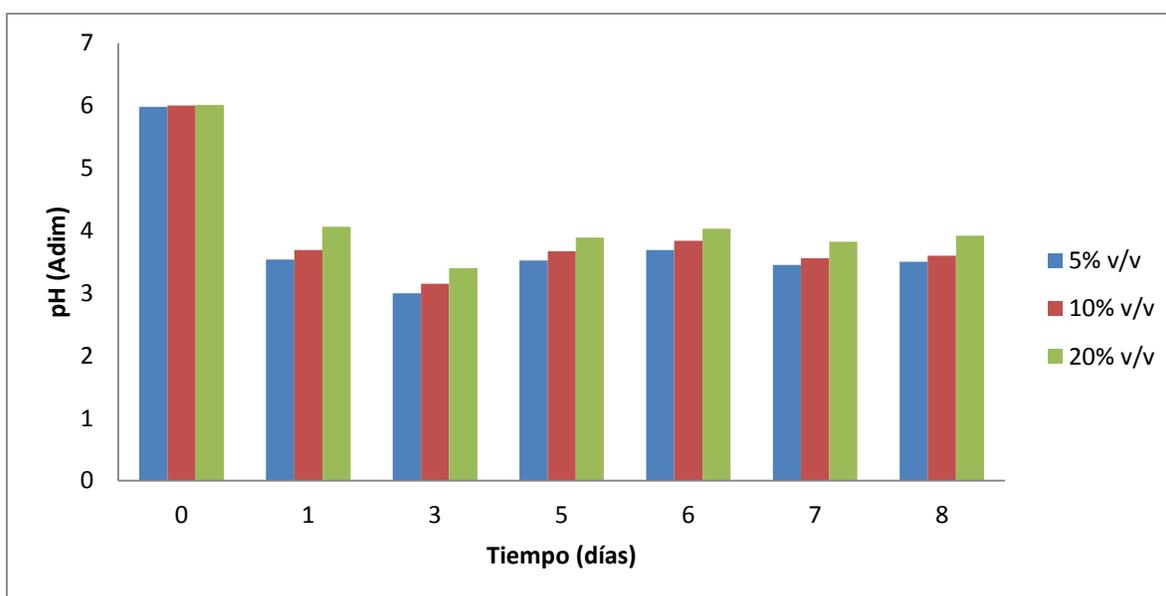


Figura 37. Variación del pH, en la fermentación con vinaza a diferentes porcentajes de dilución (%v/v), suplementada con sacarosa, con pre-tratamiento biológico y empleando *A. niger*.

Fuente: Pedro Lugo (2016).

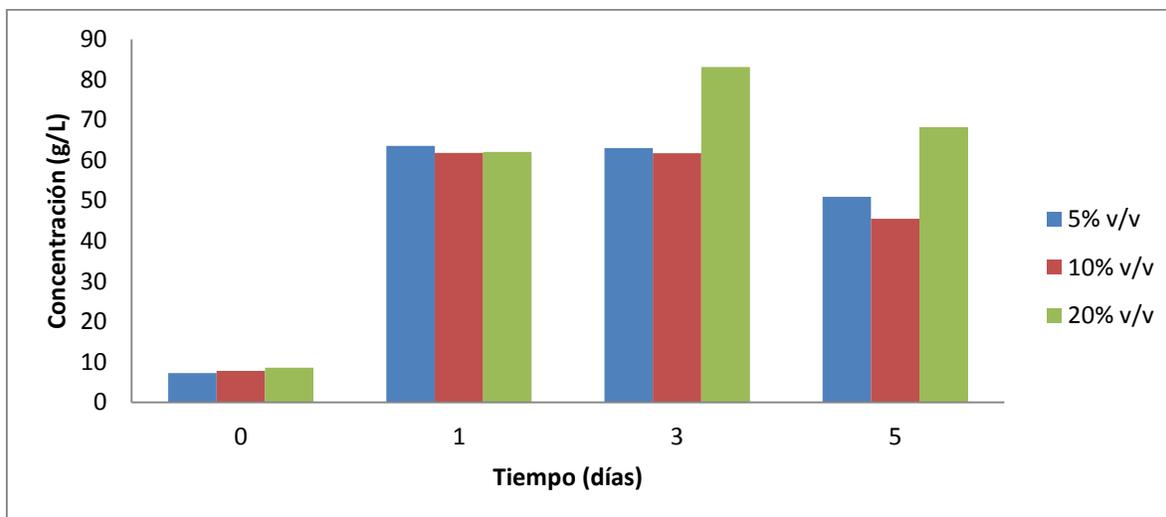


Figura 38. Variación de la Biomasa, en la fermentación con vinaza a diferentes porcentajes de dilución (%v/v), suplementada con sacarosa, sin pre-tratamiento biológico y empleando *A. niger*.

Fuente: Pedro Lugo (2016).

Tabla 56. Producción de ácido cítrico empleando *A. niger*, en vinaza a diferentes porcentajes de dilución (%v/v), suplementada con sacarosa.

Tipo de vinaza	Porcentaje de dilución de vinaza (%v/v)	Tiempo (días)	Producción de ácido cítrico ($C_{AC} \pm 0,007$) (g/L)	Biomasa ($C_{Bio} \pm 0,009$) g/L	Relación Ácido Cítrico / Biomasa (Adim)
SPTB	5	8	3,987	48,850	0,081
CPTB	5	3	3,792	63,006	0,060
SPTB	10	2	9,627	44,680	0,215
CPTB	10	8	5,154	45,553	0,113
SPTB	20	1	8,460	45,086	0,187
CPTB	20	3	7,877	83,116	0,094

Nota: SPTB: Sin Pre-tratamiento Biológico. CPTB: Con Pre-tratamiento Biológico.

7.- Estimación de la producción de ácido cítrico con vinaza al 10%v/v, suplementada con sacarosa, sin pre-tratamiento biológico y empleando *A. niger*.

Tabla 57. Variación de la absorbancia de azúcares reductores y ácido cítrico durante los ensayos de fermentación con vinaza al 10%v/v, suplementada con sacarosa, sin pre-tratamiento biológico y empleando *A. niger*.

Valores Promedios (Por Triplicado)	
Azúcares Reductores (Abs_{AR}± 0,001) Adim	Ácido Cítrico (Abs_{AC}± 0,001) Adim
0,001	0,012
0,489	0,024
1,186	0,001
1,679	0,003
1,664	0,018
1,584	0,011
1,518	0,006
1,311	0,011
1,179	0,002
1,141	0,001

Tabla 58. Variación del pH, concentración de azúcares reductores y ácido cítrico producción de ácido cítrico con vinaza al 10% v/v, suplementada con sacarosa, sin pre-tratamiento biológico y empleando *A. niger*.

Tiempo (días)	Valores Promedios (Por Triplicado)			
	pH (pH \pm 0,01) (Adim)	Azúcares Reductores (C _{AR} \pm 0,02) (g/L)	Ácido Cítrico	
			Método Colorimétrico (C _{AC} \pm 0,007) (g/L)	Método Acidez titulable (C _{ACT} \pm 0,06) g/L
0	6,00	1,51	2,236	0,38
1	5,54	50,31	4,570	0,50
2	5,60	120,01	0,097	0,38
3	5,52	169,31	0,486	0,40
7	3,57	167,81	3,403	2,83
8	3,50	159,81	2,042	3,68
9	3,44	153,21	1,069	4,65
14	3,04	132,51	2,042	15,64
15	2,88	119,31	0,291	20,19
17	2,96	115,51	0,097	20,07

Tabla 59. Variación de la biomasa en la producción de ácido cítrico, con vinaza al 10% v/v, suplementada con sacarosa, sin pretratamiento biológico y empleando *A. niger*.

Tiempo (días)	Valores Promedios (Por Triplicado)
	Biomasa (C _{Bio} \pm 0,009) g/L
0	13,200
1	29,833
2	55,546
3	57,446
7	67,220
8	72,653
9	64,833
14	63,423
15	55,836

8.- Datos necesarios para la determinación de parámetros físico-químicos (ácido cítrico, azúcares reductores y fenoles).

Tabla 60. Datos necesarios para realizar la curva de calibración de azúcares reductores.

Concentración (g/L)	solución Patrón ($V_G \pm 0,005$) mL	Agua destilada ($V_{H_2O} \pm 0,01$) mL	Reactivo DNS ($V_{DNS} \pm 0,01$) mL
0	0,000	0,50	0,50
0,1	0,500	0,45	
0,2	0,100	0,40	
0,3	0,150	0,35	
0,4	0,200	0,30	
0,5	0,250	0,25	
0,6	0,300	0,20	
0,7	0,350	0,15	
0,8	0,400	0,10	
0,9	0,450	0,05	
1	0,500	0,00	

Tabla 61. Resultados de la curva de calibración de los azúcares reductores mediante el método DNS

Concentración de Azúcares Reductores ($C_{AR} \pm 0,02$) g/L	Absorbancia (Abs $\pm 0,01$) Adim
0,00	0,00
0,10	0,03
0,20	0,07
0,30	0,14
0,40	0,19
0,50	0,24
0,60	0,28
0,70	0,35
0,80	0,38
0,90	0,44
1,00	0,49

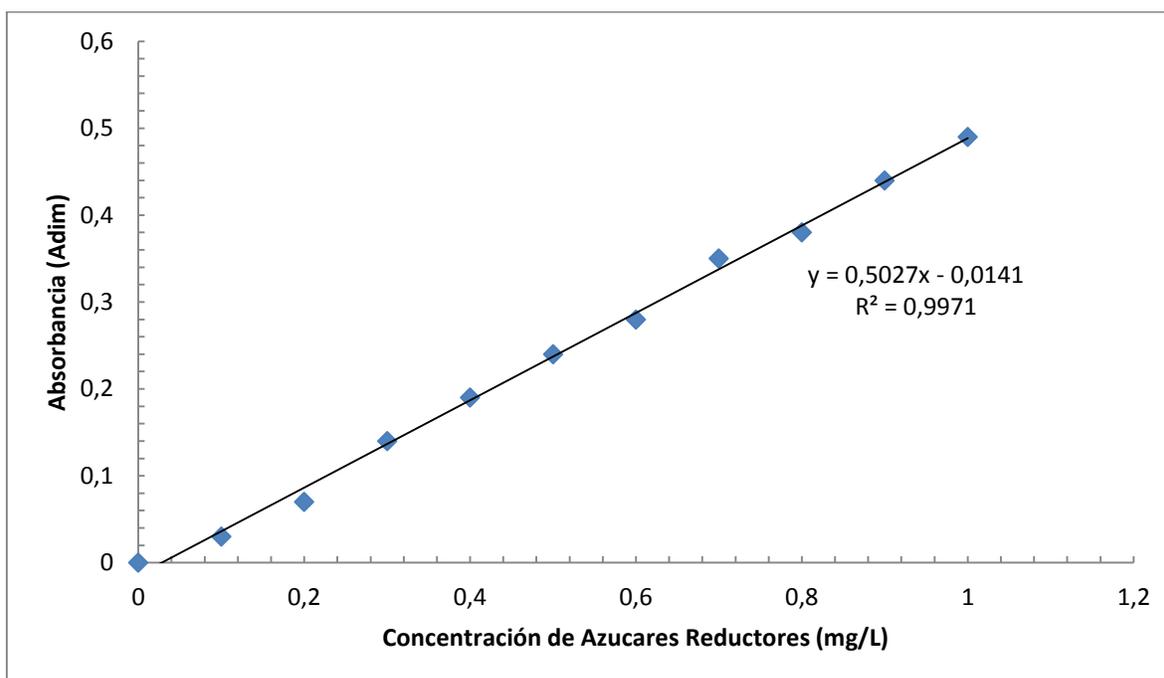


Figura 39. Curva de calibración de azúcares reductores mediante el método del DNS.

Fuente: Pedro Lugo (2016).

Tabla 62. Datos para la realización de la curva de calibración de ácido cítrico.

Concentración (mg/L)	Solución Patrón ($V_{CAC\pm}$ 0,0006) mL	Agua Destilada ($V_{H2O\pm}$ 0,001) (mL)	Anhídrido Acético (mL)	Piridina (mL)
0	0,0000	0,375	2,25	0,375
80	0,0750	0,300		
160	0,1500	0,225		
240	0,2250	0,150		
320	0,3000	0,075		
400	0,3750	0,000		

Tabla 63. Resultados de la curva de calibración de ácido cítrico mediante el método Safran-Denstedt.

Concentración de ácido cítrico ($C_{AC\pm}$ 70) mg/L	Absorbancia ($A_{AC\pm}$ 0,001) Adim
0	0,000
80	0,017
160	0,038
240	0,054
320	0,084
400	0,090

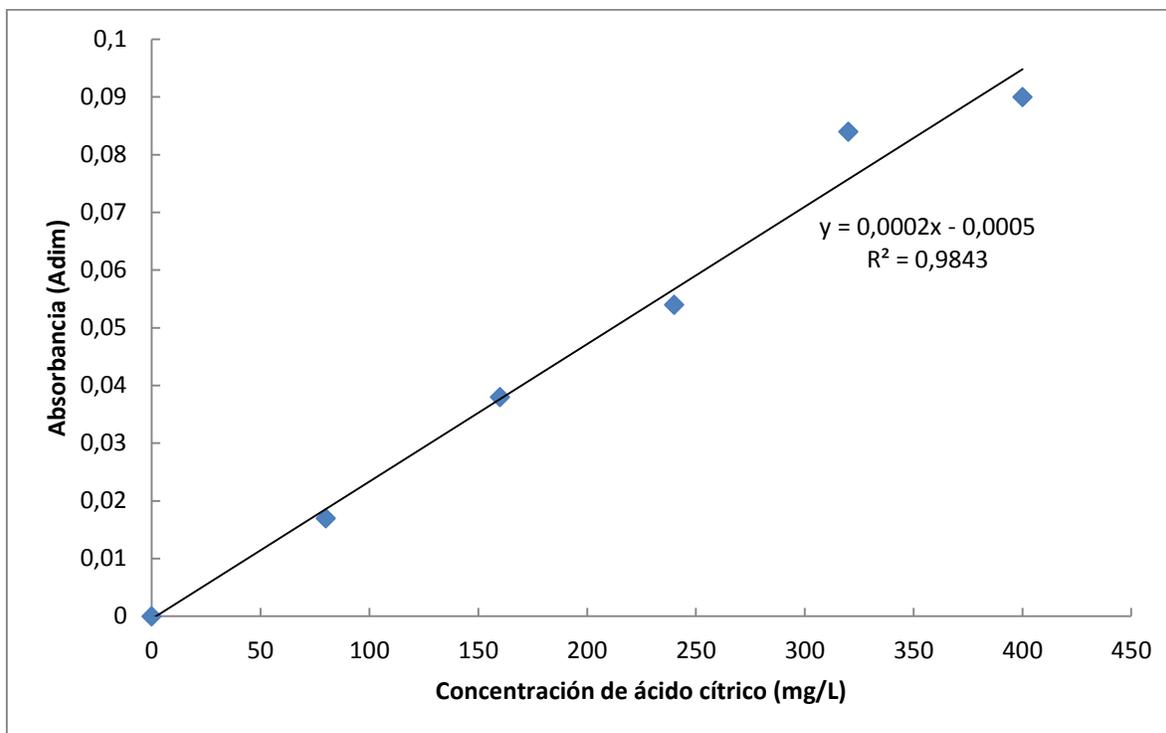


Figura 40. Curva de patrón para la determinación de ácido cítrico empleando método de Safran-Denstedt.

Fuente: Ing. Pedro Lugo (2016).

Tabla 64. Valores necesarios para construir la curva de calibración de Fenoles.

Concentración (mg/L)	Solución Patrón ($V_{CF} \pm 0,0002$) mL	Agua destilada ($V_{H_2O} \pm 0,01$) mL	Reactivo A (Gotas)	Gramos de Reactivo B	Reactivo C (Gotas)
1	0,4500	49,55	5	(cucharilla medidora)	5
2	0,9000	49,10	5		5
3	1,3000	48,70	5		5
4	1,8000	48,20	5		5
4,8	2,0200	47,98	5		5

Tabla 65. Resultados de la curva de calibración de fenoles por el método de la p-nitroanilina.

Concentración de Fenoles (C _F ± 0,2) mg/L	Absorbancia (AF ± 0,001) Adim
1,0	0,128
2,0	0,242
3,0	0,336
4,0	0,409
4,8	0,459

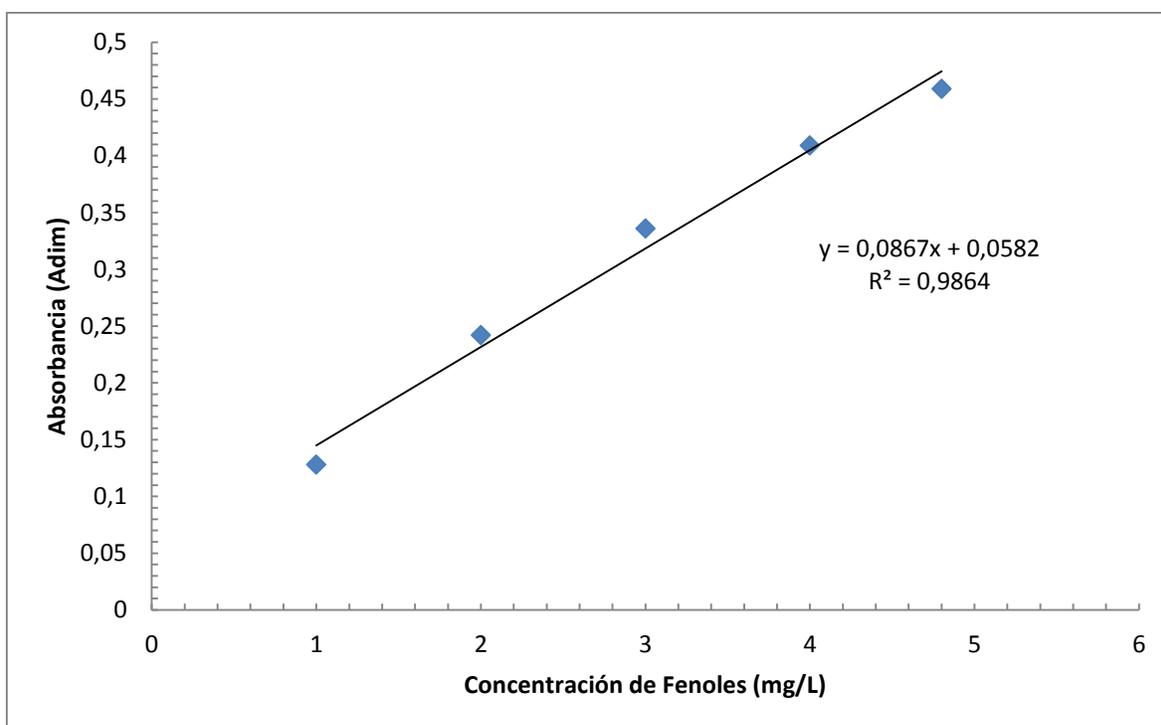


Figura 41. Curva de Calibración de fenoles por el método de la p-nitroanilina.
Fuente: Ing. Pedro Lugo (2016).

APENDICE B

CÁLCULOS TÍPICOS

- **Demanda química de oxígeno (DQO)**

$$DQO = DQO_E \cdot F_{D1}(I) \quad (\text{Clesceri, 1998})$$

Dónde:

DQO: demanda química de oxígeno (mg/L)

DQO: demanda química de oxígeno determinada por el equipo (mg/L)

F_{D1} : factor de dilución de la muestra (2000 Adim.)

Sustituyendo los respectivos valores (tabla 13) en la ecuación I resulta:

$$DQO = 526 \frac{\text{mg}}{\text{L}} * \frac{2}{0,5} = 105200 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

La incertidumbre asociada a esta magnitud depende del error instrumental del equipo, por lo tanto:

$$DQO = (105200 \pm 0,1)\text{mg/L}$$

- **Demanda biológica de oxígeno (DBO_{5días,20°C})**

$$DBO_{5días,20°C} = \frac{O_{DI} - O_{DF}}{D} \quad (\text{II}) \quad (\text{Clesceri, 1998})$$

Dónde:

DBO_{5días,20°C}: demanda biológica de oxígeno (ppm)

O_{DI} : oxígeno disuelto inicial (ppm)

O_{DF} : oxígeno disuelto final (ppm)

D: factor de dilución de la muestra (0,000303 Adim.)

Reemplazando los datos correspondientes (tabla 14) en la ecuación II se obtiene:

$$DBO_{5días,20°C} = \frac{(8,6 - 1,14)\text{ppm}}{0,000303} = 26400 \text{ ppm}$$

El error asociado se determina por la siguiente expresión:

$$\Delta \text{DBO}_{5\text{días},20^{\circ}\text{C}} = \left| \frac{\partial \text{DBO}_5}{\partial O_{\text{DI}}} \right| \cdot \Delta O_{\text{DI}} + \left| \frac{\partial \text{DBO}_5}{\partial O_{\text{DF}}} \right| \cdot \Delta O_{\text{DF}} + \left| \frac{\partial \text{DBO}_5}{\partial D} \right| \cdot \Delta D$$

De esta manera se obtiene:

$$\Delta \text{DBO}_{5\text{días},20^{\circ}\text{C}} = \left(\frac{1}{D} \right) \cdot \Delta O_{\text{DI}} + \left(\frac{1}{D} \right) \cdot \Delta O_{\text{DF}}$$

$$\begin{aligned} \Delta \text{DBO}_{5\text{días},20^{\circ}\text{C}} &= \left(\frac{1}{0,000303} \right) \cdot (0,01 \text{ ppm}) + \left(\frac{1}{0,000303} \right) \cdot (0,01 \text{ ppm}) \\ &= 66,0066 \text{ ppm} \end{aligned}$$

Por lo tanto:

$$\text{DBO}_{5\text{días},20^{\circ}\text{C}} = (26400 \pm 66) \text{ ppm}$$

- **Sólidos Fijos Totales**

$$\text{SFT} = \frac{A-B}{V} \text{ (III) (Clesceri, 1998)}$$

Dónde:

SFT: Sólidos Fijos Totales (g/L)

A: peso de la cápsula de porcelana con la muestra evaporada (g)

B: peso de la cápsula de porcelana vacía (g)

V: volumen de la muestra de vinaza (mL)

Reemplazando los respectivos datos (Tabla 17) en la ecuación III se obtiene:

$$\text{SFT} = \left(\frac{23,1956 \text{ g} - 23,1552 \text{ g}}{10 \text{ mL}} \right) \cdot \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 4,04 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

El error asociado se determina por la siguiente expresión:

$$\Delta \text{SFT} = \left| \frac{\partial \text{SFT}}{\partial A} \right| \cdot \Delta A + \left| \frac{\partial \text{SFT}}{\partial B} \right| \cdot \Delta B + \left| \frac{\partial \text{SFT}}{\partial V} \right| \cdot \Delta V$$

Al derivar parcialmente:

$$\Delta SFT = \left(\frac{1}{V}\right) \cdot \Delta A + \left(\frac{1}{V}\right) \cdot \Delta B + \left(\frac{-A + B}{V^2}\right) \cdot \Delta V$$

$$\Delta SFT = \left(\frac{1}{10 \text{ mL}}\right) \cdot (0,0001 \text{ g}) + \left(\frac{1}{10 \text{ mL}}\right) \cdot (0,0001 \text{ g}) + \left(\frac{-23,1552 \text{ g} + 23,1956 \text{ g}}{(10 \text{ mL})^2}\right) \cdot (0,01 \text{ mL})$$

$$\Delta SFT = 0,00002404 \frac{\text{g}}{\text{mL}} \cdot \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \cong 0,02 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

De esta manera resulta:

$$SFT = (4,04 \pm 0,02) \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

- **Sólidos Fijos Disueltos**

$$SDF = \frac{A-B}{V} \text{ (IV) (Clesceri, 1998)}$$

Dónde:

SDF: Sólidos Fijos Disueltos (g/L)

A: peso de la cápsula de porcelana con la muestra evaporada (g)

B: peso de la cápsula de porcelana vacía (g)

V: volumen de la muestra de vinaza (mL)

Reemplazando los respectivos datos (Tabla 18) en la ecuación IV se obtiene:

$$SDF = \left(\frac{23,6363 \text{ g} - 23,6001 \text{ g}}{10 \text{ mL}}\right) \cdot \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 3,62 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

El error asociado se determina por la siguiente expresión:

$$\Delta SDF = \left|\frac{\partial SDF}{\partial A}\right| \cdot \Delta A + \left|\frac{\partial SDF}{\partial B}\right| \cdot \Delta B + \left|\frac{\partial SDF}{\partial V}\right| \cdot \Delta V$$

Al derivar parcialmente:

$$\Delta SDF = \left(\frac{1}{V}\right) \cdot \Delta A + \left(\frac{1}{V}\right) \cdot \Delta B + \left(\frac{-A + B}{V^2}\right) \cdot \Delta V$$

$$\Delta SDF = \left(\frac{1}{10 \text{ mL}}\right) \cdot (0,0001 \text{ g}) + \left(\frac{1}{10 \text{ mL}}\right) \cdot (0,0001 \text{ g}) + \left(\frac{-23,6001 \text{ g} + 23,6363 \text{ g}}{(10 \text{ mL})^2}\right) \cdot (0,01 \text{ mL})$$

$$\Delta SDF = 0,00002362 \frac{\text{g}}{\text{mL}} \cdot \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \cong 0,02 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

De esta manera resulta:

$$SDF = (7,24 \pm 0,02) \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

- **Sólidos Suspendidos Fijos**

$$SSF = SFT - SDF(V) \text{ (Clesceri, 1998)}$$

Dónde:

SST: Sólidos Suspendidos Fijos (g/L)

SFT: Sólidos Fijos Totales (g/L)

SDF: Sólidos Disueltos Fijos (g/L)

Sustituyendo los valores de Solidos Fijos totales y Solidos Fijos Disueltos, tenemos:

$$SSF = (8,08 - 7,24) \frac{\text{g}}{\text{L}} = 0,84 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

El error asociado se determina por la siguiente expresión:

$$\Delta SSF = \left| \frac{\partial SSF}{\partial SFT} \right| \cdot \Delta SFT + \left| \frac{\partial SSF}{\partial SDF} \right| \cdot \Delta SDF$$

Al derivar parcialmente:

$$\Delta SSF = \Delta SFT - \Delta SDF$$

$$\Delta SSF = (0,08 - 0,07) \frac{g}{L} = 0,01 \frac{g}{L}$$

Finalmente:

$$SSF = (0,84 \pm 0,01) \frac{g}{L}$$

- **Sólidos totales**

$$ST = \frac{A-B}{V} (VI) \text{ (Clesceri, 1998)}$$

Dónde:

ST: solidos totales (g/L)

A: peso de la cápsula de porcelana con la muestra evaporada (g)

B: peso de la cápsula de porcelana vacía (g)

V: volumen de la muestra de vinaza (mL)

Sustituyendo los valores correspondientes (tabla 15) en la ecuación VI se obtiene:

$$ST = \frac{(59,3602 - 58,8541)g}{5 \text{ mL}} \cdot \frac{1000\text{mL}}{1\text{L}} = 101,22 \frac{g}{L}$$

El error asociado se determina por la siguiente expresión:

$$\Delta ST = \left| \frac{\partial ST}{\partial A} \right| \cdot \Delta A + \left| \frac{\partial ST}{\partial B} \right| \cdot \Delta B + \left| \frac{\partial ST}{\partial V} \right| \cdot \Delta V$$

Al derivar parcialmente:

$$\Delta ST = \left(\frac{1}{V} \right) \cdot \Delta A + \left(\frac{1}{V} \right) \cdot \Delta B + \left(\frac{-A + B}{V^2} \right) \cdot \Delta V$$

$$\Delta ST = \left(\frac{1}{5 \text{ mL}}\right) \cdot (0,0001 \text{ g}) + \left(\frac{1}{5 \text{ mL}}\right) \cdot (0,0001 \text{ g}) + \left(\frac{-58,8541 \text{ g} + 59,3602 \text{ g}}{(5 \text{ mL})^2}\right) \cdot (0,01 \text{ mL})$$

$$\Delta ST = 0,0005461 \frac{\text{g}}{\text{mL}} \cdot \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \cong 0,54 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

Finalmente:

$$ST = (101,22 \pm 0,54) \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

- **Sólidos Disueltos totales**

$$SDT = \frac{A-B}{V} \text{ (VII) (Clesceri, 1998)}$$

Dónde:

ST: solidos disueltos totales (g/mL)

A: peso de la cápsula de porcelana con la muestra evaporada (g)

B: peso de la cápsula de porcelana vacía (g)

V: volumen de la muestra de vinaza (mL)

Sustituyendo los valores correspondientes (tabla 16) en la ecuación VII se obtiene:

$$SDT = \frac{(26,2266 - 25,7295) \text{ g}}{5 \text{ mL}} \cdot \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 99,420 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

El error asociado se determina por la siguiente expresión:

$$\Delta SDT = \left| \frac{\partial ST}{\partial A} \right| \cdot \Delta A + \left| \frac{\partial ST}{\partial B} \right| \cdot \Delta B + \left| \frac{\partial ST}{\partial V} \right| \cdot \Delta V$$

Al derivar parcialmente:

$$\Delta SDT = \left(\frac{1}{V}\right) \cdot \Delta A + \left(\frac{1}{V}\right) \cdot \Delta B + \left(\frac{-A + B}{V^2}\right) \cdot \Delta V$$

$$\Delta\text{SDT} = \left(\frac{1}{5 \text{ mL}}\right) \cdot (0,0001 \text{ g}) + \left(\frac{1}{5 \text{ mL}}\right) \cdot (0,0001 \text{ g}) + \left(\frac{-25,7295 \text{ g} + 26,2266\text{g}}{(5 \text{ mL})^2}\right) \cdot (0,01 \text{ mL})$$

$$\Delta\text{SDT} = 0,0005371 \frac{\text{g}}{\text{mL}} \cdot \frac{1000\text{mL}}{1\text{L}} \cong 0,5 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

Finalmente:

$$\text{SDT} = (99,4 \pm 0,5) \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

- **Sólidos Suspendidos totales**

$$\text{SST} = \text{ST} - \text{SDT}(\text{VIII})$$

Dónde:

SST: Sólidos disueltos totales (g/L)

SFT: Sólidos Totales (g/L)

SDT: Sólidos Disueltos Totales (g/L)

Sustituyendo los valores de Solidos Fijos totales y Solidos Fijos Disueltos, tenemos:

$$\text{SSF} = (101,2 - 99,4) \frac{\text{g}}{\text{L}} = 1,8 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

El error asociado se determina por la siguiente expresión:

$$\Delta\text{SSF} = \left| \frac{\partial\text{SST}}{\partial\text{ST}} \right| \cdot \Delta\text{ST} + \left| \frac{\partial\text{SST}}{\partial\text{SDT}} \right| \cdot \Delta\text{SDT}$$

Al derivar parcialmente:

$$\Delta\text{SSF} = \Delta\text{SFT} - \Delta\text{SDF}$$

$$\Delta \text{SSF} = (0,54 - 0,5) \frac{\text{g}}{\text{L}} = 0,01 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

Finalmente:

$$\text{SSF} = (1,80 \pm 0,01) \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

- **Nitrógeno total**

$$N = \left(\frac{V_1 \cdot C_1 \cdot 14}{V_2} \right) \cdot 100 \text{ (IX) (Harris, 2003)}$$

Dónde:

N: nitrógeno total (%)

V₁: volumen de ácido sulfúrico (mL)

C₁: concentración del ácido sulfúrico (mol/L)

V₂: volumen de la muestra de vinaza (mL)

14: peso molecular del nitrógeno (g/mol)

Reemplazando los datos correspondientes (tabla 20) en la ecuación IX se tiene:

$$N = \left(\frac{1,3 \text{ mL} \cdot 0,02 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 14 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{50 \text{ mL}} \right) \cdot 1000 = 420 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

El error relacionado a esta magnitud se obtiene por la siguiente expresión:

$$\Delta N = \left| \frac{\partial N}{\partial V_1} \right| \cdot \Delta V_1 + \left| \frac{\partial N}{\partial C_1} \right| \cdot \Delta C_1 + \left| \frac{\partial N}{\partial V_2} \right| \cdot \Delta V_2$$

Al derivar parcialmente resulta:

$$\Delta N = \left(\frac{C_1 \cdot 14}{V_2} \right) \cdot \Delta V_1 + \left(\frac{V_1 \cdot 14}{V_2} \right) \cdot \Delta C_1 + \left(\frac{V_1 \cdot C_1 \cdot 14}{V_2^2} \right) \cdot \Delta V_2$$

$$\Delta N = \left(\frac{0,02 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 14 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{50 \text{ mL}} \right) \cdot (0,05 \text{ mL}) + \left(\frac{1,3 \text{ mL} \cdot 14 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{50 \text{ mL}} \right) \cdot \left(0 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \\ + \left(\frac{1,3 \text{ mL} \cdot 0,02 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot 14 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{(50 \text{ mL})^2} \right) \cdot (0,01 \text{ mL})$$

$$\Delta N = 0,281 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \cong 0,3 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

De esta manera se tiene:

$$N = (420 \pm 0,3) \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

- **Volumen de la solución madre de Glucosa**

$$V_{ci} = \frac{V_{di} \cdot C_{di}}{C_{ci}} \text{ (IX) (Harris, 2003)}$$

Dónde:

V_c : volumen de la solución madre (mL)

C_G : concentración de la solución madre de Glucosa (mg/L)

V_d : volumen de la solución diluida (mL)

C_d : concentración de la solución diluida (mg/L)

Al sustituir los valores correspondientes (tabla 60) en la ecuación IX para preparar una solución de Glucosa de 1 g/L se obtiene:

$$V_G = \frac{0,5 \text{ mL} \cdot 0,1 \frac{\text{g}}{\text{L}}}{1 \frac{\text{g}}{\text{L}}}$$

$$V_G = 0,05 \text{ mL}$$

El error relacionado a esta magnitud se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$\Delta V_G = \left| \frac{\partial V_{ca}}{\partial V_{dc}} \right| \cdot \Delta V_{da} + \left| \frac{\partial V_{ca}}{\partial C_{da}} \right| \cdot \Delta C_{da} + \left| \frac{\partial V_{ca}}{\partial C_{ca}} \right| \cdot \Delta C_{ca}$$

Al derivar la expresión anterior se tiene:

$$\Delta V_G = \left(\frac{C_{da}}{C_{ca}} \right) \cdot \Delta V_{da} + \left(\frac{V_{da}}{C_{ca}} \right) \cdot \Delta C_{da} - \left(\frac{V_{da} \cdot C_{da}}{C_{ca}^2} \right) \cdot \Delta C_{ca}$$

$$\Delta V_G = \left(\frac{0,1 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}{1 \frac{\text{mg}}{\text{L}}} \right) \cdot (0,01 \text{ mL}) + \left(\frac{50 \text{ mL}}{111,1 \frac{\text{mg}}{\text{L}}} \right) \cdot \left(0 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) - \left(\frac{50 \text{ mL} \cdot 1 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}{\left(111,1 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)^2} \right) \cdot \left(0 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)$$

$$\Delta V_G = 0,001 \text{ mL}$$

Finalmente:

$$V_G = (0,050 \pm 0,001) \text{ mL}$$

- **Concentración de Azúcares Reductores en función de glucosa**

$$C_{AR} = \left(\frac{A_{AR} + 0,0141}{0,5027} \right) \cdot F_{d2} (X)$$

Dónde:

C_{AR} : concentración de Azúcares Reductores (g/L)

A_{AR} : absorbancia leída para la solución con glucosa (Adim.)

F_d : factor de dilución (50 Adim.)

Para una Absorbancia de 0,24 en la ecuación X resulta:

$$C_{AR} = \left(\frac{0,24 - 0,022}{0,0073} \right) \cdot 50 = (0,5054) \cdot 50 = 25,2735 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

El error asociado a los valores obtenidos a partir de curvas de calibración, se calculan a partir de la siguiente expresión:

$$\Delta x_i = \frac{s_y}{|m|} \cdot \sqrt{\frac{1}{k} + \frac{x_i^2 \cdot n}{D} + \frac{\sum(x_i^2)}{D} - \frac{2x_i \cdot \sum x_i}{D}} \text{(Harris, 2003)}$$

Dónde:

Δx_i : error asociado a la variable independiente

s_y : desviación estándar de la variable dependiente

m : valor absoluto de la pendiente de la ecuación de la recta

k : número de medidas replicadas

x : valores de la variable independiente

n : número de puntos

D : determinante asociado a la variable independiente y el número de puntos

Las magnitudes relacionadas a la ecuación anterior se calculan a partir de las siguientes ecuaciones:

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum(d_i^2)}{n-2}} \text{(Harris, 2003)}$$

$$d_i^2 = (y_i - mx_i - b)^2 \text{(Harris, 2003)}$$

$$D = \begin{vmatrix} \sum(x_i^2) & \sum x_i \\ \sum x_i & n \end{vmatrix} = (\sum(x_i^2) \cdot n) - (\sum x_i \cdot \sum x_i) \text{(Harris, 2003)}$$

Dónde:

d : desviación vertical

$n-2$: grados de libertad

Los valores necesarios para determinar D , d_i y s_y se encuentran en la tabla 60 y la figura 46, donde la variable independiente representa la concentración de glucosa para las diferentes soluciones preparadas, mientras que la variable dependiente corresponde a la absorbancia medida para cada uno de ellas. De esta manera al sustituir estos datos en las ecuaciones anteriores se obtiene:

$$s_y = \sqrt{\frac{0,001808}{11 - 2}} \cong 0,0094$$

$$d_i = (0,24 - 0,5027 \cdot (0) - (-0,0141)) = 0,00275$$

$$d_i^2 = (0,00275)^2 = 0,00000756$$

$$D = 11 \cdot (3,85) - (5,5 \cdot 5,5) = 12,1$$

Finalmente, al reemplazar en la ecuación de Δx_i los datos calculados el error referido a la concentración de glucosa resulta:

$$\Delta C_{AR} = \frac{0,0094}{0,5027} \cdot \sqrt{\frac{1}{1} + \frac{(0,5054)^2 \cdot 11}{12,1} + \frac{3,85}{12,1} - \frac{2 \cdot 0,5054 \cdot 5,5}{12,1}}$$

$$\Delta C_{AR} = 0,01971 \frac{\text{g}}{\text{L}} \cong 0,02 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

Por lo tanto:

$$C_{AR} = (25,27 \pm 0,02) \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

- **Volumen de la solución madre de Ácido Cítrico**

$$V_{ci} = \frac{V_{di} \cdot C_{di}}{C_{ci}} \text{ (XI) (Harris, 2003)}$$

Dónde:

V_c : volumen de la solución madre (mL)

C_{CAC} : concentración de la solución madre de ácido cítrico (mg/L)

V_d : volumen de la solución diluida (mL)

C_d : concentración de la solución diluida (mg/L)

i: sustancia

Al sustituir los valores correspondientes (tabla 62) en la ecuación XI para preparar una solución de ácido cítrico de 400 mg/L se obtiene:

:

$$V_{CAC} = \frac{0,375 \text{ mL} \cdot 80 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}{400 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}$$

$$V_{CAC} = 0,075 \text{ mL}$$

El error relacionado a esta magnitud se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$\Delta V_{ca} = \left| \frac{\partial V_{ca}}{\partial V_{dc}} \right| \cdot \Delta V_{da} + \left| \frac{\partial V_{ca}}{\partial C_{da}} \right| \cdot \Delta C_{da} + \left| \frac{\partial V_{ca}}{\partial C_{ca}} \right| \cdot \Delta C_{ca}$$

Al derivar la expresión anterior se tiene:

$$\Delta V_{ca} = \left(\frac{C_{da}}{C_{ca}} \right) \cdot \Delta V_{da} + \left(\frac{V_{da}}{C_{ca}} \right) \cdot \Delta C_{da} - \left(\frac{V_{da} \cdot C_{da}}{C_{ca}^2} \right) \cdot \Delta C_{ca}$$

$$\Delta V_{CAC} = \left(\frac{80 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}{400 \frac{\text{mg}}{\text{L}}} \right) \cdot (0,001 \text{ mL}) + \left(\frac{50 \text{ mL}}{111,1 \frac{\text{mg}}{\text{L}}} \right) \cdot \left(0 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) - \left(\frac{50 \text{ mL} \cdot 1 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}{\left(111,1 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)^2} \right) \cdot \left(0 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)$$

$$\Delta V_{CAC} = 0,0002 \text{ mL}$$

Finalmente:

$$V_{CAC} = (0,0750 \pm 0,0002) \text{ mL}$$

- **Concentración de Ácido Cítrico**

$$C_{AC} = \left(\frac{A_{AC} + 0,0141}{0,5027} \right) \cdot F_{d2} \cdot F_c \text{ (XII)}$$

Dónde:

C_{AC} : concentración de Ácido Cítrico (g/L)

A_{AC} : absorbancia leída para la solución de Ácido Cítrico (Adim.)

F_d : factor de dilución (50 Adim.)

F_c : factor de conversión 1 (0,001 g/mg)

Para una Absorbancia de 0,24 en la ecuación VI resulta:

$$C_{AC} = \left(\frac{0,038 + 0,0005}{0,0002} \right) \cdot 50 \cdot \left(0,001 \frac{\text{g}}{\text{mg}} \right) = \left(\frac{192,5 \text{mg}}{\text{L}} \right) \cdot 50 \cdot \left(0,0001 \frac{\text{g}}{\text{mg}} \right) = 9,625 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

El error asociado a los valores obtenidos a partir de curvas de calibración, se calculan a partir de la siguiente expresión:

$$\Delta x_i = \frac{s_y}{|m|} \cdot \sqrt{\frac{1}{k} + \frac{x_i^2 \cdot n}{D} + \frac{\sum(x_i^2)}{D} - \frac{2x_i \cdot \sum x_i}{D}} \text{(Harris, 2003)}$$

Dónde:

Δx_i : error asociado a la variable independiente

s_y : desviación estándar de la variable dependiente

m : valor absoluto de la pendiente de la ecuación de la recta

k : número de medidas replicadas

x : valores de la variable independiente

n : número de puntos

D : determinante asociado a la variable independiente y el número de puntos

Las magnitudes relacionadas a la ecuación anterior se calculan a partir de las siguientes ecuaciones:

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum(d_i^2)}{n-2}} \text{(Harris, 2003)}$$

$$d_i^2 = (y_i - mx_i - b)^2 \text{(Harris, 2003)}$$

$$D = \begin{vmatrix} \sum(x_i^2) & \sum x_i \\ \sum x_i & n \end{vmatrix} = (\sum(x_i^2) \cdot n) - (\sum x_i \cdot \sum x_i) \text{(Harris, 2003)}$$

Dónde:

d : desviación vertical

$n-2$: grados de libertad

Los valores necesarios para determinar D , d_i y s_y se encuentran en la tabla 62 y la figura 47, donde la variable independiente representa la concentración de ácido cítrico para las diferentes soluciones preparadas, mientras que la variable

dependiente corresponde a la absorbancia medida para cada uno de ellas. De esta manera al sustituir estos datos en las ecuaciones anteriores se obtiene:

$$s_y = \sqrt{\frac{0,001808}{6-2}} \cong 0,0124$$

$$d_i = (0,038 - 0,0002 \cdot (160) - (-0,0005)) = 0,0065$$

$$d_i^2 = (0,0065)^2 = 0,00004225$$

$$D = 6 \cdot (352000) - (1200 \cdot 1200) = 672000$$

Finalmente, al reemplazar en la ecuación de Δx_i los datos calculados el error referido a la concentración de ácido cítrico resulta:

$$\Delta C_{AC} = \frac{0,0124}{0,0002} \cdot \sqrt{\frac{1}{1} + \frac{(192,5)^2 \cdot 6}{672000} + \frac{352000}{672000} - \frac{2 \cdot 192,5 \cdot 1200}{672000}}$$

$$\Delta C_{AC} = 0,006711 \frac{g}{L} \cong 0,007 \frac{g}{L}$$

Por lo tanto:

$$C_{Ac} = (9,625 \pm 0,007) \frac{g}{L}$$

- **Concentración de Ácido Cítrico por acidez titulable**

$$C_{ACT} = \left(\frac{V_{gNaOH} \cdot C_{NaOH}}{V_m} \right) \cdot Fc \text{ (XIII)}$$

Dónde:

C_{ACT} : concentración de Ácido Cítrico por acidez titulable (g/L)

V_{gNaOH} : Volumen gastado de NaOH(mL)

C_{ACT} : concentración de NaOH (N)

V_m : Volumen de la muestra(mL)

V_m : Factor de conversión (64g/mol)

Para una Absorbancia de 0,24 en la ecuación XIII resulta:

$$C_{ACT} = \left(\frac{0,3 \text{ mL} \cdot (0,1 \text{ N})}{5 \text{ mL}} \right) \cdot 64 = 0,384 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

El error relacionado a esta magnitud se obtiene por la siguiente expresión:

$$\Delta C_{ACT} = \left| \frac{\partial C_{ACT}}{\partial V_{g\text{NaOH}}} \right| \cdot \Delta V_{g\text{NaOH}} + \left| \frac{\partial C_{ACT}}{\partial C_{\text{NaOH}}} \right| \cdot \Delta C_{\text{NaOH}} + \left| \frac{\partial C_{ACT}}{\partial V_m} \right| \cdot \Delta V_m$$

Al derivar parcialmente resulta:

$$\Delta C_{ACT} = \left(\frac{C_{\text{NaOH}}}{V_m} \right) \cdot \Delta V_{g\text{NaOH}} + \left(\frac{V_{g\text{NaOH}}}{V_m} \right) \cdot \Delta C_{\text{NaOH}} + \left(\frac{V_{g\text{NaOH}} \cdot C_{\text{NaOH}}}{V_m^2} \right) \cdot \Delta V_m$$

$$\Delta C_{ACT} = \left(\frac{0,1 \text{ N} \cdot 64}{5 \text{ mL}} \right) \cdot (0,05 \text{ mL}) + \left(\frac{0,3 \text{ mL} \cdot 64}{5 \text{ mL}} \right) \cdot (0 \text{ N}) + \left(\frac{0,3 \text{ mL} \cdot 0,1 \text{ N} \cdot 64}{(5 \text{ mL})^2} \right) \cdot (0,01 \text{ mL})$$

$$\Delta C_{ACT} = 0,064 \frac{\text{g}}{\text{L}} \cong 0,06 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

De esta manera se tiene:

$$C_{ACT} = (0,38 \pm 0,06) \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

- **Volumen de la solución madre de Fenoles**

$$V_{ci} = \frac{V_{di} \cdot C_{di}}{C_{ci}} \text{ (XIV) (Harris, 2003)}$$

Dónde:

V_c : volumen de la solución madre (mL)

C_c : concentración de la solución madre (mg/L)

V_d : volumen de la solución diluida (mL)

C_d : concentración de la solución diluida (mg/L)

i : sustancia

Al sustituir los valores correspondientes (tabla 64) en la ecuación XIV, tenemos:

$$V_{CF} = \frac{49,55 \text{ mL} \cdot 1 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}{111,1 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}$$

$$V_{CF} = 0,4459946 \text{ mL}$$

El error relacionado a esta magnitud se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$\Delta V_{ca} = \left| \frac{\partial V_{ca}}{\partial V_{dc}} \right| \cdot \Delta V_{da} + \left| \frac{\partial V_{ca}}{\partial C_{da}} \right| \cdot \Delta C_{da} + \left| \frac{\partial V_{ca}}{\partial C_{ca}} \right| \cdot \Delta C_{ca}$$

Al derivar la expresión anterior se tiene:

$$\Delta V_{ca} = \left(\frac{C_{da}}{C_{ca}} \right) \cdot \Delta V_{da} + \left(\frac{V_{da}}{C_{ca}} \right) \cdot \Delta C_{da} - \left(\frac{V_{da} \cdot C_{da}}{C_{ca}^2} \right) \cdot \Delta C_{ca}$$

$$\Delta V_{ca} = \left(\frac{1 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}{111,1 \frac{\text{mg}}{\text{L}}} \right) \cdot (0,1 \text{ mL}) + \left(\frac{50 \text{ mL}}{111,1 \frac{\text{mg}}{\text{L}}} \right) \cdot \left(0 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) - \left(\frac{50 \text{ mL} \cdot 1 \frac{\text{mg}}{\text{L}}}{\left(111,1 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)^2} \right) \cdot \left(0 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)$$

$$\Delta V_{ca} = 0,0009 \text{ mL} \cong 0,001 \text{ mL}$$

Finalmente:

$$V_{ca} = (0,445 \pm 0,001) \text{ mL}$$

- **Concentración de Fenoles**

$$C_F = \left(\frac{A_F - 0,0582}{0,0867} \right) \cdot F_d \cdot F_c \text{ (XV)}$$

Dónde:

C_{AC} : concentración de Ácido Cítrico (g/L)

A_{AC} : absorbancia leída para la solución de Ácido Cítrico (Adim.)

F_d : factor de dilución (50 Adim.)

F_c : factor de conversión 1 (0,001 g/mg)

Para una Absorbancia de 0,336 en la ecuación XV resulta:

$$C_F = \left(\frac{0,336 + 0,0582}{0,0867} \right) \cdot 50 \cdot \left(0,001 \frac{\text{g}}{\text{mg}} \right) = \left(\frac{3,2041 \text{mg}}{\text{L}} \right) \cdot 50 \cdot \left(0,0001 \frac{\text{g}}{\text{mg}} \right) = 0,16020 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

El error asociado a los valores obtenidos a partir de curvas de calibración, se calculan a partir de la siguiente expresión:

$$\Delta x_i = \frac{s_y}{|m|} \cdot \sqrt{\frac{1}{k} + \frac{x_i^2 \cdot n}{D} + \frac{\sum(x_i^2)}{D} - \frac{2x_i \cdot \sum x_i}{D}} \text{ (Harris, 2003)}$$

Dónde:

Δx_i : error asociado a la variable independiente

s_y : desviación estándar de la variable dependiente

m : valor absoluto de la pendiente de la ecuación de la recta

k : número de medidas replicadas

x : valores de la variable independiente

n : número de puntos

D : determinante asociado a la variable independiente y el número de puntos

Las magnitudes relacionadas a la ecuación anterior se calculan a partir de las siguientes ecuaciones:

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum(d_i^2)}{n-2}} \text{ (Harris, 2003)}$$

$$d_i^2 = (y_i - mx_i - b)^2 \text{ (Harris, 2003)}$$

$$D = \left| \frac{\sum(x_i^2)}{\sum x_i} \cdot \frac{\sum x_i}{n} \right| = (\sum(x_i^2) \cdot n) - (\sum x_i \cdot \sum x_i) \text{ (Harris, 2003)}$$

Dónde:

d: desviación vertical

n-2: grados de libertad

Los valores necesarios para determinar D, di y sy se encuentran en la tabla 64 y la figura 48, donde la variable independiente representa la concentración de fenoles para las diferentes soluciones preparadas, mientras que la variable dependiente corresponde a la absorbancia medida para cada uno de ellas. De esta manera al sustituir estos datos en las ecuaciones anteriores se obtiene:

$$s_y = \sqrt{\frac{0,0009589}{5 - 2}} \cong 0,0178$$

$$d_i = (0,336 - 0,0867 \cdot (3) - (0,0582)) = 0,0177$$

$$d_i^2 = (0,0177)^2 = 0,0003132$$

$$D = 5 \cdot (52,04) - (14,8 \cdot 14,8) = 46,16$$

Finalmente, al reemplazar en la ecuación de Δx_i los datos calculados el error referido a la concentración de fenoles resulta:

$$\Delta C_F = \frac{0,0178}{0,0867} \cdot \sqrt{\frac{1}{1} + \frac{(3,2041)^2 \cdot 5}{46,16} + \frac{52,04}{46,16} - \frac{2 \cdot 3,2041 \cdot 14,8}{46,16}}$$

$$\Delta C_F = 0,0002265 \frac{g}{L} \cong 0,0002 \frac{g}{L}$$

Por lo tanto:

$$C_F = (0,1602 \pm 0,0002) \frac{g}{L}$$

- **Biomasa**

$$C_{Bio} = \frac{A-B}{V} \text{ (XVI) (Clesceri, 1998)}$$

Dónde:

C_{Bio} : Concentración de Biomasa (g/L)

A: peso del papel filtro con la muestra evaporada (g)

B: peso del papel filtro seco sin muestra (g)

V: volumen de la muestra de vinaza (mL)

Sustituyendo los valores correspondientes (tabla 59) en la ecuación IV se obtiene:

$$C_{Bio} = \frac{(1,0483 - 0,7843)g}{20 \text{ mL}} \cdot \frac{1000mg}{g} \cdot \frac{1000mL}{L} = 29,8333 \frac{mg}{L}$$

El error asociado se determina por la siguiente expresión:

$$\Delta C_{Bio} = \left| \frac{\partial C_{Bio}}{\partial A} \right| \cdot \Delta A + \left| \frac{\partial C_{Bio}}{\partial B} \right| \cdot \Delta B + \left| \frac{\partial C_{Bio}}{\partial V} \right| \cdot \Delta V$$

Al derivar parcialmente:

$$\Delta C_{Bio} = \left(\frac{1}{V} \right) \cdot \Delta A + \left(\frac{1}{V} \right) \cdot \Delta B + \left(\frac{-A + B}{V^2} \right) \cdot \Delta V$$

$$\Delta C_{Bio} = \left(\frac{1}{20 \text{ mL}} \right) \cdot (0,0001 \text{ g}) + \left(\frac{1}{20 \text{ mL}} \right) \cdot (0,0001 \text{ g}) + \left(\frac{-1,0483 \text{ g} + 0,7843 \text{ g}}{(20 \text{ mL})^2} \right) \cdot (0,01 \text{ mL})$$

$$\Delta C_{Bio} = 0,0001534 \frac{g}{mL} \cdot \frac{1000mL}{1L} \cong 0,009 \frac{g}{L}$$

Finalmente:

$$C_{Bio} = (29,833 \pm 0,009) \frac{g}{mL}$$

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAI. P., Bhatt C. y Viswanathan. L. (1983). **Effect of some metabolic inhibitors on citric acid production by *Aspergillus niger***. *Enzyme and Microbial Technology*. 5:373-376.
- AHMED, S., Smith, J. y Anderson, J. 1972. **Mitochondrial activity during citric acid production by *Aspergillus niger***. *Transactions of the British Mycological Society*. 59: 51-61.
- AMIR S., M. Hafidi, G. Merlina y J.C. De Revel. (2005). **Structural characterization of fulvic acids during composting of sewage sludge**. *Process Biochemistry* 40(5):1693-1700.
- ALVAREZ F., Gonzales. C. y Torres. N. (2000). **Metabolism of citric acid production by *Aspergillus niger* model definition, steady state analysis and constrained optimization of citric acid production rate**. *Biotechnology and Bioengineering*. 70:82-108.
- AUTA H., Abidoye K., Tahir H., Ibrahim A. y Aransiola S. (2014). **Citric Acid Production by *Aspergillus niger* Cultivated on *Parkia biglobosa* Fruit Pulp**. *Hindawi Publishing Corporation. International Scholarly Research Notices. Volume 2014, Article ID 762021, 8 pages*.

BAKHJET S. y Mokhtar E. (2015). **Production of Citric Acid by *Aspergillus niger* Using Sugarcane Molasses as Substrat.** [Documento en línea]. Disponible en: [http://jjbs.hu.edu.jo/files/v8n3/Paper%20 Number%208m.pdf](http://jjbs.hu.edu.jo/files/v8n3/Paper%20Number%208m.pdf) [Consulta: 20/10/2015].

BALDIRIS,L., López, E., Castillo,J., y Caicedo L. (2012). **Biodegradación de la vinaza de caña de azúcar con cepas de los hongos *Schyzophyllum commune* y *Trichoderma viride*.** [Documento en línea]. Disponible en:<http://revistas.usc.edu.co/index.php/Ingenium/article/viewFile/191/176> [Consulta: 12/08/2015].

BASTOS, R., Morais, D. y Volpi, M.(2015). **Influence of solid moisture and bed height on cultivation of *Aspergillus niger* from sugarcane bagasse with vinasse.** Brazilian Journal Of Chemical Engineering 32, 337-384.

BODDY L., Berges T., Barreau C., Vainstain M., Jobson, M., Balance, D., y Peberdy, J. (1993). **Purification and characterization of an *Aspergillus niger* invertase and its DNA sequence.** Current Genetics. 24:60-66.

BRIGNOLI, P.1993. **Biotechnologie.** Quaderni Andrómeda. Dimensión Natura. 3(4). Italia.

CHANDRA, R.; Bharagava, R. N. & Rai, V. (2008). **Melanoidins as major colourant in sugarcane molasses based distillery effluent and its degradation.** Bioresource Technology, (99), 4648-4660.

CHAVES, M. (1985). **LAS VINAZAS EN LA FERTILIZACION DE LA CAÑA DE AZUCAR**. Trabajo Publicado por DIECA en Boletín Informativo No. 21. Año 3. 1985 y El Agricultor Costarricense. 43 (3-4): 59-61. 1985.

CLARK, D., Ito, K. y Tymchuk. (1965). **Effect of potassium ferrocyanide on the chemical composition of molasses mash used in the citric acid fermentation**. Biotechnology and Bioengineering. 7:269-278.

CLESCERI, L. (1998). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Washington D.C: Editorial American Public Health Association.

CRUEGER, W. y Crueger, A. (1989). **Biotechnology: A textbook of industrial Microbiology**. Second Edition. Ed Thomas D. Brock p134.

CURRIE, J. N. (1947). **The citric acid fermentation of *Aspergillus niger***. Journal of Biological Chemistry. 31:15.

DAROUNEH, E., Alavi, A., Vosoughi, M., Arjmand, M., Seifkordi A. y Rajabi, R. (2009). **Citric acid production: Surface culture versus submerged culture**. [Documento en línea]. Disponible en:http://www.academicjournals.org/article/article1380285527_Darouneh%20et%20al.pdf [Consulta: 12/07/2016].

DECRETO 883. (1995). **Normas para la Clasificación y el Control de la Calidad de los Cuerpos de Agua y Vertidos o Efluentes Líquidos**. Gaceta oficial N° 5.021.

DOELGER, W., y Prescott, S.(1934). **Acid Citric Fermentation**. Industrial Engineering. Chemistry, 26, pp. 1142-1149.

ELIZONDO, L., y Manzanares, R. (2009). **Obtención de ácido cítrico por medio de fermentación sumergida a partir de Aspergillus nigeratcc 16404 utilizando suero de leche como medio de cultivo de fermentación**. [Documento en línea]. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/2608/1/16101588.pdf>[Consulta: 12/08/2015].

EVANS, C, Scragg A. y Ratledge, C. (1983). **A comparative study of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and non oleaginous yeasts**. European Journal of Biochemistry. 130: 195- 204.

FERREIRA, L. F. R. (2009). **Fungi biodegradation of vinasse from industrial sugarcane processing**.Thesis. Brazil: University of Sao Paulo - ESALQ.

GARASSINI. L., (1964). **Microbiología Tecnológica**. Ediciones De la Biblioteca de la Universidad Central de Venezuela. pp: 143-148

GARIBAY, M., Ramirez R. y Canales A. (2004). **Biología alimentaria**. [Libro en línea]. Disponible en: https://books.google.co.ve/books?id=2ctdvBnTa18C&pg=PA556&lpg=PA556&dq=bacterias+productoras+de+acido+citrico&source=bl&ots=_qA61itGwh&sig=I60fwJUizuNQwbwy9X9jN3Pk68w&hl=es&sa=X&ved=0CBsQ6AEwAGoVChMlveCF8_OuyAIVDG0-

Ch19TAAI#v=onepage&q=bacterias%20productoras%20de%20acido%20citrico&f=false [Consulta: 12/08/2015].

GARCÍA, A., y Rojas, C. (2005). **Posibilidades de Uso de la Vinaza en la Agricultura de Acuerdo con su Modo de Acción en los Suelos.** [Documento en línea]. *Disponible en:* http://www.tecnicana.org/pdf/2006/tec_v10_no17_2006_p3-13.pdf [Consulta: 10/08/2015].

GOMEZ, R., Schnabel, I., y Garrido, J. (1988). **Factores que afectan la producción de ácido cítrico en cultivo sumergido por Aspergillus niger 110.** [Documento en línea]. *Disponible en:* <http://elfosscientiae.cigb.edu.cu/PDFs/Biotecnol%20Apl/1988/5/1/p%2018%20-%2030%20.pdf> [Consulta: 15/08/2015].

HAQ. I., Ali. S., Qadeer. M. y Iqbal. J. (2002). **Effect of copper ions on mould morphology and citric acid productivity by Aspergillus niger using molasses based medium.** *Process Biochemistry.* 37:1085-1090.

HARRIS, D. (2003). **Análisis químico cuantitativo.** España: Editorial Reverté.

HERNÁNDEZ, I. (2002). **La influencia del alcohol en la Sociedad.** [Documento en línea]. *Disponible en:* <http://www.euskomedia.org/PDFAnlt/osasunaz/05/05177190.pdf> [Consulta: 10/08/2015].

HERNÁNDEZ, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2006). **Metodología de la investigación**. México: McGraw-Hill/Interamericana editores, S.A.

HOSSAIN. M., Brooks. J. y Maddox. I. (1984). **The effect of sugar source on citric acid production by *Aspergillus niger***. Applied Microbiology and Biotechnology 19:393-397.

HOSSAIN. M., Brooks. J. y Maddox. I. (1985). **Galactose inhibition of citric acid production from glucose by *Aspergillus niger***. Applied Microbiology and Biotechnology. 22:98-102.

JERNEJC, K., A. Cimerman, A. Perdih. (1982). **Citric acid production in chemically defined media by *Aspergillus niger***. Applied microbiology and biotechnology 14:29–33.

JERNEJC, K., Perdih, A. y Cimerman, A. (1992). **Biochemical composition of *Aspergillus niger* mycelium grown in citric acid productive and no productive conditions**. Journal of Biotechnology. 25: 341-8.

KAPOOR. K., Chaudary. K., Tauro. P. (1983). **Acid Citric in: Prescott and Dunn`s Industrial Microbiology**. UK: MacMillan Publishers Ltd, p: 709-747.

KARAFFA, L. y Kubiceck, P. (2003). ***Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box?** Applied Microbiology and Biotechnology. 61:189-196.

KUBICEK C. y Rohr M. (1977). **Influence of manganese on enzyme synthesis and citric acid accumulation in *Aspergillus niger***. *European journal of applied microbiology and biotechnology*. 4:167-175.

KUBICEK, C., Schreferl-Kunar, G., Wohrer, W. y Rohr, M. (1988). **Evidence for a cytoplasmatic pathway of oxalate biosynthesis in *Aspergillus niger***. *Applied and Environmental Microbiology*. 54: 633-7.

KUBICEK, C. y Rohr, M. (1989). **Citric acid Fermentation**. *Journal. Critical Reviews in Biotechnology*. 4 : 331-373.

LI, J., y Humphrey A. (1989). **Kinetic and fluorometric behavior of a phenol fermentation**. *Biotechnology Letters*. 11 (3): 177-182.

LOPEZ, C., Zuluaga A., Herrera, S., Ruiz, A. y Medina, V. (2006). **Producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger* nr12270 a partir de suero de leche**. [Documento en línea]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v73n150/a04v73n150.pdf>. Consulta: 10/08/2015].

LUTZONI, F., Kauff, F., Cox, C., Mclaughlin, D., Celio, G., Dentinger, B., Padamsee, M y col. (2004). **Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcelular traits**. *American journal of botany*. 91 (10): 1446-1480.

MADIGAN, M., Martinko, J., y Parker, J. (2003). **Brock: Biología de los microorganismos**. 10ma. Ed. Prentice Hall. España. pp: 482-487.

MAJUMDER L., Khalil, M., Munshi K., Alam K., Rashid H., Begum R. y Alam N. (2010). **Citric Acid Production by *Aspergillus niger* Using Molasses and Pumpkin as Substrate**. [Documento en línea]. Disponible en: <http://www.idosi.org/ejbs/2%281%2910/1.pdf> [Consulta: 10/08/2015].

MIGO, V. P.; Matsumura, M.; Del Rosario, E. J. & Kataoka, H. (1993). **Decolourization of molasses waste water using an inorganic flocculent**. Journal of Fermentation and Bioengineering, (75) 438–442.

MILLER G. (1959). **Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar**. The Journal of Analytical Chemistry. 31, 426.

MOHANA, S.; Acharya, B. K. Y Madamwar, D. (2009). **Distillery spent wash: treatment technologies and potential applications**. Journal of Hazardous Materials, (163), 12-25.

MOHAIBES, M., y Heinonen, H. (2004). **Aerobic thermophilic treatment of farm slurry and food wastes**. Bioresource Technology. 95(3):245-254.

OLIVEIRA, A., Victor de Carvalho M. y Bastos, R. (2012). **Cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse with vinasse**. Bioscience Journal. Uberlândia, v. 28, n. 6, p. 889-894.

PANDE, H. P. y Sinha, B. K. 1997. **Uso de los desechos de la destilería como fertilizantes. Sugarce, agroindustrial alternatives.** New Delhi: Oxford & IBH publishing. Co.Pvt. Ltd. (Resumen tomado de International Sugar Journal. 99(1180): 201

PAPAGIANNI. M. (2007). **Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling.** [Documento en línea]. Disponible en:<http://membrane.ustc.edu.cn/class/ref1/3%20Advances%20in%20citric%20acid%20fermentation%20by%20Aspergillus%20niger-%20Biochemical%20aspects,%20membrane%20transport%20and%20modeling.pdf>[Consulta: 10/08/2015].

PÉREZ, S. R.; Savón, R. C.; Diaz, M. S. & Kourouma, A. (2006). **Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para la decoloración de efluentes industriales.** Revista Mexicana de Micología, (23), 9-15

PEKSEL, A., Torres. N., Liu, J., Juneau, G. y Kubicek, C. (2002). **¹³C-NMR analysis of glucose metabolism during citric acid production by *Aspergillus niger*.** Applied Microbiology and Biotechnology. 58:157-63.

PERLMAN, D., Dorrell, W. y Johnson, M. (1946). **Effect of metallic ions on the production of citric acid by *Aspergillus niger*.** Archives of Biochemistry and Biophysics., 10, 131-143.

PERLMAN, D. y Sih, C. (1960). **Fungal synthesis of citric, fumaric and itoconic acids.** In: **Progress in Industrial Microbiology. Vol 2. Interscience Publishers.** New York. P:169-194.

PIMENTEL, H., y Rivero, C. (2011). **Parámetros de calidad de un material orgánico obtenido a partir de vinaza con el uso de un activador multienzimático.** [Documento en línea]. Disponible en: <http://venesuelos.org.ve/index.php/venesuelos/article/view/96>. [Consulta: 12/08/2015].

PRASAD, M. y Shih, K. (2016). **Environmental Materials and Waste: Resource Recovery and Pollution Prevention.** PP: 21-22

QAZI, G., Gaid, C., Chaturvedi,S., Chorpa,C, Trager, M., Onken, U. (1990). **Pilot-scale citric acid production with Aspergillus niger under several conditions.** Journal of Fermentation and Bioengineering. 69:72–74.

RAMACHANDRAN, S. (2008). **Use of spores of Aspergillus niger obtained by Solid-state fermentation for the production of gluconic acid.**[Documento en línea]. Disponible en: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00729882/document> [Consulta: 15/09/2015].

RAPER, K. y Fennel, D. (1965). **The genus Aspergilli.** New york, Williams & Wilkins.

RITTMANN, B. y McCarty, P. (2001). **Biotecnología del medio ambiente**. McGraw-Hill, Inc. PP: 20-24.

RIVADA, F. (2008). **Planta Industrial de Producción de Ácido Cítrico a partir de Melazas de Remolacha**. [Documento en línea]. Disponible en: <http://rodin.uca.es/xmlui/bitstream/handle/10498/6411/34254675.pdf?sequence=1>. [Consulta: 15/09/2015].

RYWINSKA, A., Rynowicz, W., Zarawska, B. y Skrzypinski, A. (2010). **Comparison of citric acid production from glycerol and glucose by different strains of *Yarrowia lipolytica***. The World Journal of Microbiology and Biotechnology. 20: 1217-1224.

ROSILLO, C., Bajay S., y Rothman, H. (2000). **Industrial Uses of Biomass Energy: The example of Brazil**. London, UK CRC Press, pp. 133-137.

ROUKAS, T. y Alichanidis, E. (1988). **The effect of pH on the production of acid citric from beet molasses by surface fermentation**. 8th International Biotechnology Symposium. P-218.

ROUKAS, T., L. Harvey. (1988). **The effect of pH on production of citric and gluconic acid from beet molasses using continuous culture**. Biotechnology Letters. 10:289-294.

ROUKAS, T.(1998). **A new substrate for citric acid production by *Aspergillus niger***. Applied Biochemistry and Biotechnology. 74:43-53.

ROUKAS, T., Liakopoulou-Kyriakides, M.(2002). **Optimization study for the production of citric and gluconic acid from fig water extract by *Aspergillus niger* in surface fermentation**. Food Biotechnology. 16:17-28.

RUBIO M., y MALDONADO, M. (1995). **Purification and characterization of an *Aspergillus niger* invertase and its DNA sequence**. Current Microbiology. 31:80-83.

SAFFRAN, M. y Denstedt, O. (1948). **A rapid method for the determination of citric acid**. Department of Biochemistry, McGill University, Montreal, Canada.

SCHEACHTER, M. (2009). ***Encyclopedia of Microbiology***. Third Edition. Volume 1. Edit. Elsevier. USA. Pp: 424

SELUY, L., Firman, P., y Isla, M. (2012). **Impacto de la hidrólisis de azúcares no-reductores en la producción de etanol a partir de vinazas cerveceras**. Documento en línea]. Disponible en: <http://www.congresos.unlp.edu.ar/index.php/CCMA/7CCMA/paper/viewFile/1075/281>.

SIKANDER, A., Ikram-ul-Haq., Qadeer, M.A.y Iqbal J. (2002). **Production of citric acid by Aspergillus niger using cane molasses in a stirred fermentor.** [Documento en línea]. Disponible en:<http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v5n3-3/994> [Consulta: 08/07/2016].

SINGH, P. y Pandey, A. (2009). **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation.** Editorial Springer. [Libro en línea]. Disponible en: <https://books.google.co.ve/books?id=35i0LKOBTVoC&pg=PA43&lpg=PA43&dq=production+of+acid+citric+by+trichoderma+viride&source=bl&ots=f0dqZ5iZ8s&sig=nDZ1tifJ0hRiZ6TeyZA11rRkRLc&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiyvvr9efNAhUDqx4KHRFcBWAQ6AEIZjAJ#v=onepage&q=production%20of%20acid%20citric%20by%20trichoderma%20viride&f=false> [Consulta: 08/07/2016].

STRYER, L. (1985). **Bioquímica.** Segunda Edición. Editorial Reverté. España. pp. 262-279.

SHETTY, K., Paliyath, G., Pometto, A., y Levin, R. (2006). **Food Biotechnology.** *Second Edition.* Disponible en: <https://books.google.co.ve/books?id=ePLBQAAQBAJ&pg=PA1702&lpg=PA1702&dq=aspergillus+niger+Shetty&source=bl&ots=n0kvvZyvcl&sig=JpU5WvIBh4gU3G6pUp3q0Ytgxo&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjlPXpurvJAhWEYiYKHdPYCy0Q6AEIUjAH#v=onepage&q=aspergillu%20niger%20Shetty&f=false>. [Consulta: 15/09/2015].

SOCCOL, C., Vanderberghe, L., Rodrigues, C. y Pandey, A. (2006). **New perspectives for citric acid production and applications.** Food Technology and Biotechnology. 44:141-149.

TORRE, S. (2008). *Utilización de ácido cítrico en limpieza de pintura* .[Documento en línea]. Disponible en:<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/13397/Tesis%20de%20M%C3%A1ster.pdf?sequence=1>[Consulta: 15/09/2015].

TORRES, N. (1994). **Modelling approach to control of carbohydrate metabolism during citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. I. Model definition and stability of the steady state.** Biotechnology & Bioengineering 44: 104-111.

TORRES, N., Riol-Cimas, J., Wolschek M., y Kubicek C. (1996). **Glucose transport of *Aspergillus niger*: the low affinity carrier is only formed during growth on high glucose concentrations.** Applied Microbiology and Biotechnology. 44:790–794.

VEGA, A., Valdés, L. y Rendón A. (2002). **Caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus niger* y Evaluación de la Producción de Ácido Cítrico.** [Documento en línea]. Disponible en:<http://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/revista-universidad-eafit/article/viewFile/845/753> [Consulta: 15/11/2015].

WELLS, P. y Herrick, H. (1938). **The citric acid industry**. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 30: 255-262.

XU, D., Madrid. C., Rohr. M. y Kubicek. P. (1989). **The influence of type and concentration of the carbón source on production of citric acid by *Aspergillus niger***. Applied Microbiology and Biotechnology. 30:553-558.