

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



“PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE LACTOSUERO DE RESIDUO QUESERO ENTERO Y DEPROTEINIZADO UTILIZANDO UNA CEPA FUNGAL DE *Aspergillus niger* sp. EN CULTIVO SUMERGIDO”

Tesis presentada por la Bachiller:

CONCHA GARCÍAS, WALESKA

Para optar el título profesional de

INGENIERA BIOTECNÓLOGA

Asesor: Ing. Francisco J. Roque Rodríguez

**AREQUIPA – PERÚ
2014**

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

CAPITULO I INTRODUCCIÓN	11
1.1. Objetivos	14
1.2. Hipótesis	15
1.3. Variables e indicadores	16
CAPITULO II MARCO TEÓRICO	17
2.1. Antecedentes	17
2.2. Contaminación de la industria láctea	22
2.3. Microorganismos como catalizadores	24
2.4. Género <i>Aspergillus</i>	27
2.5. Suero de leche (lactosuero)	29
2.6. Bio-Producción de ácidos orgánicos	34
2.7. Ácido cítrico	38
2.8. Producción de ácido cítrico por <i>Aspergillus niger</i>	42
2.9. Fermentación en bioreactor tipo tanque agitado (CSTR)	45
2.10. Cinética de reacción microbiana	48
CAPITULO III MATERIALES Y MÉTODOS	52
3.1. Lugar de ejecución	52
3.2. Materiales	52
3.3. Métodos	55
Flujograma de actividades	55

CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
4.1. Activación por re-siembra	64
4.2. Mantenimiento y adaptación de la cepa fungal de <i>A. Níger</i>	65
4.3. Preservación y almacenamiento crioprotector de la cepa	65
4.4. Obtención de inóculo fungal de producción	65
4.5. Obtención y conservación de suero lácteo (lactosuero)	66
4.6. Caracterización físico-química de suero lácteo	67
4.7. Pre-tratamiento de las muestras de lactosuero	68
4.8. Fermentación Fungal en el reactor continuo perfectament agitado – NBS Bioflo 300	68
4.9. Cinética de bioreacción fungal y parametrización cinética fungal	71
4.10. Biosíntesis de ácidos orgánicos expresados como ácido cítrico en bioreactor de producción batch	78
CONCLUSIONES	88
RECOMENDACIONES	89
REFERENCIAS	90
ANEXOS	94
ANEXO A Composición del medio SABOURAUD	94
ANEXO B Composición del medio de adaptación (CA)	95
ANEXO C Método de Fehling para determinación de lactosa en medio líquido	96
ANEXO D Datos experimentales de fermentación	98

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1	Variables independientes consideradas para la evaluación de resultados	16
Tabla N° 2	Variables dependientes consideradas para la evaluación de resultados	16
Tabla N° 3	Empresas productoras de ácido cítrico	19
Tabla N° 4	Sectores consumidores de ácido cítrico	20
Tabla N° 5	Usos del ácido cítrico por sectores productivos	21
Tabla N° 6	Contribución de la DBO ₅ de efluentes lácteos	22
Tabla N° 7	Carga orgánica por producto fabricado en industrias lácteas	23
Tabla N° 8	Composición promedio de la leche, sub-productos y desagües (mg./l.)	30
Tabla N° 9	Composición de lactosuero fresco	31
Tabla N° 10	Composición del grano de maíz en base seca	38
Tabla N° 11	Condiciones que favorecen la producción de ácido cítrico	40
Tabla N° 12	Composición de la solución nutritiva para un cultivo en superficie	43
Tabla N° 13	Métodos para la cuantificación de crecimiento de poblaciones microbianas	45
Tabla N° 14	Clasificación de la fermentación según Gaden (1978)	48
Tabla N° 15	Composición del medio de adaptación (CA)	57
Tabla N° 16	Propiedades físico-químicas de muestras de lactosuero dulce	

	de origen de línea de producción de queso parmesano de Laive S.A	67
Tabla N° 17	Composición en lactosa (g./l.) de las muestras de lactosuer originales y suplementadas con medio CA	68
Tabla N° 18	Parámetros cinéticos de crecimiento peletizado (Y^1) para <i>A. níger</i> en medio LSES a diferentes temperaturas	74
Tabla N° 19	Parámetros cinéticos de crecimiento peletizado (Y^1) para <i>A. níger</i> en medio LSDS a diferentes temperaturas	76
Tabla N° 20	Resumen de parámetros obtenidos durante la fermentación fungal de <i>A. níger</i> por 192 h. en ambiente controlado NBS BIOFLO 3000 para la bioproducción de ácido cítrico	87
Tabla N° 21	Datos experimentales en BIOFLO 3000 para el uso de LSES a 20 y 30°C	100
Tabla N° 22	Datos experimentales en BIOFLO 3000 para el uso de LSDS a 20 y 30°C	102

ÍNDICE DE FIGURAS

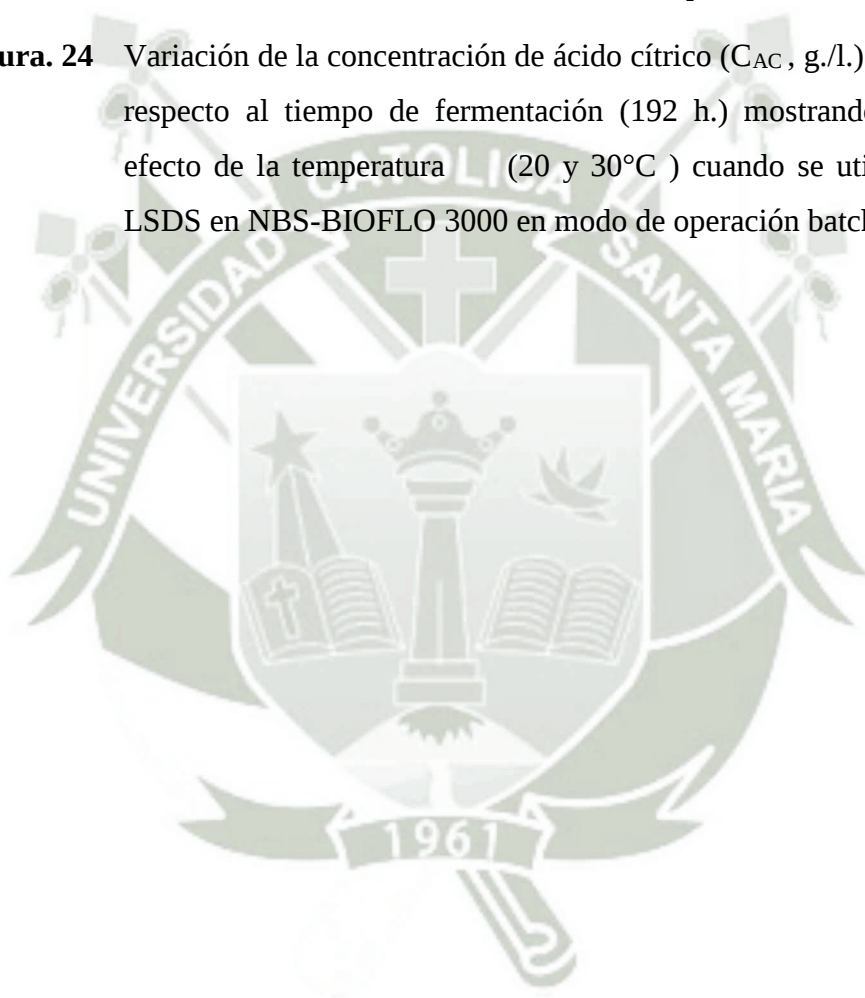
Figura. 1	Consumo de ácido cítrico por destino sectorial industrial y/o comercial	20
Figura. 2	Hifas de <i>Aspergillus</i>	27
Figura. 3	<i>Aspergillus niger</i>	28
Figura. 4	Estructura microscópica del <i>Aspergillus niger</i>	29
Figura. 5	Estructura molecular de la lactosa	37
Figura. 6	Reacción de hidrólisis enzimática de la lactosa que logra descomponerla en glucosa y galactosa	37
Figura. 7	El ciclo de ácidos tricarboxílicos y sus productos sintetizados en exceso en hongos	41
Figura. 8	Curvas aplicadas en VPD	37
Figura. 9	Esquema del bioreactor de tanque agitado de 1. 6 Bioflo 3000	46
Figura. 10	Curva típica de un cultivo por lotes	49
Figura. 11	Cepa fungal activa de <i>Aspergillus niger</i> sp. obtenida en placa agar Sabouraud a 30°C	64
Figura. 12	Muestras de lactosuero ácido obtenidas de la línea de producción de queso parmesano (Laive S.A.)	66
Figura. 13	Bioreactor de 1,5 l. (volumen de trabajo 1,25 l.) mostrando el vessel de vidrio borosilicato con la muestra de LSDS y el HeadPlate de acero inoxidable con los puertos utilizados	69
Figura. 14	Pantalla del BioFlo 3000 que indica los set-points y las	

	variables de proceso simultáneamente	69
Figura. 15	Montaje experimental utilizado para evaluar el efecto de la temperatura y de medio lactosado (LSES y LSDS) en la bioproducción de ácidos orgánicos expresados como ácido cítrico utilizando la cepa fungal de <i>A. niger</i> .	70
Figura. 16	Variación de la masa fungal (M) de <i>A. niger</i> con respecto al tiempo de fermentación (192 h.) mostrando el efecto de la temperatura (20 y 30°C) cuando se utilizó LSES en NBS-BIOFLO 3000 en modo de operación batch	72
Figura. 17	Linealización del modelo de crecimiento peletizado para ambas temperaturas bajo análisis usando LSES como fuente de medio carbonado	73
Figura. 18	Variación de la masa fungal (M) de <i>A. niger</i> con respecto al tiempo de fermentación (192 h.) mostrando el efecto de la temperatura (20 y 30°C) cuando se utilizó LSDS en NBS-BIOFLO 3000 en modo de operación batch	74
Figura. 19	Linealización del modelo de crecimiento peletizado para ambas temperaturas bajo análisis usando LSDS como fuente de medio carbonado	77
Figura. 20	Variación de la concentración de lactosa (Cs) con respecto al tiempo de fermentación (192 h.) mostrando el efecto de la temperatura (20 y 30°C) cuando se utilizó LSES en NBS-BIOFLO 3000 en modo de operación batch	79
Figura. 21	Variación de la concentración de lactosa (Cs) con respecto al tiempo de fermentación (192 h.) mostrando el efecto de la temperatura (20 y 30°C) cuando se utilizó LSDS en NBS-BIOFLO 3000 en modo de operación batch	80
Figura. 22	Variación del pH de los medios lactosados líquidos (LSES y	

LSDS) después de iniciada la fermentación fungal con *A. níger* con respecto al tiempo de fermentación (192 h.) mostrando el efecto de la temperatura (20 y 30°C) en NBS-BIOFLO 3000 en modo de operación batch 82

Figura. 23 Variación de la concentración de ácido cítrico (C_{AC} , g./l.) con respecto al tiempo de fermentación (192 h.) mostrando el efecto de la temperatura (20 y 30°C) cuando se utilizó LSES en NBS-BIOFLO 3000 en modo de operación batch 84

Figura. 24 Variación de la concentración de ácido cítrico (C_{AC} , g./l.) con respecto al tiempo de fermentación (192 h.) mostrando el efecto de la temperatura (20 y 30°C) cuando se utilizó LSDS en NBS-BIOFLO 3000 en modo de operación batch 86



RESUMEN

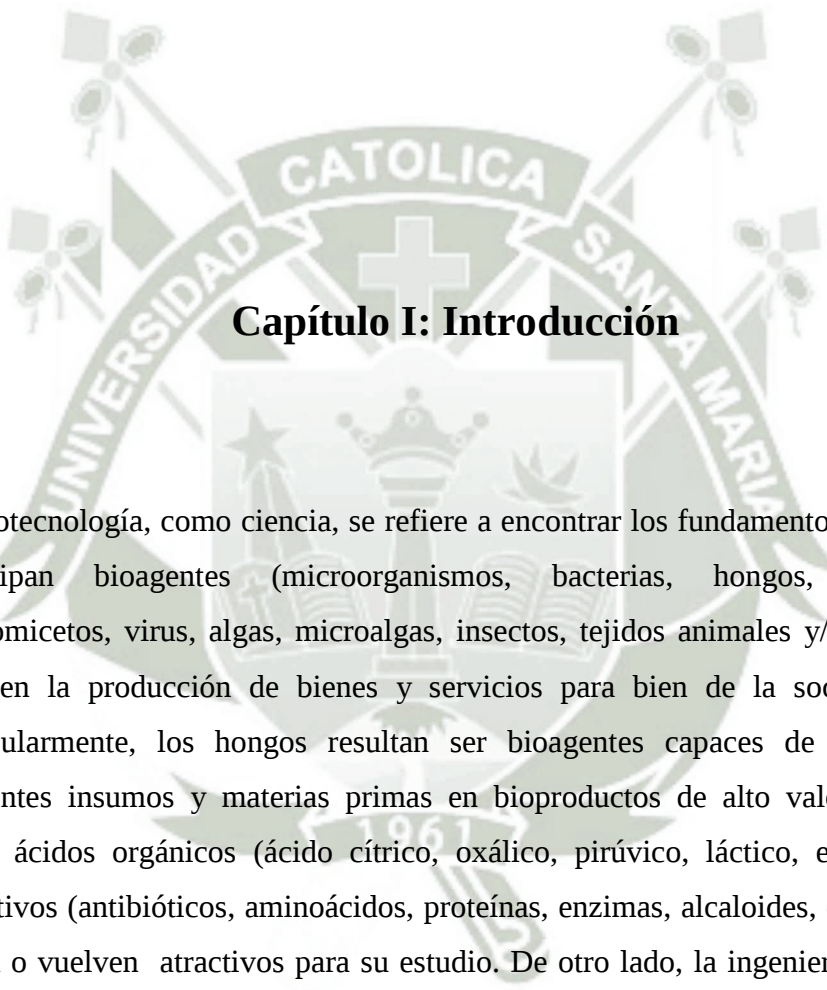
El suero de leche se ha constituido en el principal residuo de la industria láctea local a pesar de los constantes esfuerzos por aprovecharlo. El presente trabajo tuvo por objetivo estudiar y evaluar la producción de ácido cítrico por fermentación sumergida utilizando el hongo del género *Aspergillus niger* obtenido de un banco de cepas de P.P. de Ingeniería Biotecnológica de la Universidad Católica de Santa María. Como medio de cultivo se utilizó una muestra de lactosuero dulce de origen parmesano generado por una empresa local con miras a su aprovechamiento y a la reducción del impacto ambiental. Fue evaluada la acción y/o efecto de la temperatura como factor externo en el desarrollo microbiano, consumo de lactosa y bioproducción de ácido cítrico. Se hizo el experimento con dos tipos de lactosuero, entero y deproteinizado, Se seleccionó el mejor medio de cultivo para la propagación del inóculo y la producción de ácido cítrico y resultó ser el lactosuero deproteinizado (LSD). Entre las temperaturas utilizadas 24 °C y 30 °C, la que dio mejor resultado ha sido la segunda temperatura. El diseño experimental planteado dio como resultado que la cepa *A. niger* utilizada permitió y generó extracelularmente ácidos orgánicos cuya mayor proporción resultó ser ácido cítrico (% conversión = 69)

Palavras clave: *Aspergillus niger*, lactosuero entero, lactosuero deproteinizado, BIOFLO 3000, ácido cítrico

ABSTRACT

Whey has become the main residue of the local dairy industry despite the continuing efforts to exploit. The present work was undertaken to study and evaluate the production of citric acid by submerged fermentation using the fungus *Aspergillus niger* obtained from a bank of strains of PP Biotechnology Engineering from the Catholic University of Santa Maria. As a sample medium sweet whey Parmesan source generated by a local company with a view to its use and reducing the environmental impact was used. Action was evaluated and / or the effect of temperature external factor in controlling microbial growth and consumption of lactose and citric acid bioproduction. Experiment with two types of whey, whole and deproteinizado was the best medium for inoculum propagation and production of citric acid was selected and turned the deproteinizado whey (LSD). Between the temperatures used 24 ° C and 30 ° C, the best result you gave was the second temperature. The experimental design raised resulted in *A. niger* strain used allowed and organic acids generated extracellularly which proved higher citric acid ratio (conversion = 69%)

Key words: *Aspergillus niger*, whole whey, whey deproteinizado, BIOFLO 3000, citric acid



Capítulo I: Introducción

La biotecnología, como ciencia, se refiere a encontrar los fundamentos en los que participan bioagentes (microorganismos, bacterias, hongos, levaduras, actinomicetos, virus, algas, microalgas, insectos, tejidos animales y/o vegetales, etc.) en la producción de bienes y servicios para bien de la sociedad (29). Particularmente, los hongos resultan ser bioagentes capaces de transformar diferentes insumos y materias primas en bioproductos de alto valor agregado como ácidos orgánicos (ácido cítrico, oxálico, pirúvico, láctico, etc.) y otros bioactivos (antibióticos, aminoácidos, proteínas, enzimas, alcaloides, etc.) que los hacen o vuelven atractivos para su estudio. De otro lado, la ingeniería ejerce un papel de aplicación importante para construir sistemas eficientes y/o eficaces para permitir que estos bioagentes puedan desarrollarse con un control y gobierno adecuados para obtener estos bioactivos y/o metabolitos en excelentes condiciones (27).

De entre los ácidos orgánicos obtenidos biológicamente, el ácido cítrico es uno de los más usados en diferentes áreas como la alimentaria, farmacéutica, cosmética,

salud, etc. Su buen sabor y la facilidad con que es asimilado favorecen su utilización como ingrediente ácido para obtener escalas de pH convenientes y permitir resaltar y potencializar el flavor de una extensa variedad de productos útiles para el ser humano (11). Además de las áreas mencionadas es utilizado en limpieza y pulimento de hierro y acero (área metal-mecánica y metalúrgica), como componente en ciertas soluciones ferrosas para galvanoplastia, en el acondicionamiento y tratamiento de aguas residuales, en la preparación de pinturas y lacas y, finalmente, en el estampado de telas (36).

Para su obtención se puede emplear diferentes métodos pero la síntesis química es el menos deseado (2); los métodos fermentativos utilizando microorganismos son los más beneficiosos y extensos en uso en nuestros días, su extracción del jugo de limones, limas y otros cítricos y la extracción del jugo de los residuos de piña en las fábricas de conservas representan algunos de los métodos más importantes para su fabricación continua y sustentable (23).

El suero de leche (lactosuero) es un subproducto contaminante de la industria de alimentos, el cual mediante su fermentación controlada, posibilita la obtención de un sin número de bioproductos de valor agregado como el ácido cítrico, reduciendo el impacto ambiental negativo debido a la gran cantidad de Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) que genera su vertimiento a los cursos de agua al contener niveles considerables de lactosa, proteínas, minerales y carga microbiológica (43).

Con este trabajo se aporta a la Línea de Investigación en Biotecnología Industrial de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María y en el desarrollo de módulos productivos sustentables en el Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica.

Dentro de este contexto, se pretende plantear una alternativa de producción de ácido cítrico como metabolito extracelular usando métodos biotecnológicos fermentativos basados en la acción biológica de una cepa fungal de *Aspergillus niger* que permita obtener un producto de buena calidad implementando nuevas fuentes de producción aprovechables como es el caso del suero de leche.

Por todo lo expresado anteriormente, el trabajo de investigación se justifica plenamente en los aspectos tecnológicos, económicos, ambientales y, principalmente, sociales debido a que la bioproducción de ácido cítrico usando un residuo industrial como el lactosuero por vía fungal (*A. niger*) aporta a la sociedad un producto limpio, puro y principalmente, más barato que los ofertados por otras vías y que si se logra su aplicación a gran escala se eliminaría o disminuiría en gran proporción el impacto ambiental, que actualmente es considerado como permanente, de la contaminación de las aguas superficiales por el vertido inescrupuloso de este desecho a las fuentes de agua (26).

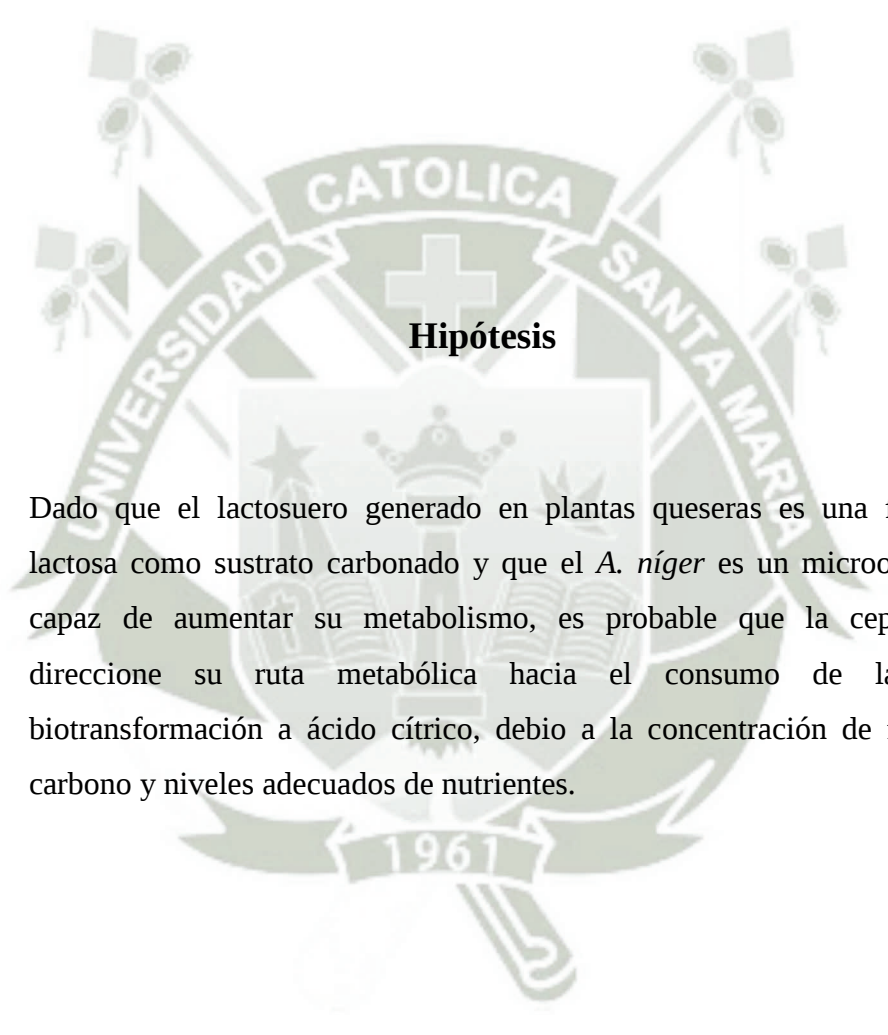


Objetivo general

Producir biológicamente ácido cítrico a partir de lactosuero entero y deproteinizado utilizando una cepa fungal de *Aspergillus niger* sp. en cultivo sumergido.

Objetivos específicos

1. Adaptar la ruta metabólica de una cepa fungal de *Aspergillus niger* para orientarla hacia la producción de ácidos orgánicos, en general, y de ácido cítrico, en particular, utilizando como sustrato carbonado un residuo líquido (lactosuero) de planta quesera.
2. Caracterizar organoléptica y físico-químicamente el lactosuero utilizado.
3. Evaluar el efecto de la temperatura sobre la bioproducción de ácido cítrico en cultivo sumergido por acción microbiológica del hongo *A.níger*.
4. Determinar la cinética de crecimiento en cultivo sumergido de biomasa fungal, consumo de sustrato y producción de ácidos orgánicos expresados como ácido cítrico del sistema de fermentación de lactosuero usando *A. níger* como catalizador biológico.
5. Validar estadísticamente los resultados experimentales obtenidos con un nivel de confiabilidad superior al 95%.



Hipótesis

Dado que el lactosuero generado en plantas queseras es una fuente de lactosa como sustrato carbonado y que el *A. niger* es un microorganismo capaz de aumentar su metabolismo, es probable que la cepa fungal direcciona su ruta metabólica hacia el consumo de lactosa y biotransformación a ácido cítrico, debio a la concentración de fuente de carbono y niveles adecuados de nutrientes.

Variables e indicadores

Las principales variables independientes y dependientes en este estudio se presentan en las tablas 1 y 2 donde se anexan sus indicadores.

Tabla 1. Variables independientes consideradas para la evaluación de resultados

Variables	Indicadores
Fuente carbonada	LSE ; LSD
Temperatura	20 ; 30 °C

LSE: Lactosuero entero

LSD: Lactosuero deproteinizado

LSES: Lactosuero entero suplementado

LSDS: Lactosuero deproteinizado suplementado

Tabla 2. Variables dependientes consideradas para la evaluación de resultados

Variables dependientes	Indicadores
pH del medio de cultivo	< 6,0
Peso de biomasa fungal	M, g.
Concentración de ácido cítrico	C _{AC} , g. /l.
Concentración de lactosa	S, g. /l.

M,g: Masa expresada en gramos

C_{AC}: Concentración de ácido cítrico

C_s: Concentración de sustrato



Capítulo II: Marco Teórico

2.1. Antecedentes

La producción de ácido cítrico por fermentación a escala comercial ha constituido un gran progreso dentro del campo de la microbiología industrial; al mismo tiempo que independizaba a los países desarrollados en el abastecimiento de este producto y ha modificado notablemente el comercio mundial de ácido cítrico y citrato cálcico (5). El ácido cítrico fue aislado por Scheele en el año 1784 del zumo de limón, en forma de sólido cristalizado; luego se sintetizó a partir de glicerol y de otros compuestos químicos, para finalmente desde 1923 obtenerse por fermentación, utilizando microorganismos que crecían sobre la superficie de los cultivos. Werhmer (1893) fue el primero en describir al ácido cítrico como un producto de la fermentación por mohos. Dos de estos, que él designó como *Citromyces pfefferianus* y *Citromycre glabes* (clasificados por Thom como penicilios), producían el ácido a partir de soluciones nutritivas de sacarosa que contenían carbonato cálcico. Más tarde, Wehmer dio a conocer la formación de ácido cítrico por *Penicillium luteum* y *Mucor piriformis*, aunque creía que los *Aspergillus* negros solo producían ácido oxálico. Su descubrimiento condujo a

extensos estudios de los factores que influyen sobre la producción micológica del ácido cítrico, las diversas cepas de mohos capaces de producirlo y el mecanismo por el cual se forma una sustancia de cadena ramificada de compuestos azucarados de tipo lineal. (24).

En 1917, Currie, del Departamento de Agricultura de Estados Unidos, publicó los resultados de una importante investigación sobre la producción de ácido cítrico por la variedad de *Aspergillus niger*. Doelger y Prescott, en 1934, corroboraron los resultados de Currie, contribuyendo con sus aportes de esta fermentación (24).

En 1933, la producción mundial superó las 10 000 toneladas, de las cuales, más del 80% se obtuvieron por fermentación. Inicialmente se utilizaron métodos de cultivo en superficie con *Aspergillus niger*. Después de la segunda guerra mundial se introdujeron procesos de cultivo sumergido también con *A. niger* y aproximadamente en 1977 se comercializó un proceso de cultivo sumergido con levaduras del género *Candida*. Con la sustitución de los polifosfatos por el citrato de sodio en los detergentes en 1970, el mercado anual creció rápidamente (28).

La producción de ácido cítrico ha crecido notablemente en el presente siglo; actualmente, la capacidad instalada mundial es de 750 000 TM/año, con una producción real de 550 000 TMaño. El ácido cítrico se fabrica en más de 20 países y la Unión Europea, Estados Unidos y China reúnen el 88% del total mundial. Recientemente, se observó un aumento en la capacidad productiva de Europa Oriental y del Lejano Oriente, particularmente en China, la cual produce proporcionalmente menor volumen de ácido cítrico de alta calidad, es decir, purificado y refinado. Sin embargo, la capacidad de elaboración del producto crudo representa el 24% del total mundial. La Unión Europea incrementó su elaboración ubicándose primera en el ranking mundial debido, fundamentalmente, a su uso como materia prima para la fabricación de detergentes biodegradables. Se estima que la demanda de Estados Unidos, en el último quinquenio, creció según una tasa cercana al 7% anual. Este crecimiento se relaciona con la expansión de la industria de alimentos y bebidas. Las primeras firmas productoras a nivel mundial son Bayer y ADM, cada una con el 17% del mercado aproximadamente. Le siguen Junbunzlauer, Cargill y Critique Belge (que produce más de 300 toneladas

de ácido cítrico diariamente). En tabla 3, se detallan algunas importantes firmas elaboradoras de ácido cítrico.

Tabla 3. Empresas productoras de ácido cítrico¹

Compañía	Localización	Capacidad total (TM/año)
Miles Inc.	EEUU, Brasil, México, Colombia	120 000
Chas Pfizer	EEUU, Irlanda	115 000
A.G. Junbunzlauer Chemische fabric	Austria, Alemania, Francia, Indonesia	100 000
Critique Belge	Bélgica	60 000
Biacor	Italia	28 000
John Sturge	Reino Unido	25 000
Cargill	EEUU	25 000
AKTIVA	República Checa	15 000
Gadot	Israel	12 000

Extraído de: ¹ www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r_12/12_06_citrico.htm

Así mismo, países como China (50 000 TM), Indonesia (25 000 TM), Rusia (22 000 TM), India (10 000 TM), Eslovaquia (4 500 TM) y Tailandia (4 000 TM) cuentan con plantas pequeñas que permiten elaborar un total significativo integral de MILES de toneladas de ácido cítrico. La expansión de la demanda mundial de ácido cítrico se debe, fundamentalmente, a su utilización como aditivo en la industria de alimentos y bebidas. Por ejemplo, en Estados Unidos este sector demanda el 72% del total. A principios de la década del 90', el producto se destinaba a distintas industrias. El consumo de ácido cítrico en el mundo crece a razón de 5-8% anual y la tendencia parece mantenerse estable. A continuación se debe observar tanto en la Tabla 4 como en la figura 1, el consumo de ácido cítrico por sectores y su crecimiento anual.

Tabla 4. Sectores consumidores de ácido cítrico¹.

SECTOR CONSUMIDOR	CRECIMIENTO ANUAL PORCENTUAL
Alimentos y Bebidas	5-8
Fármacos	2-3
Detergentes	6-7
Limpiadores de Metales	s/d ^{1,2}
Productos textiles	s/d ^{1,2}
Cosméticos	2-3
Otros	9-10

Extraído de: ¹ www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r_12/12_06_citrico_htm ; ² sin datos


Figura. 1. Consumo de ácido cítrico por destino sectorial industrial y/o comercial.

Extraído de: www.monografias.com/trabajos17/acido-citrico/acido-citrico.shtml

El uso que cada uno de los sectores consumidores de ácido cítrico proporciona a este producto se describe en la Tabla 5.

Tabla 5. Usos del ácido cítrico por sectores productivos¹.

SECTOR PRODUCTIVO	USO Y/O APLICACIÓN
Bebidas	Saborizante y regulador del pH; incrementa la efectividad de los conservantes antimicrobianos
Dulces y Conservas	Acidulante y regulador del pH para lograr una óptima gelificación
Caramelos	Acidulante y regulador del pH con el objetivo de alcanzar la máxima dureza de los geles
Verduras Procesadas	En combinación con ácido ascórbico, previene la oxidación
Alimentos Congelados	Ayuda a la acción de los antioxidantes; inactiva enzimas previniendo pardeamientos indeseables;
Frutas y Hortalizas Enlatadas	Disminuye el pH; al actuar como quelante; previene la oxidación enzimática y la degradación del color,
Confitería y Repostería	Se utiliza como acidulante, resaltador de sabores y para optimizar las características de los geles
Quesos Pasteurizados y Procesados	En forma de sal, como emulsificante y texturizante
Lácteos	Estabilizante en cremas batidas
Productos de la Pesca	Para bajar el pH en presencia de otros conservantes o antioxidantes
Aceites y Grasas	Previene la oxidación

Extraído de: ¹www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r_12/12_06_citrico_htm

2.2. Contaminación de la industria láctea

La industria láctea representa un importante sector dentro de la industria alimentaria y su contribución material en términos de contaminación de las aguas receptoras es significativa, lo que hace necesario y obligatorio el tratamiento previo de sus desechos líquidos antes del vertimiento. El caudal producido por la industria láctea depende del consumo de agua en la planta procesadora y este depende de la naturaleza de los productos fabricados y varía de una fábrica a otra.

Las aguas residuales de estas industrias están constituidas esencialmente por residuos de leche, productos diluidos y productos de limpieza como detergentes, ácidos y álcalis fuertes. Los principales constituyentes orgánicos en los residuos de la leche son sus sólidos naturales: grasa de la leche emulsionada, lactosa y proteínas (caseína y lactoalbúmina), sales y oligoelementos. A menudo también contiene sacarosa.

Las sustancias orgánicas de los efluentes de industrias lácteas provienen de los productos desechados y en menor grado de los productos de limpieza y desagües sanitarios. La importancia de cada una de las fuentes contaminantes se observa en la tabla 6.

Tabla 6. Contribución de la DBO₅ de efluentes lácteos¹.

DESECHOS	Kg DBO / litro (equivalente en leche procesada)	Porcentaje presente en los efluentes
Leche, productos lácteos y otros materiales orgánicos	3,0	94
Productos de limpieza	0,1	3
Desinfectantes	Despreciable	-
Lubricantes	Despreciable	-
Residuos sanitarios	0,1	3

Extraído de: ¹ Baena, S. et. al. 1994. Aguas residuales de la industria láctea: Naturaleza y composición de las aguas residuales. Revista Ambiente y Desarrollo, pp. 85-93.

El suero como subproducto proviene de la coagulación de la leche durante la fabricación de quesos. Es un líquido compuesto principalmente de agua, materia grasa, lactosa, proteínas, vitaminas y minerales. Constituye además el problema más difícil de resolver con respecto al tratamiento de las aguas residuales de la industria láctea y se estima que entre el 60 y 70% de la carga orgánica total de los efluentes industriales corresponde a suero.

De acuerdo con Nemerow (1971), la leche entera presenta una DBO de 110 000 mg./l. y la leche descremada un valor de 80.000 mg/L, donde aproximadamente 45 kilos de leche entera producen 4,5 kilos de DBO. En la Tabla 7 se especifica la carga orgánica por productos fabricados en la industria láctea. En cuanto al pH, el valor de éste en los residuos *in natura* varía entre 4,2 y 9,2, sin embargo según monitoreos realizados en residuos lácteos se han observados valores entre 2,0 y 12,9 con un valor promedio de 7,5. Estas aguas residuales tienen la tendencia a volverse ácidas muy rápidamente por la fermentación de la lactosa que se transforma en ácido láctico, principalmente en ausencia de oxígeno disuelto y el pH bajo resultante puede causar la precipitación de la caseína. Los vertidos de las plantas de producción de queso son especialmente ácidos por la presencia del suero. La concentración de sólidos en suspensión varía en función de las operaciones industriales y los valores oscilan entre 400 y 2.000 mg/L.

Tabla 7. Carga orgánica por producto fabricado en industrias lácteas¹.

Tipo de proceso	Kg. DBO por 1 000 Kg. de leche	Kg. “equivalentes” (variación promedio)
Estación receptora	0,02 – 1,13	0,28
Mantequilla	0,19 – 1,91	0,86
Ricota	1,30 – 42,00	14,64
Queso natural	0,30 – 4,04	2,00
Helados	1,90 – 21,04	5,54
Leche condensada	0,18 – 13,30	3,67
Leche deshidratada	0,40 – 13,50	6,06
Suero condensado	0,27 – 0,31	0,29
Suero seco	3,40 – 57,20	22,33

Extraído de: ¹ Baena, S. et. al. 1994. Aguas residuales de la industria láctea: Naturaleza y composición de las aguas residuales. Revista Ambiente y Desarrollo, pp. 88-89

La contaminación producida por estas aguas residuales se caracteriza por la presencia de lodos negros con fuertes olores a ácido butírico, causado por la descomposición de la caseína. Sin embargo, el suero constituye el problema más difícil de resolver con respecto al tratamiento, debido a la dificultad que constituye su rápida degradación por los métodos biológicos comúnmente usados. En cada caso el problema debe ser analizado cuidadosamente, ya que según el tipo de queso producido se obtendrá un suero con características diferentes.

2.3. Microorganismos como catalizadores

La actividad catalítica de los microorganismos se manifiesta como su capacidad para convertir sustratos en productos de alto valor agregado. A este proceso se le denomina fermentación. Durante la fermentación, una pequeña cantidad de microorganismos crece y se multiplica tomando nutrientes del medio en donde se encuentran. Los microorganismos al desarrollarse forman una serie de sustancias como resultado de su metabolismo. La formación de estas sustancias, así como la transformación de los nutrientes, se lleva a cabo a través de una compleja red de reacciones bioquímicas, catalizadas todas ellas por enzimas. Por lo anterior, se pueden considerar a los microorganismos como biocatalizadores.

El crecimiento de los microorganismos puede verse modificadas por sustancias químicas o por condiciones físicas de sus medios tales como: temperatura, actividad de agua, presión hidrostática, pH, entre otras.

Temperatura: La temperatura es uno de los factores más importantes a tener en cuenta, ya que influye en la proliferación y vida de los microorganismos. Así, cuando se aumenta la temperatura, las reacciones enzimáticas y químicas se aceleran, aumentando su crecimiento, pero cuando estas alcanzan ciertos márgenes, las proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes celulares pueden verse afectadas irreversiblemente. Es por esto, que los microorganismos requieren temperaturas óptimas en la que el crecimiento es más rápido.

Necesidades hídricas: Todos los microorganismos requieren agua para vivir. La cantidad de ella varía según el ambiente, pero su disponibilidad no depende solo

de su contenido, sino que es una función compleja de factores de adsorción y solución.

Actividad del agua: La actividad del agua se relaciona con la presión de vapor de agua en el aire sobre una solución o sustancia. Cuando un microorganismo se encuentra en un medio con baja actividad de agua, éste debe realizar un trabajo para poder obtener agua de dicho medio; este gasto energético hace que se reduzca la velocidad de crecimiento de microorganismo.

Potencial Hidrógeno: El pH es un factor esencial para el crecimiento de los microorganismos, es por eso que se determinan el pH mínimo, óptimo y máximo. La mayoría de las especies crecen a valores casi neutros, pero algunas se ven muy favorecidas por una reacción ácida, aunque muy pocas especies pueden crecer a valores de pH menores de dos o mayores de 10.

Potencial REDOX: En las diferentes reacciones biológicas de los microorganismos, hay que tener en cuenta el aprovechamiento del oxígeno del aire.

Presión osmótica: En la membrana celular que es permeable y permite el paso de agua y algunas moléculas, el microorganismo establece un equilibrio con su medio, estableciéndose una presión osmótica (variable según el tipo de microorganismo)

Oxígeno: El oxígeno además de ser una sustancia vital para los organismos respiratorios, es también capaz de formar tóxicos aún para los organismos que lo respiran y necesitan (el peróxido de hidrógeno es uno de ellos). Sin embargo, los microorganismos han desarrollado enzimas que los destruyen, tal es el caso de la catalasa y la peroxidasa.

El conocimiento de lo anterior ayuda a diseñar métodos para controlar las funciones microbianas o destruir organismos que puedan alterar un producto deseado.

Específicamente, los hongos constituyen un complejo y fascinante grupo de organismos tan grande que se calculan más de 300.000 especies. Los hongos mejor conocidos por todos son los macroscópicos, denominados también setas o champiñones, con tamaño, forma y color de los más variados. Los hongos del género *Aspergillus* se dan en gran variedad de hábitats en tierra, en productos almacenados, en productos alimenticios y en vegetación decaída. Son abundantes en la región tropical y subtropical ya que son hábiles para florecer en situaciones de baja humedad y alta temperaturas.

Los hongos tienen como característica común la ausencia de clorofila, por tanto no pueden realizar fotosíntesis y deben nutrirse de materias orgánicas ya elaboradas. Pueden descomponer organismos muertos o sus productos y obtener el nutriente de otros organismos vivos o huéspedes.

Las características fundamentales de los hongos son:

- Todos son heterótrofos por lo que tienen que alimentarse de materia orgánica preformada que utilizan como fuente de carbono y de energía.
 - Son eucariotas, es decir, presentan núcleo diferenciado con membrana bien organizada.
 - Tienen una pared celular formada por quitina. Esta pared es rígida, por lo que no pueden fagocitar alimentos sino absorben nutrientes simples y soluciones que obtienen al desintegrar polímeros mediante enzimas extracelulares llamadas despolimerasas.
 - La estructura fúngica consta de un complejo llamado talo o micelio, que a su vez está constituido por múltiples filamentos o hifas (hyphomycetes o mohos)
- (5)

Estructuralmente el hongo *Aspergillus* consta de un conidióforo, una vesícula, métulas, fiálides y conidias. Las hifas son multinucleadas, el conidióforo se desarrolló de una hifa vertical, a partir de una célula horizontal llamada célula pie. Sobre la vesícula pueden desarrollarse las metulas y las fiálides, formando una

segunda capa. Las fiálides pueden crecer directamente sobre la superficie de la vesícula. Los hongos del género *Aspergillus* son hongos filamentosos que se ven influenciados en su crecimiento y biosíntesis por factores extrínsecos como agua, temperatura, pH y composición gaseosa del medio.

Por si mismos, los hongos sirven como alimento o se utilizan en la elaboración de otros: pan, vino, cerveza y quesos Roquefort y Camembert. Se usan para producir salsas de soya, fermentar la mandioca o yuca y producir tapioca. Se emplean en procesos industriales como la producción de ácido cítrico. También sirven para elaborar antibióticos como la penicilina, las cefalosporinas, griseofulvina y ácido fusídico, así como hormonas y enzimas. Por sus usos en la industria se ha desarrollado mucho la ingeniería genética.

2.4. Género *Aspergillus*

En 1729 el *Aspergillus* fue catalogado por primera vez en 1729 por el biólogo italiano Pier Antonio Micheli. El cual lo bautizo con el nombre de “*Aspergillus*” por parecerse al instrumento usado para dispersar agua bendita. La descripción hecha por Micheli de este género de hongo en su obra “**Nova Plantarum Genera**” tiene importancia histórica, al ser reconocido como un punto inicial de la ciencia de la micología.

El *Aspergillus* es un género de alrededor de 200 especies (mohos) y se pueden clasificar en dos formas morfológicas básicas: las levaduras y las hifas.

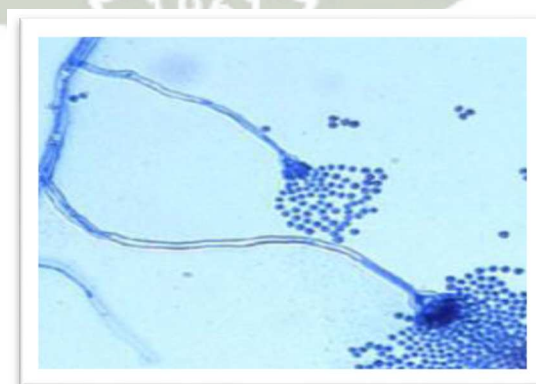


Figura 2. Hifas de *Aspergillus*

Extraído de: <http://www.microbiologia.com.ar/bacteriologia/fisiologia.php?Mostrar=quimicos>

El *Aspergillus* es un hongo filamentosos compuesto de cadenas de celulares, llamadas hifas, a diferencia de las levaduras que están compuestas de una sola célula redondeada. Generalmente el hábitat natural del *Aspergillus* son el heno y el compostaje.

2.4.1 *Aspergillus niger*.

Es un hongo filamentosos, su nombre *Aspergillus niger* hace referencia al color negro de sus esporas. Se clasifica dentro de la familia Trichocomaceae, orden Eurotiales, clase Eurotiomycetes, filum Ascomycota.



Figura 3. *Aspergillus niger*

Extraído de: www.biologie.uni-hamburg.de/b_online/ibc99/botanica/botanica/eurotial.htm

La estructura microscópica del *Aspergillus niger* es única. Tiene hifas tabiculares y conidioforas cuya cabeza está localizada en el extremo de una hifa, compuesta por una vesícula rodeada por una corona de fiálides en forma de botella directamente insertadas sobre la vesícula. De la fiálides se desprenden las esporas (conidios).

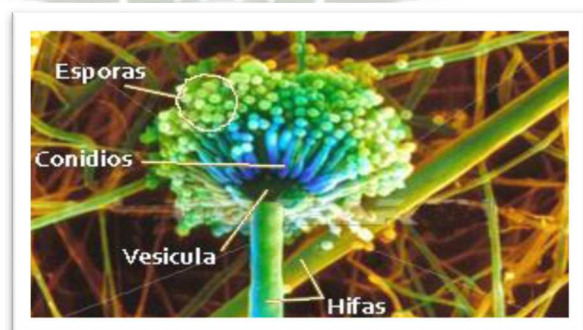


Figura 4. Estructura microscópica del *Aspergillus niger*

Extraído de: www.sciencephoto.com/media/13668/view

Geográficamente tiene una amplia distribución mundial, su ocurrencia ha sido documentada desde la región ártica hasta el trópico. Se encuentra distribuido en suelos con pH entre 4 a 8 y su abundancia relativa aumenta luego de las actividades de labranza y fertilización del suelo, tolera altas concentraciones de herbicidas (35mg/g de Dalapon). Habita en una variedad de sustratos incluyendo: granos, forraje, frutos, vegetales, semillas y en la izósfera de una gran variedad de plantas como banano, trigo, arroz, algodón, café, papa, caña de azúcar, cebada avena, maíz y guisantes entre otros.

Este hongo es empleado en varios procesos industriales, por la variedad de enzimas que produce y porque no necesita medios exigentes ni condiciones estrictas para su crecimiento.

Los ácidos cítrico y glucónico son obtenidos comercialmente por el uso de este microorganismo. Así mismo se producen enzimas y algunos antibióticos.

2.5. Suero de leche (lactosuero)

El lactosuero o suero de leche es el líquido claro de color amarillo verdoso, color debido al pigmento de la lactoflavina o vitamina B2, que resulta de la coagulación de la leche durante la elaboración del queso. Tiene una densidad un poco superior a la densidad del agua. Frecuentemente posee todos los componentes de la leche con excepción de la caseína y un poco menos de grasa, posee un sabor ligeramente ácido, bastante agradable. Se obtiene tras la separación de las caseínas y de la grasa. Representa alrededor del 90% del peso de la leche utilizada para la elaboración del queso. Contiene entre el 6% y el 6,4% de extracto seco, es decir, la mitad de la materia seca de la leche.

Según el procedimiento utilizado para separar la cuajada del queso (coagulación ácida o coagulación enzimática), se obtiene *lactosuero dulce* o *lactosuero ácido*. El empleo de uno u otro procedimiento de separación de la cuajada del queso van a determinar también una diferente composición

del lactosuero. El *lactosuero industrial*, que es otra variedad, se obtiene coagulando las proteínas por la adición de otros ácidos como el ácido clorhídrico, sulfúrico o acético (25).

Tabla 8. Composición promedio de la leche, sub-productos y residuos (mg./l.)

Propiedad	RESIDUOS				
	Leche entera	Leche descremada	Suero de mantequilla	Suero	Suero separado
Sólidos totales	125.000	82.300	77.500	72.000	54.772
Sólidos orgánicos	117.000	74.500	68.800	64.400	49.612
Cenizas	8.000	7.800	8.700	8.000	5.160
Sólidos solubles					54.656
Sól. suspendidos					
Azúcar de leche	45.000	46.000	43.000	44.000	
Caseína	38.000	39.000	36.000	8.000	
Nitrógeno orgánico total					1.300
Amoníaco libre					31
Sodio					648
Potasio					1.000
Calcio					350
Magnesio					78
Fósforo					450
DBO	102.500	73.000	64.600	32.000	30.100
Oxígeno consumido	37.750	32.200	28.600	25.900	
Grasas	36.000	1.000	5.000	4.000	

Extraído de: 1 Baena, S. et. al. 1994. Aguas residuales de la industria láctea: Naturaleza y composición de las aguas residuales. Revista Ambiente y Desarrollo, pp. 88-89

La composición del suero de leche varía dependiendo de las características de la leche y de las condiciones de elaboración del queso de que proceda, pero en términos generales se puede decir que el suero contiene 4,9% de lactosa, 0,9% de proteína cruda, 0,6% de cenizas, 0,3% de grasa, 0,2% de ácido láctico y 93,1% de agua. Aproximadamente el 70% del nitrógeno total (proteína cruda), deriva de proteínas, las cuales tienen un valor nutritivo superior al de la caseína, y está compuesta por la β -lactoglobulina, la α -lactoalbúmina, las inmunoglobulinas, la proteosa-peptona y las enzimas

nativas; el resto lo forman aminoácidos, urea, creatina, amoníaco y ácidos nucleicos (15). En la Tabla 8 se relaciona la composición de la leche y sus productos.

El contenido de grasa depende del que tuviera la leche empleada. Si el contenido de grasa del lactosuero es superior al 0,1% se debe desnatar. La nata obtenida se transformar en mantequilla o se utiliza para normalizar el contenido de grasa de los quesos. En la Tabla 9 se presenta una descripción de la composición del lactosuero cuando es dulce y ácido.

Tabla 9. Composición de lactosuero fresco¹

Componente	Suero dulce	Suero ácido
Agua	93 – 94%	94 – 95%
Extracto seco	6 – 7%	5 – 6%
Lactosa	4,5 – 5%	3,8 – 4,2%
Ácido láctico	TRAZAS	< 0,8%
Proteínas	0,8 – 1%	0,8 – 1%
Ácido cítrico	0,15%	0,1%
Cenizas	0,5 – 0,7%	0,7 – 0,8%
Valor de pH	6,45	Alrededor de 5

Extraído de: ¹ Spreer, E. 1991. Lactología industrial. Editorial Acibia. España. pp. 528

Para tratar el suero de leche se recomienda su enfriamiento a 7°C (o un poco menos) si se va a trabajar a dos horas de su obtención o temperaturas de 4°C para conservaciones de más tiempo (mayores de 24horas), y se aconseja un desnatado previo cuando se tiene un contenido graso mayor a 0,1%, evitando así su descomposición.

En proceso de filtración del lactosuero no es necesario, ya que las miscelas de caseína que permanecen en solución son muy pocas. Sin embargo, debido al contenido de grasa y a los tratamientos en la elaboración de queso y a elementos no deseables para el tratamiento del lacto suero se hace útil y así evitar una posible contaminación.

El método térmico para la concentración de proteínas del lactosuero consiste en que las moléculas de las proteínas sufren fácilmente alteraciones sustanciales en su estructura terciaria (despliegue) cuando una proteína soluble se calienta a altas temperaturas (mayores a 60°) en una solución neutra o ligeramente ácida, produciendo un precipitado (coagulación o desnaturalización por calor) que no se disuelve cuando se deja enfriar.

Todas las proteínas son insolubles o menos solubles en su punto isoeléctrico (PI), pero a pH por encima o pH debajo de este PI se hacen solubles, salvo pH extremadamente ácido o básico.

Muchos investigadores coinciden en que el proceso de calentamiento es el más simple y el de mayor rendimiento en la precipitación de las proteínas del lactosuero, proponiendo unos intervalos de pH y temperatura muy parecidos entre sí, y las diferencias entre los mismos dependen únicamente de las características del suero (14).

Dentro de los usos del lactosuero se puede considerar que forman parte de un gran número de alimentos. Los reglamentos de Alimentos y Drogas permiten utilizar el lactosuero en polvo en el pan, helado, queso fundido y rellenos de carne, de pescado y de pollo. También se utiliza en muchos alimentos no normalizados, como caramelos, dulces, pasteles, etc.

Una forma de usar el lactosuero en polvo es mezclarlo con otros ingredientes para preparar sustitutos lácteos con fines específicos. Por ejemplo se pueden añadir al lactosuero proteínas de origen animal, vegetal o incluso leche, para conseguir una mezcla con unas propiedades funcionales determinadas según la aplicación prevista. Ejemplos de estas mezclas son:

- Lactosuero en polvo y caseinato con un contenido proteico del 20, 25 o 30% para galletería.
- Lactosuero en polvo, caseinato y proteínas de lactosuero, para helado
- Lactosuero en polvo y proteína de soja, para pasteles

- Lactosuero en polvo y leche desnatada en polvo, para helado.

También se utiliza el lactosuero para producir biomasa como material proteico y en forma líquida en la alimentación animal de porcinos, etc. Tal como se obtiene después de su acidificación natural. Además, constituye la materia prima para la obtención de otros subproductos importantes como la lactosa y las proteínas del lactosuero (3).

También se produce alcohol etílico utilizando *Saccharomyces fragilis* o *Torula cremoris*, bebidas de suero alcohólicas y no alcohólicas; mantequilla bien sea desnatándolo mecánicamente o arrastrando las albúminas mediante un proceso térmico. La cantidad de mantequilla obtenida es de mediana calidad y poca productividad. El lactosuero es también empleado en la elaboración de queso (requesón).

Debido a que el lactosuero es fermentable es que es un excelente medio de cultivo ya que se compone aproximadamente en un 70% de lactosa que es la principal fuente de carbono, por lo que se utiliza como sustrato para la obtención de un buen número de productos obtenidos a través de fermentación.

El suero no contiene mucho nitrógeno inorgánico que pueda ser utilizado por los microorganismos, por lo cual, frecuentemente es necesario añadirle sales de amonio. Por otra parte, el contenido de proteínas es relativamente alto; debido a ello es un excelente medio para microorganismos que requieran aminoácidos y sean capaces de hidrolizar las proteínas.

El lactosuero puede fermentarse directamente o fraccionarse antes de la fermentación. Los posibles fermentables son:

1. El lactosuero crudo.
2. El permeato resultante de la ultrafiltración
3. La melaza resultante de la cristalización de la lactosa

4. El suero residual resultante del procedimiento Centro-Whey; este procedimiento ofrece la posibilidad de reintegrar las proteínas desnaturalizadas por el calor al proceso de producción de queso.

La acidez de estos sustratos debe ajustarse antes de la fermentación al valor de pH que sea favorable para el crecimiento de los microorganismos añadidos. Pocas levaduras, si se exceptúa a *Saccharomyces fragilis*, son capaces de fermentar directamente y de una forma rentable, desde el punto de vista económico, la lactosa. El empleo de un cultivo mixto de levaduras y bacterias (por ejemplo, de lactobacilos y de levaduras de pan) ha demostrado ser la mejor solución para realizar la fermentación del suero. En una primera fase las bacterias fermentan la lactosa a ácido láctico hasta alcanzar un valor de pH de 4,5 – 5,0. Por adición de ácidos inorgánicos como el H_2SO_4 se puede bajar el pH hasta 2, creando condiciones todavía más favorables para el crecimiento de las levaduras. En una segunda fase las levaduras consumen el ácido láctico haciendo que el pH ascienda paulatinamente hasta un valor de 6,5. Simultáneamente en estas condiciones las células bacterianas muertas se lisan y sirven como alimento adicional para las levaduras. Todo el proceso de fermentación dura de 10 a 60 horas (25).

2.6. Bio-producción de ácidos orgánicos

Un uso industrial importante e implementado hace años del suero de leche fue la obtención ácido láctico a partir de una fermentación con bacterias lácticas. Las especies más importantes para esta fermentación fueron *Lactobacillus delbrueckii* ss. *bulgaricus* y *Lactobacillus delbrueckii* ss. *delbrueckii* y recientemente se ha empezado a utilizar *Lactobacillus helveticus*. Esta fermentación se realiza normalmente con suero desproteinizado y entre un 85 y 90% de lactosa se convierte a ácido láctico en solo 24 horas (15).

La producción de ácido acético se lleva a cabo realizando primero una fermentación alcohólica y posteriormente una fermentación acética aeróbica; las concentraciones obtenidas en estos casos son muy bajas. Se han hecho publicaciones en las que la producción de ácido acético se realiza mediante fermentación anaeróbica de suero con un cultivo mixto de *Lactobacillus lactis ss.lactis* y *Clostridium formicoactium*, la primera bacteria transforma la lactosa en ácido láctico y la segunda a éste en ácido acético en condiciones anaeróbicas, con este sistema se obtuvieron concentraciones hasta de 20 g/L en 20 horas (15).

La producción de ácido propiónico a partir de suero de leche se realiza generalmente utilizando la especie *Propionibacterium freudenreichi ss.sheimanii*, otras especies de *Propionibacterium*, o mezclas de ésta con *Lactobacillus* sp. ya que a las primeras les resulta más fácil asimilar el ácido láctico que la lactosa. El principal problema de esta fermentación es la baja productividad debido al lento crecimiento de las bacterias propiónicas y a las bajas concentraciones obtenidas. Se han obtenido resultados con sistemas de separación de células por filtración para su recirculación.

También se ha propuesto la obtención de ácido glucónico con *Gluconobacter oxidans*, pero debido a que este microorganismo es incapaz de metabolizar la lactosa es necesario primero hidrolizarla mediante un tratamiento con β -galactosidasa. La producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger* a partir de suero ultrafiltrado también ha sido probada (15).

Otros productos. Se ha propuesto la producción de glicerol con *K. Marxianus* en condiciones anaeróbicas y en presencia de sulfito de sodio. También ha sido propuesta la producción de otros compuestos químicos como: Butanol y acetona en permeado de suero mediante células libres o inmovilizadas de *Clostridium acetobutylicum*; producción de metano mediante fermentaciones anaeróbicas con cultivos mixtos.

Se ha reportado la posibilidad de producir polisacáridos extracelulares con microorganismos capaces de utilizar lactosa como fuente de carbono como *Alcaligenes viscosus* y *Zooglea ramigera*, o bien utilizando suero con lactosa hidrolizada, como es el caso de *Xanthomonas campestris*.

También se pueden producir vitaminas como la riboflavina (vitamina B₂) con *Eremothecium ashbyii* y de vitamina B₁₂ con *Propionibacterium freudenreichii* ss. *shermanii* y otras especies de *Propionibacterium* (15)

Dentro de la composición promedio de un lactosuero se encuentra la lactosa que se distribuye en una concentración de 5%, aproximadamente, en la leche de todos los mamíferos investigados, salvo la foca de California cuya leche parece que contiene glucosa y no lactosa.

La lactosa además de ser el único glucósido libre que existe en cantidad importante en la leche es también el más abundante, más simple y más constante en proporción. En la leche de vaca el contenido de lactosa varía poco (entre 48 y 50 g/L), lo que determina una gran confiabilidad de su presencia en el suero. Mediante experimentos de metilación y degradación se ha establecido que su estructura es 4-O-(β-D-galactopiranosil)-D-glucopiranososa (ver figura 5).

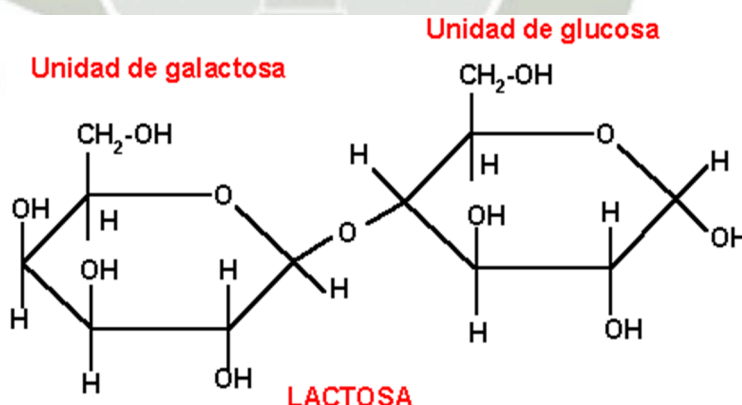


Figura 5. Estructura molecular de la lactosa.

Extraído de: <http://genesis.uag.mx/edmedia/material/quimicaII/Carbohidratos.cfm>

La lactosa (azúcar de la leche) es un disacárido reductor de D-galactosa y D-glucosa, unidos mediante un enlace glucosídico β 1-4. La glucosa queda con el carbono anomérico libre, pudiendo por lo tanto presentar las configuraciones α y β , siendo la forma α la más abundante.

Por hidrólisis ácida o enzimática, la lactosa produce una molécula de galactosa y una molécula de glucosa. Si primero se oxida a ácido lactónico y luego se hidroliza, los productos son galactosa ácido glucónico.

La degradación de la lactosa se logra cuando se alcanza los 110-130 °C, donde pierde el agua de cristalización. A los 150 °C se torna de un color amarillento y a los 175 °C se oscurece y se carameliza (21).

La lactosa es poco soluble en comparación al azúcar ordinario. Presenta un poder edulcorante seis veces menor que el del azúcar (sacarosa). En la leche, éste sabor dulce está enmascarado por la caseína. La lactosa se hidroliza por β -galactósidas. La hidrólisis se realiza de la siguiente forma:

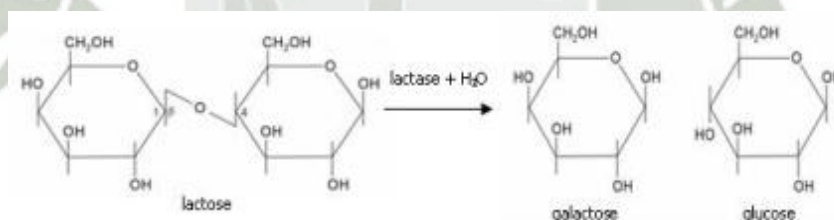


Figura. 6. Reacción de hidrólisis enzimática de la lactosa que logra descomponerla en glucosa y galactosa.

La transformación más importante de la lactosa es la de producir ácido láctico, la cual la realizan una gran cantidad de bacterias homo y heterofermentativas. La transformación es en realidad compleja; en general por cada 100 partes de lactosa transformada por las bacterias, se obtienen 96 partes de ácido láctico y cuatro de productos diversos (CO_2 , ácidos orgánicos, etc)

Para la determinación de la lactosa, se han utilizado métodos como, los colorimétricos, la reducción del reactivo cupro-alkalino de Fehling, la cromatografía gaseosa, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la espectrofotometría.

Resulta oportuno mencionar que el licor de maceración de maíz (LMM) es usado como fuente de derivados solubles de proteínas, oligoelementos y otros minerales, así como de sustancias activadoras de crecimiento que aceleran la fermentación. El contenido óptimo de licor de remojo de maíz es de 0.15% en volumen y debe contener un 40% de sólidos suspendidos (2).

Hay más de 3 500 usos diferentes para los productos que se extraen del maíz.

La composición química de grano de maíz es muy compleja. Reducida a un esquema, contiene alrededor de un 10% de sustancias nitrogenadas, entre el 60 y 70% de almidón y azúcares, y del 4 al 8% de materias grasas. El resto, hasta las 100 partes, es agua, celulosa, sustancias minerales. En la tabla 10 se observa la composición del maíz en base seca.

Tabla 10. Composición del grano de maíz en base seca¹.

COMPONENTES	PROMEDIO (%)	RANGO TÍPICO (%)
Fécula	71,3	64-78
Proteína	9,91	8-14
Grasa	4,45	3,1-5,7
Fibra cruda	2,66	1,8-3,5
Cenizas	1,42	1,1-3,9

Extraído de: ¹ www.sagpya.mecon.gov.ar/agricu/publicaciones/aceite/composición.htm

2.7. Ácido cítrico

El ácido cítrico es un ácido orgánico que abunda en la naturaleza muy extendido en el reino vegetal y animal, encontrándose en considerable

cantidad en los frutos cítricos. Como ácido libre o como sal, se encuentra en las semillas y los jugos de gran variedad de flores y plantas. Es un componente del vino (0,4 g/L), la leche (1 a 4 g/L), los productos lácteos y los tejidos y líquidos animales.

El ácido cítrico se comercializa como ácido cítrico monohidrato o como ácido cítrico anhidro. Se emplea en la industria farmacéutica (10% de la utilización total). Su buen sabor y la facilidad con es asimilado favorecen su utilización como ingrediente ácido para mantener el pH o para obtener un pH conveniente y hacer resaltar el sabor de una extensa variedad de productos en esas industrias. Recientemente se ha convertido en materia prima importante para usos industriales de carácter general como pulimiento y limpieza del hierro y acero, tratamiento y acondicionamiento de aguas industriales, y en la preparación de resinas, lacas, pinturas, y en el estampado de telas.

El ácido cítrico es el ácido 2-hidroxí-1,2,3-propanotri-carboxílico, con fórmula molecular $\text{HOOCCH}_2\text{C}(\text{OH})(\text{COOH})\text{CH}_2\text{COOH}$, con un peso molecular de 192.12. Tiene dos formas estables: el ácido cítrico monohidrato con un 91,42% de ácido cítrico anhidro y 8,5% de agua, y el ácido cítrico anhidro.

Se presenta en forma de cristales incoloros, translúcidos, o polvo fino o granular, blanco, inodoro y con un sabor ácido agradable.

El ácido cítrico se descompone en ácido oxálico y ácido acético cuando se funde con hidróxido de potasio o se oxida con ácido nítrico.

El ácido cítrico es fundamentalmente producido por 2 especies de aspergillus llamadas *Aspergillus niger* y *Aspergillus wentii*, aunque también se han utilizado levaduras, como *Saccharomycopsis lipolytica*, para la producción de ácido cítrico sobre sustratos no azucarados. Otras especies empleadas son *A.clavatus*, *Penicillium citrinum*, *Paecilomycesdivaricatum*,

Candida guilliermondii, *Trichoderma viridae*, *Arthrobacter parafiineus* y *Corynebacterium sp.*

La materia prima empleada como fuente de carbono es un carbohidrato, principalmente el azúcar impuro en forma de melazas, utilizándose también la remolacha, la harina de trigo, el agar, la malta de cebada, la xilosa (azúcar de madera), etc. Además del carbono, el oxígeno y el hidrógeno suministrados por el carbohidrato, el organismo necesita como elementos nutritivos nitrógeno, potasio, fósforo, magnesio y azufre. Otros factores importantes para la conversión de soluciones azucaradas en ácido cítrico por los hongos son la concentración de la solución, las técnicas de cultivo e inoculación, la temperatura, el pH y la aireación. En gran parte la influencia de cada factor está determinada por la cepa de hongo empleada.

Los medios de fermentación más utilizados para la producción de ácido cítrico han sido muy perfeccionados a lo largo de los muchos años que se lleva a cabo el proceso comercial. Las condiciones de los constituyentes básicos del medio que tienen efecto sobre la fermentación cítrica se listan en la Tabla 11.

Tabla 11. Condiciones que favorecen la producción de ácido cítrico¹

Alta concentración de azúcar	+ C
Bajas concentraciones de fosfatos	- PO_4^{-3}
Bajo pH	< 2,0
Alta concentración de oxígeno	+ OD

Extraído de: ¹ DELLWEG, H. *Biotechnology: A comprehensive treatise in 8 volumes*. By H-J Rehm and G. Reed, p. 424

Como fuente de carbohidrato puede ser utilizada un serie de materias primas: almidón de papa, hidrolizados de almidón, jarabe de glucosa de almidón sacarificado, sacarosa de diferentes niveles de pureza, jarabe de caña con dos tercios de sacarosa convertida en azúcar invertido, melazas de caña de azúcar, melazas de azúcar de remolacha. Si se utilizan almidón, éste

es hidrolizado a azúcares por las amilasas formadas por el hongo productor o añadido al caldo de fermentación.

Convencionalmente, el nitrógeno es suplido en las formas de nitrato o sulfato de amonio. Los compuestos de amonio son preferidos porque durante su uso el pH decrece, lo que es un prerrequisito para la fermentación cítrica.

Mantener el valor de pH bajo es extremadamente importante para un progreso exitoso en la fermentación. El pH óptimo de producción está entre 1,7 y 2,0.

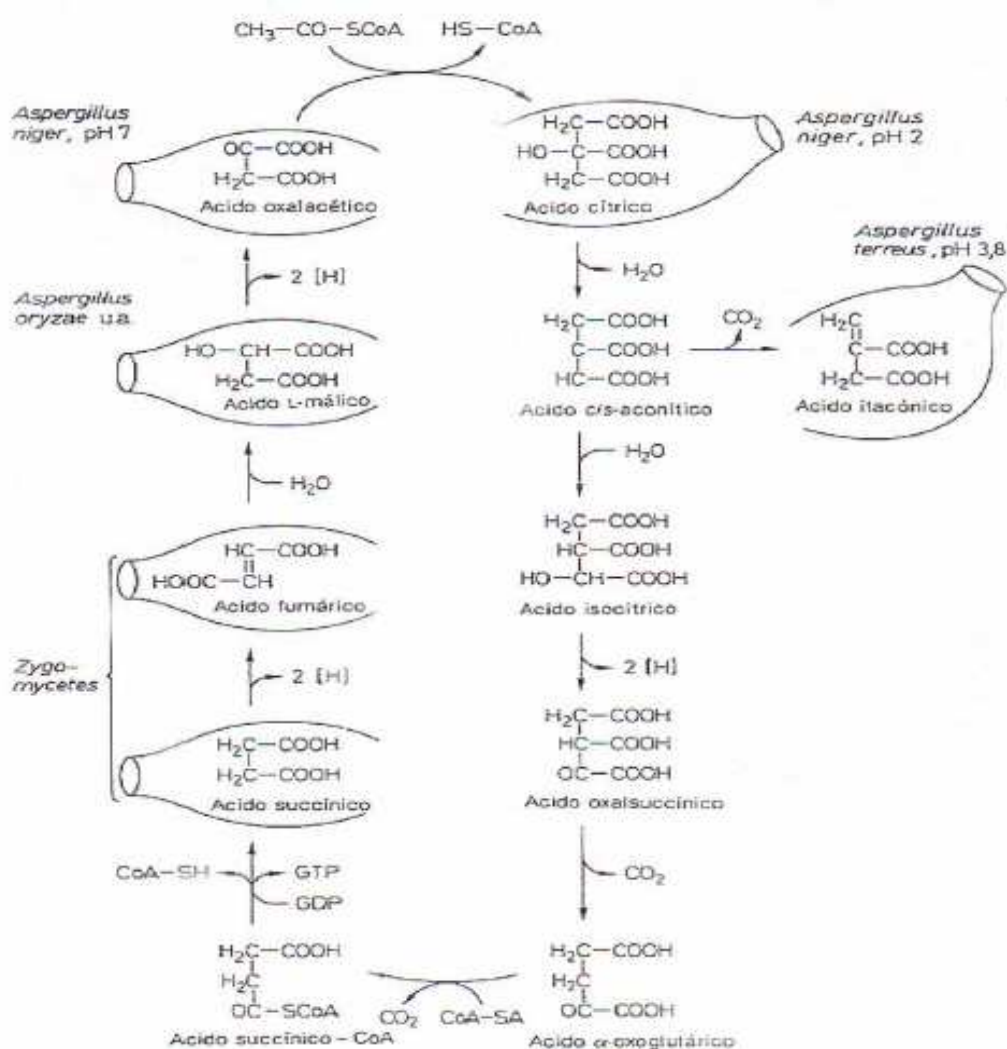


Figura 7. El ciclo de ácidos tricarboxílicos y sus productos sintetizados en exceso en hongos.

El cobre, manganeso, magnesio, hierro, zinc y molibdeno son necesarios para el crecimiento óptimo en un rango de ppm, sin embargo, un exceso de las concentraciones óptimas puede tener un efecto tóxico. Mientras que para un crecimiento óptimo se requiere una concentración alta de hierro, sólo 0,05 – 0,5 ppm de hierro son necesarias para la producción máxima de ácido cítrico. La sensibilidad de las cepas a metales pesados como zinc, hierro, manganeso y cobre desciende al descender la temperatura.

Los métodos voltamperométricos son una buena y económica opción (a veces la mejor opción) para el análisis de trazas de metales pesados en aguas y medio ambiente, en alimentos, productos químicos y también en baños galvánicos.

2.8. Producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger*.

El ácido cítrico se produce tanto en procesos en superficie como en procesos sumergidos. Los procesos en superficie pueden ser subdivididos de acuerdo con el estado del medio de cultivo que se utilice: sólido o líquido. Se utilizan dos tipos de procesos, sumergidos: fermentadores agitados o fermentadores de elevación por aire.

El material utilizado como inóculo para la producción de ácido cítrico es una suspensión de esporas.

Los procesos en superficie que emplean sustratos sólidos pueden utilizar miga de pan o pulpa de almidón de papa dulce como medio de cultivo. En este proceso las cepas de *A.niger* no son tan sensibles a los elementos traza como en otros procesos.. Si hay demasiado hierro se produce ácido oxálico y se forma un pigmento amarillo que más tarde entorpece el proceso de recuperación del ácido cítrico.

Tabla 12. Composición de la solución nutritiva para un cultivo en superficie¹.

Sustrato	g/L Sustrato
Sacarosa	160-200 ca. 320 – 400 g melazas
Nitrato de amonio	1,6 – 3,2. No se con necesita melazas
KH ₂ PO ₄	0,3 – 1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 – 0,5 No necesita con melazas
ZnSO ₄	0,01 – 0,10
Ferrocianuro de potasio	0,4 – 2,0

Extraído de: ¹Crueger, W. 1993. Biotecnología: Manual de microbiología industrial. Editorial Acribia, España, pp.42.

En la tabla 12 se muestra la composición de una solución típica de nutrientes, en procesos en superficie la sacarosa se suministra como melazas de remolacha más que como melazas de caña de azúcar.

El uso de procesos sumergidos aunque conlleva más tiempo (8 días) tiene varias ventajas: menor inversión en la construcción, 25% menos inversión total y costes más bajos de mano de obra. Las desventajas son los costes más altos de energía y la tecnología de control más sofisticadas que requiere personal más entrenado. Tres factores son especialmente importantes en procesos sumergidos:

La calidad del material utilizado para construir el fermentador: Los fermentadores deben ser protegidos de los ácidos o contruidos en acero inoxidable. A valores de pH entre 1-2 los metales pesados se liberan de las paredes de los fermentadores normales de acero y pueden inhibir la formación de ácido cítrico. Con fermentadores de hasta 1.000L, las cámaras de acero inoxidable deben llevar un recubrimiento de plástico debido a la

gran relación de superficie a volumen. En fermentadores grandes no es necesario el recubrimiento si se utiliza acero inoxidable.

La estructura del micelio en el bioreactor: La estructura del micelio que se forma en el cultivo sumergido durante la trofofase es vital para un proceso de producción con éxito. Si el micelio es laxo y filamentosos, con ramificaciones limitadas y sin clamidosporas, se produce poco ácido cítrico en la idiofase. Para conseguir una velocidad óptima de producción, el micelio debe estar formado por bolas sólidas muy pequeñas.

Las cepas de *Aspergillus niger* utilizadas por los fabricantes constituyen un secreto muy conservado, así como lo son las variaciones menores y las mejores y las mejoras en la tecnología del proceso. Esto se debe a que la producción de ácido cítrico es relativamente sencilla, de forma que solamente se obtiene ventajas competitivas explotando astucias relacionadas con el tipo de cepa o mejoras en la eficiencia de los métodos de producción.

La producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* es fuertemente sensible a la presencia de iones manganeso en el medio, la velocidad de producción se reduce dramáticamente si hay manganeso presente a una concentración incluso tan baja como $3\mu\text{g/mL}$. Por consiguiente es necesario pretratar el medio conteniendo melazas con agentes como hexaferrocianuro o con cobre para inhibir la toma de manganeso, contrarrestando de esta manera sus efector inhibitorios. Cuando la concentración de manganeso aumenta, la morfología fúngica se vuelve filamentosos, incrementando drásticamente la viscosidad del cultivo y disminuyendo rápidamente la tensión del oxígeno disuelto.

Para monitorear el crecimiento fungal, existen muchos métodos para la determinación del crecimiento de células microbianas entre los cuales podemos mencionar: peso seco, absorción, peso húmedo, volumen de células empacadas, número de células, masa de componente celular, mediciones físicas.

Tabla 13. Métodos para la cuantificación de crecimiento de poblaciones microbianas¹

Métodos	Fundamento	Observaciones
Recuento de celda	Conteo directo del número de células	Requiere células individuales y medio limpio
Recuento de placa	Conteo del número de colonias	Requiere células individuales, incidencia de las condiciones de incubación
N.M.P	Estadístico	Requiere células individuales y medio limpio
Peso seco	Medición directa	No admite sólidos en el medio
Turbidimetría	Transmisión de la luz	Requiere células individuales y medios limpios.
Volumen empacado	Centrifugación	Poco preciso

2.9. Fermentación en bioreactor tipo tanque agitado (CSTR)

Es el tipo de bioreactor más empleado en la industria. La agitación es requerida para proporcionar un amplio rango en la transferencia de materia, en la energía y en la mezcla, de forma que se asegure la homogeneidad en cultivos con sólidos en suspensión. Se puede operar de tres formas diferentes: discontinuo, discontinuo alimentado (fed-batch) y continuo, transcurriendo los dos primeros procesos en estado no estacionario. Para este trabajo de investigación el reactor utilizado fue el fermentador discontinuo de tanque agitado. Los reactores discontinuos son empleados mayoritariamente en las industrias alimentaria, farmacéutica y biotecnológica en general, puesto que con ellos se pueden alcanzar y mantener condiciones asépticas durante la operación en periodos cortos.

En un bioreactor discontinuo, tanto el medio medio de fermentación como el inóculo se introducen en el sistema al comienzo de la operación. El reactor se encuentra perfectamente mezclado, de forma que la concentración de todos los componentes en cualquier punto del reactor es la misma.

Este tipo de bioreactor consiste en un cuerpo cilíndrico de vidrio, encamisado en su parte inferior con acero inoxidable donde se aloja el

circuito termostático por el que circula agua de temperatura controlada. La pared de vidrio dispone en su parte superior de conexiones esterilizables de polipropileno, para permitir la adición de nutrientes, o bien como rebosadero para la salida de cultivo.

El cuerpo cilíndrico está cerrado superiormente por un disco de acero inoxidable en el que se encuentran los orificios necesarios para la inoculación, suministro de antiespumante, adición de ácido o base para control del pH, vaina metálica para colocar la sonda de temperatura, distribuidor de gas, dispositivo para la toma de muestra, condensador de humedad para el aire efluente, electrodos de oxígeno disuelto y de pH.

Asimismo, se encuentran incorporado el eje del agitador y su rodamiento, montados sobre una junta estanca que garantiza el aislamiento del exterior a fin de hacer posible la esterilidad del cultivo.

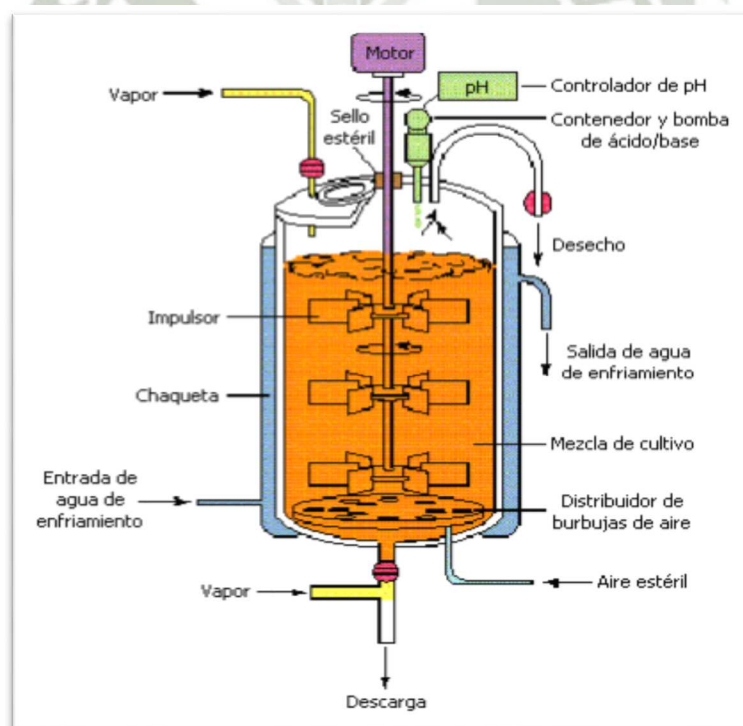


Figura 9. Esquema del bioreactor de tanque agitado de 1.6L Bioflo 3000
Extraído de: <http://newbrunswick.eppendorf.com>

La agitación es producida por un servomotor desmontable, colocado sobre el engranaje del eje del agitador en el disco de cubierta del reactor. Puede

retirarse y colocarse fácilmente para las labores de lavado y esterilizado del recipiente. La velocidad de agitación puede regularse entre 25 y 1000 rpm.

Sobre el eje están fijadas dos turbinas Rushton de 6 paletas, colocadas, la inferior a un diámetro de turbina desde el fondo del recipiente, y la superior a un diámetro y medio sobre la turbina inferior.

El diámetro de las turbinas es de 5,5cm, y las paletas tienen 1,7cm de largo 1,2 cm de alto. El reactor está provisto de cuatro tabiques deflectores de 20,3 x 1,6cm separados 0,3 cm de la superficie interna.

La temperatura a la que se realiza el cultivo puede seleccionarse en el intervalo de 4 a 80°C ($\pm 0,1$ °C), medida en el seno del fermentador con una sonda de resistencia, y es gobernada por un controlador PID que actúa sobre el caudal y la temperatura del agua contenida en la camisa de termostatación.

El fermentador dispone de una resistencia interna que es capaz de calentar el agua que baña la camisa termostatizadora cuando la temperatura fijada para el sistema es mayor que la del cultivo. En el caso contrario, el sistema necesita de un aporte de agua de refrigeración. La temperatura del baño se mantiene a un máximo de 14 °C y lo más estable posible con el fin de facilitar el funcionamiento del controlador que debe estar constantemente extrayendo el calor generado. La presión de entrada de agua de refrigeración del fermentador se mantiene constante mediante una bomba centrífuga provista de un circuito de derivación con válvula para aliviar el exceso de carga.

La medida del pH se realiza mediante un electrodo combinado Ingold esterilizable mediante autoclave. El control, en el intervalo de 2,00 a 12,00 ($\pm 0,01$) unidades de pH, se ejerce mediante un controlador PID que opera sobre dos bombas conectadas a los orificios de adición de ácido ó base.

2.10 Cinética de reacción microbiana

Durante la fermentación, el sustrato se consume, los microorganismos crecen y se multiplican y se forma el producto. La biocinética de las fermentaciones estudia los procesos de consumo de sustrato, de formación de biomasa y de biosíntesis de productos.

Las fermentaciones se pueden clasificar en dependencia de los perfiles de formación de biomasa y de producto. Para los tipos II y III de fermentaciones se distinguen la tropofase y la idiofase. La tropofase es el periodo inicial de la fermentación, durante la cual la biomasa crece con gran velocidad y el producto no se forma o se forma en bajas concentraciones. La idiofase es el periodo de la fermentación en el cual la velocidad del producto es alta. En la tabla 14 se puede observar la forma en que se clasifican las fermentaciones.

Tabla 14. Clasificación de la fermentación según Gaden (1978)¹.

Tipo	Relación específica de velocidad	Ejemplo
I	Formación de producto relacionada directamente con la utilización del carbohidrato	Etanol
II	Formación de producto indirectamente relacionada con el uso del carbohidrato	Ácido cítrico
III	Formación de producto aparentemente no relacionada con el uso del carbohidrato	Penicilina

Extraído de: ¹ Kafarov, V. 1979. Modelirovaniye Biojímicheskij Reaktorov, Ed. MIR. Moscow. pp. 342

Los procesos de fermentación que transcurren dentro de los bioreactores son bastante complejos, ya que involucran procesos biocinéticos de transferencia de masa y calor, y en el caso de bioreactores de gran tamaño,

fenómenos hidrodinámicos. Para analizar el régimen de trabajo de los biorreactores y su diseño es necesario utilizar modelos matemáticos. Una de las etapas principales del modelamiento matemático de un bioreactor es la etapa de elaboración del modelo biocinético.

El modelo biocinético consiste en un conjunto de expresiones matemáticas que describen la velocidad de crecimiento del cultivo de microorganismos y la influencia sobre ellos de las condiciones del medio en que éstos se desarrollan.

Durante el proceso de cultivo microbiano cambia la composición cualitativa del mismo lo que influye sobre el cultivo microbiano cambia la composición cualitativa del mismo lo que influye a su vez sobre la velocidad de acumulación de biomasa y de productos del metabolismo.

En un cultivo por lotes se observan diferentes fases de crecimiento celular. Durante la fase de latencia que se verifica inmediatamente después de la inoculación, la tasa de crecimiento es esencialmente nula. Las células aprovechan la fase latente para adaptarse a las nuevas condiciones ambientales: sintetizan nuevas enzimas o nuevos componentes estructurales. Le sigue a esta fase, la fase de crecimiento exponencial. Debido al consumo de nutrientes o a la acumulación de productos inhibidores, el crecimiento decae y las células entran en la fase estacionaria en la que no ocurre ningún crecimiento. En la figura 10 se muestra una curva para un cultivo por lotes.



Figura 10. Curva típica de un cultivo por lotes.

Durante la fase de crecimiento la velocidad o tasa de crecimiento celular se describe por el modelo de Malthus:

$$r_x = \mu \cdot X \quad (1)$$

Donde

r_x : Tasa o velocidad volumétrica de formación de biomasa, g/(L.h) ó Kg/(m³.h)

μ : Velocidad específica de crecimiento, h⁻¹

X : Concentración de biomasa, g/L ó Kg/m³

En un proceso por lotes, que se considera un sistema cerrado y donde el crecimiento es el único factor del proceso que afecta la concentración, reemplazando en la ecuación anterior $r_x = dX/dt$, derivando la ecuación resultante e integrando se llega a la ecuación 2 que representa el crecimiento exponencial de la biomasa,

$$X = X_0 \exp(\mu \cdot t) \quad (2)$$

Durante la fase exponencial de crecimiento celular en un cultivo por lote, la velocidad específica de crecimiento depende de la concentración de los nutrientes en el medio. Frecuentemente, un único sustrato ejerce una influencia dominante sobre la tasa de crecimiento y es denominado sustrato limitante. Para modelar la dependencia de la velocidad de crecimiento en función de la concentración de sustrato limitante se utiliza el modelo de Monod:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S} \quad (3)$$

donde:

S : Concentración del sustrato limitante

$\mu_{\max}$: Velocidad específica de crecimiento celular máxima, h⁻¹.

K_s : Constante de Monod,

Los valores típicos de K_s son muy pequeños, del orden de mg/L para sustratos con base en carbohidratos y de $\mu\text{g/L}$ para otros compuestos como aminoácidos. Normalmente el nivel de sustrato limitante en los medios de cultivo es mucho más grande que K_s .

La ecuación de Monod es la más utilizada para expresar la relación entre velocidad de crecimiento y la concentración de sustrato, sólo que no es aplicable a condiciones ambientales que cambien rápidamente, a niveles de sustrato extremadamente bajos, y cuando se presenta inhibición de por sustrato o producto se deben agregar términos adicionales para que el modelo tenga en cuenta estos aspectos.





CAPITULO III: Materiales y Métodos

3.1 Lugar de ejecución

El trabajo de tesis fue ejecutado en los laboratorios H-101 y H-301 de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa y en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Nacional Carlos Alberto Segúin Escobedo.

3.2 Materiales

Material biológico. Se empleó como microorganismo productor de ácido cítrico la cepa fúngica de *Aspergillus niger*; la cual fue proporcionada por el laboratorio de Microbiología de la Universidad Católica de Santa María.

Material de vidrio

- Balón de 1,0 litro
- Erlenmeyer de 250 ml
- Placas Petri
- Pipetas de 1 ml.
- Pipetas de 5 ml.
- Termómetro digital
- Láminas porta objetos
- Láminas cubre-objetos
- Vaguetas
- Mechero de alcohol
- Beaker de 500 ml.
- Beaker de 250 ml.
- Embudos
- Tubos de ensayo
- Buretas de 50 ml.

Reactivos e insumos

- 15 g. Sacarosa q.p.
- 15 g. Agar-Agar
- 5 l. Agua destilada estéril
- Suero lácteo proporcionado por Laive S.A.
- 400 g. Papa común (*Solanum tuberosum*)
- 2 Maíz blanco (*Zea maíz*)
- 65 g. Agar Sabouraud
- 50ml NaOH 1N ; 0,01 N
- 30ml HCl 1N
- Hipoclorito de sodio p.a.
- 50 ml. Reactivo de Fehling A
- 50 ml. Reactivo de Fehling B

Equipos

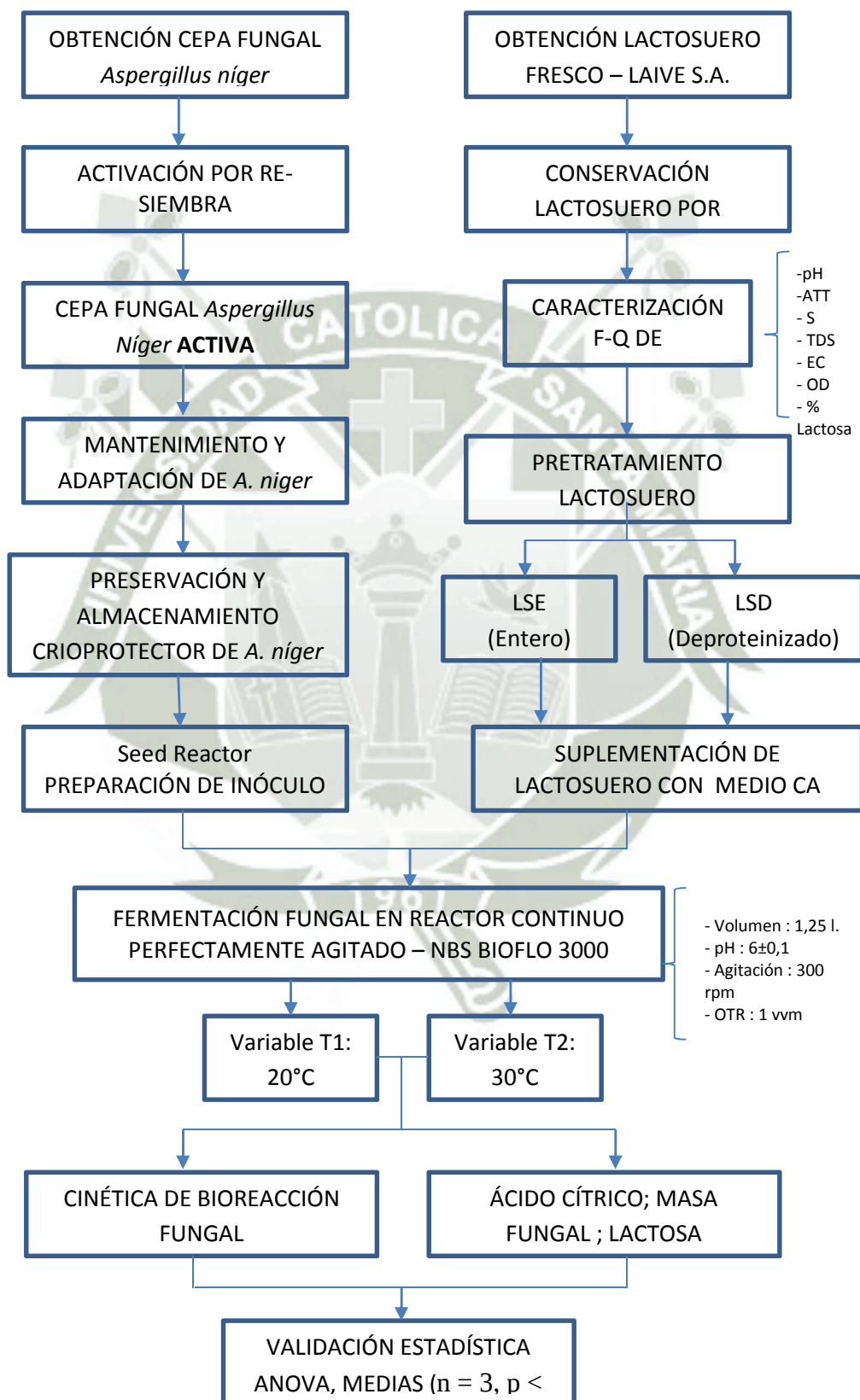
- 1 Autoclave vertical a vapor
- 1 Balanza analítica electrónica
- 1 Cámara de flujo laminar horizontal
- 1 Estufa de secado y esterilización
- 2 Microscopios binoculares
- 1 Refrigeradora
- 1 Estufa
- 2 Centrifugas
- 1 Bioreactor NBS BIOFLO 3000
- 1 Baño termostático
- 1 Cocinilla eléctrica
- 1 Potenciómetro con sensor de pH

Otros

- 2 Asa de cole
- 2 paquetes Papel filtro
- 20 pares Guantes de látex
- 1 Lente protector
- 1 rollo Cinta medidora de pH
- 1 Soporte universal
- 2 Goteros
- 5 Jeringas para inoculación
- 1 kg de Algodón
- 10 paquetes Gasa grande
- 2 rollos Cinta adhesiva
- 2 Rejillas
- 2 Encendedores
- 2 rollos Papel film
- 2 Tijeras

3.3 Métodos

A continuación se presenta el flujograma de actividades realizadas durante el presente trabajo de investigación:



Tratamiento Fúngico

3.3.1 Obtención de la cepa fungal activa.

Para la experimentación se utilizó una cepa de *Aspergillus niger* crioconservada en glicerol en tubo de ensayo de 5 ml. y fue proporcionada por el coordinador de proyectos de investigación del P.P. de Ingeniería Biotecnológica de los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María (UCSM).

3.3.2 Activación por re-siembra.

Su etiqueta confirmó la caracterización de la especie fungal se manipuló de acuerdo a su protocolo de manejo realizando una resiembra en Agar Saboraud en placas Petri y en tubos de ensayo, incubados a $30 \pm 0,5$ °C por 7 días hasta que germinaran las esporas. Luego se realizaron suspensiones en agua estéril con Tween 80 hasta alcanzar, aproximadamente, $2,0 \cdot 10^7$ esporas/ml. para su posterior inoculación en los medios elaborados para adaptación y mantenimiento (Sánchez *et al.*, 2004).

3.3.3 Mantenimiento y adaptación de la cepa fungal de *A. niger*.

En esta etapa se realizó la adecuación de las conidias y micelio provenientes del medio sólido de obtención a nuevas condiciones ambientales en cultivo líquido permitiéndose el desarrollo del material fungal para obtener el inóculo para medios posteriores de producción. La composición del medio líquido empleado en esta etapa se muestra en la tabla 15. El licor de remojo de maíz se preparó dejando en remojo durante 24 horas, 20 g. de maíz blanco (*Zea maíz*) en 100 ml. de agua destilada deionizada y con posterior filtración para retirar el sólido agotado. Posterior a su preparación se ajustó el pH a un valor de $5,5 \pm 0,1$ usando goteo de solución de HCl 1N y se esterilizó por autoclavado ($121^{\circ}\text{C} - 15$ psi) por 20 minutos. Este medio, luego de ser enfriado, fue sembrado a temperatura ambiente realizando un raspado de las conidias de *Aspergillus niger* procedente del respectivo medio de obtención (método descrito anteriormente) bajo llama de

mechero utilizando tres erlenmeyers de 250 ml. con 100 ml. de medio líquido y se incubaron en baño termostático con agitación constante (150 rpm) y a 30 °C por 5 días. El caldo así obtenido se denominó caldo o medio de adaptación (CA) listo para preparar el inóculo fungal de producción.

Tabla 15. Composición del medio de adaptación¹ (CA).

Componente	Concentración (g./l.)
Papa ²	300
Sacarosa	15
Agua destilada ³	500 – 700 ml.
Licor de remojo de maíz ⁴	15 ml.

¹ Por litro de medio CA; ² raspada y finamente molturada; ³ hasta completar 1 litro de Medio; ⁴ Preparado de acuerdo a protocolo estandarizado

3.3.4 Preservación y almacenamiento crioprotector de la cepa.

Para preservar la cepa se colocó una pequeña cantidad en tres diferentes tubos Eppendorf agregando 0,5 ml. de glicerol como agente crioprotector y 0,5ml. de suero fisiológico estéril a cada uno de ellos sellándolos herméticamente y se congelaron las células fungales en suspensión conservándolos a -24 °C con que se logró mantener la cepa activa en estado latente y por un largo plazo de almacenamiento.

3.3.5 Obtención de inóculo fungal de producción.

Se conformó un semillero, denominado también “Seed Reactor, SR” (18) con la finalidad de obtener el inóculo fungal para alimentar el reactor de producción CSTR utilizando un balón estéril de 250 ml. al cual se le agregó 100 ml. de caldo CA (tabla 16) y 50 ml. de LSD, se autoclavó a 121°C – 10 psi por 20 minutos, se permitió enfriamiento y se inoculó con la cepa fungal de *A. niger* adaptada del método anterior bajo campana de flujo laminar. Se colocó el balón así preparado en agitador orbital a 35°C y 100 rpm por 5 días para permitir el desarrollo de biomasa fungal activa en lactosuero. Finalmente, al término de los cinco días de incubación se sometió el contenido del SR a agitación con pastilla magnética

hasta homogenizar la suspensión fungal y se tomó una alícuota de 10 ml. en tubo de centrífuga y se sometió a centrifugación a 5 000 rpm por 5 minutos luego de los cuales se decantó el sobrenadante y se agregó 10 ml. de agua destilada estéril y se volvió a resuspender el sedimento volviendo a repetir la centrifugación y el decantado. El procedimiento se replicó tres veces usando al final suero fisiológico. Al finalizar la metodología descrita se pesó el contenido de sedimento fungal obtenido y se relacionó con el contenido del SR del cual fue tomada la muestra analizada. El resultado experimental se etiquetó como masa de inóculo fungal inicial (Mo, g.) al momento de utilizarlo en el reactor CSTR de producción.

Tratamiento del Lactosuero

3.3.6 Obtención y conservación de suero lácteo (lactosuero). Se obtuvo dos muestras de 2,5 litros de lactosuero de origen parmesano obtenidas de las instalaciones de Laive S.A. las que fueron tomadas utilizando recipientes estériles y fueron transportadas al laboratorio en caja térmica a 4 °C para evitar su deterioro y se conservaron en congelación a -8 °C con la finalidad de almacenarlas sin el agregado de ningún tipo de preservante químico que pudiera alterar su composición original.

3.3.7 Caracterización físico-química de suero lácteo. Las muestras de lactosuero así obtenidas se caracterizaron físico-químicamente determinando sus propiedades siguientes: a) pH y acidez total titulable (ATT) ; b) salinidad (S); c) sólidos totales disueltos (TDS); d) conductividad (EC); e) Oxígeno disuelto (OD) ; y f) contenido de lactosa. El pH, S, TDS, EC y OD fueron determinados usando el multiparámetro Hannah Mod. HI-6828; la ATT fue obtenida por titulación usando sol. estándar de NaOH 0,1 N (12) y expresada en °D (Dornick) y el contenido de lactosa mediante el método estandarizado de Fehling (azúcares reductores) (22).

3.3.8 Pre-tratamiento de las muestras de lactosuero. El 50% de la muestra de lactosuero obtenida fue derivada para ejecutar un pre-tratamiento de

termocoagulación a 90°C en autoclave para deproteínizarla seguida de una centrifugación a 6 000 rpm por 5 minutos (17) para eliminar los coágulos obtenidos y obtener la muestra deproteínizada. De este modo se obtuvo dos tipos de lactosuero diferentes: LSE (Lactosuero entero) y LSD (Lactosuero deproteínizado). Cuando las muestras de lactosuero (LSE y LSD) estuvieron preparados, se procedió a ajustar su pH a un valor aproximado de 6,02 para LSE 6,08 para LSD utilizando escasas gotas de HCl 5N ya que es el requerido para el bioproceso de fermentación fungal (11). Luego de ajustar el pH, se procedió a esterilizar las muestras en autoclave a 121°C y 15 psi por 20 minutos para LSD y usando microfiltración continua mediante membranas de 0,2 μ m. y se conservaron en erlenmeyers estériles utilizando tapones de gasa y algodón para evitar su contaminación (estos tapones permiten el paso de aire que se necesita para una óptima fermentación).

3.3.9 Fermentación Fungal en el reactor continuo perfectamente agitado – NBS Bioflo 3000

Dos mil doscientos cincuenta ml. de las muestras de LSE y LSD fueron suplementados con 250 ml. de caldo CA para conseguir sus suplementación nutritiva y conformar una relación 1:10 v/v de CA/LSE y 1:10 v/v de CA/LSD (22). Las muestras de lactosuero suplementadas así obtenidas fueron caracterizadas en su contenido de lactosa de acuerdo al método estandarizado de Fehling para azúcares reductores (22).

Mil doscientos cincuenta ml. de lactosuero suplementado CA/LSE fueron colocados en el vessel de vidrio del NBS BIOFLO 3000 ajustando su pH a un valor 6,02 utilizando HCl 1N para iniciar la fermentación fungal controlada. Seguidamente, se conformó la configuración completa del equipo de acuerdo a las recomendaciones del fabricante cerrando el vessel con el Headplate de acero inoxidable y utilizando los puertos de agitación, pH (electrodo de vidrio), OD (electrodo de polarización), temperatura (sensor RTD), inoculación, condensación y reflujo, alimentación de gases por sparger y toma de muestra. El equipo así configurado fue sometido a esterilización usando autoclave a 121°C – 15 psi por 25 minutos. El mismo procedimiento fue seguido usando CA/LSD y se

ejecutó la experimentación con tres repeticiones para determinar validez estadística (9).

Utilizando el vessel del bioreactor autoclavado del método anterior, se instaló con la consola de control automático P-I-D del equipo y se ajustaron los set-points en modo Fermentación / Calibración a las siguientes variables de control: a) Agitación: 300 rpm para no dañar el desarrollo de la cepa fungal; b) Temperatura: 20 y 30°C (de acuerdo al valor de la variable bajo estudio); c) Alimentación de gases (aire): 1 vvm.; d) 1 vvm; e) pH: 6, , para la primera corrida experimental utilizando LSES y a 20C; para las primeras tres variables se activó el modo de control P-I-D que significó control automático proporcional-integral-derivativo (7) para utilizar el bucle de retro-alimentación controlante; es decir, si la temperatura aumentara en 1°C monitoreada por el sensor RTD, el controlador proporcionalmente alimentaría agua de enfriamiento a la chaqueta y ejecutaría la reducción de la temperatura hasta su set-point. Lo mismo se traduce para controlar las otras variables (Agitación y OD); mientras que para la variable pH no se activó el modo P-I-D debido a que esta variable no se controló sino que, únicamente se monitoreó permitiendo, en este caso, su variación por la generación de ácidos orgánicos en el vessel de fermentación.

Similar procedimiento se ejecutó para la segunda corrida usando la misma muestra, pero a la temperatura de 30°C donde, únicamente se cambió en la pantalla el set-point de la temperatura a este nuevo valor, por lo que, ahora, el equipo respondió controlando todo el proceso de fermentación a una temperatura constante e igual a 30°C (todas las otras variables se mantuvieron exactamente a iguales valores que a 20°C). Las muestras de LSDS se sometieron al mismo tratamiento para estudiar el efecto de la temperatura sobre este tipo de medio.

El equipo así configurado trabajó en modo de operación BATCH (por lotes) inoculando 20 ml. del inóculo conseguido en el Seed Reactor (SR) utilizando jeringa hipodérmica estéril y usando el puerto de inoculación del HeadPlate. La masa fungal inoculada (Mo) en relación al volumen utilizado (20 ml.) se

mantuvo constante y se recalculó la concentración fungal (X_o , g./l.) cuando se diluyó en el contenido del vessel del bioreactor utilizando la siguiente relación:

$$X_o = M_o/1,270 \quad (4)$$

donde:

X_o : Concentración fungal del inóculo (inicial) ; g./l.

M_o : Masa fungal del inóculo (inicial) ; g.

1,270 : Volumen total de trabajo en el vessel de bioreactor, l. (1 250 + 20 ml.)

La fermentación fungal se permitió por un tiempo de 8 días (192 h.) en los cuales se monitoreó, en primer lugar, el crecimiento y aumento de masa fungal (M , g) y su concentración relacionada con el volumen que lo contiene (X , g./l.) calculada de acuerdo a la ecuación 4.

3.3.10 Cinética de bioreacción fungal y parametrización cinética fungal.

El período de fermentación fungal fue de 192 h., tiempo en el cual se determinó la cinética de crecimiento de biomasa del *A. niger* y su parametrización característica asociada al medio lactosuero suplementado utilizado y a las condiciones de operación establecidas de acuerdo a la modelación peletizada descrita en la literatura (2) y ajustada a la siguiente ecuación:

$$M^{1/3} = M_o^{1/3} + 1/3 \ Y \ t \quad (5)$$

donde:

M : masa fungal a un tiempo t ; g.

M_o : Masa fungal a $t=0$; g.

Y : Constante cinética de crecimiento fungal, característico para la cepa utilizada; g.^{1/3} s⁻¹

t : Tiempo de fermentación; s.

El tiempo inicial ($t=0$) resultó ser el momento exacto de inoculación y a partir de ese instante se obtuvo muestras de 10 ml. usando el puerto de toma de muestra del HeadPlate del NBS Bioflo 3000 cada hora durante las primeras doce horas y, luego, cada seis horas durante las restante 180 horas para ejecutar un barrido representativo durante todo el período fungal.

La muestra así obtenida se centrifugó a 5 000 rpm por cinco minutos y se decantó el sobrenadante reservándolo para determinar lactosa y ácidos orgánicos. El sólido obtenido se llevó a estufa a 60°C para desecarlo hasta obtener peso constante y se pesó con una precisión de 0,1 mg. determinando la biomasa fungal asociada a cada temperatura y muestra de lactosuero utilizado.

El mecanismo de crecimiento del *A. niger* utilizado es característico de los hongos filamentosos en los que su crecimiento se efectúa por aumento de su masa fungal mas no de su población y, es por esta razón, que se evaluó y determinó directamente su masa en cada instante de tiempo de fermentación en el equipo utilizado.

La concentración fungal (X) se determinó dividiendo la masa fungal así obtenida sobre el volumen de muestra utilizada (10 ml.). Finalmente, se corrigió los datos experimentales para determinar la producción fúngica asociada al volumen total del bioreactor NBS Bioflo 3000 utilizado para cada tiempo analizado.

3.3.11 Biosíntesis de ácidos orgánicos expresados como ácido cítrico en bioreactor de producción batch.

El sobrenadante obtenido de las muestras de caldo de fermentación del método anterior se sometió a análisis para su determinación en contenidos de lactosa, nutriente carbonado proporcionado por el lactosuero (S, g./l.) por el método de Fehling (22) descrito en el Anexo C de este documento; y, de ácidos orgánicos expresados como ácido cítrico (Cp, g./l.) de acuerdo al método de titulación potenciométrica descrito en la AOAC (2005) que consistió en colocar 1 ml. de sobrenadante completamente limpio de sólidos en un beaker

de 50 ml. y se le añadió 9 ml. de agua destilada deionizada en agitador magnético a temperatura ambiente al cual se le colocó sensor de pH de potenciómetro, monitoreando determinando su valor y se añadió gota a gota solución de NaOH 0,01N ($fc=0,9981$) hasta obtener rangos alcalinos y, utilizando su curva potenciométrica se determinó el volumen de neutralización con el que se calculó la concentración de ácido en la muestra de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$C_p \text{ (g. Ac.Cítrico/l.)} = 6,4043 \cdot 10^4 \text{ } fc \cdot N \cdot V \quad (6)$$

donde:

C_p : concentración de ácidos orgánicos expresado como ácido cítrico; g./ l.

N : normalidad de la solución titulante de NaOH; eq-g./l.

V : volumen de la solución titulante utilizada; l.

fc : factor de corrección de la solución titulante

Todos los ensayos se ejecutaron por triplicado para validez y significación estadística.

3.3.12 Análisis estadístico. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza de clasificación simple y una comparación de medias por Duncan, ($n = 3$, $p < 0,5$) utilizando el paquete estadístico SPSS v.21 en entorno Windows 7.

Capítulo IV: Resultados y Discusión

Tratamiento Fúngico

4.1 Activación por re-siembra

Terminado el tiempo de incubación (30 °C por 7 días), período en el cual germinaron las esporas, se confirmó que se obtuvo *Aspergillus niger* por su morfología filamentosa (mostró cadenas de células a manera de hifas) muy diferente a la de levaduras que deben mostrar una sola célula redonda (figura 11).

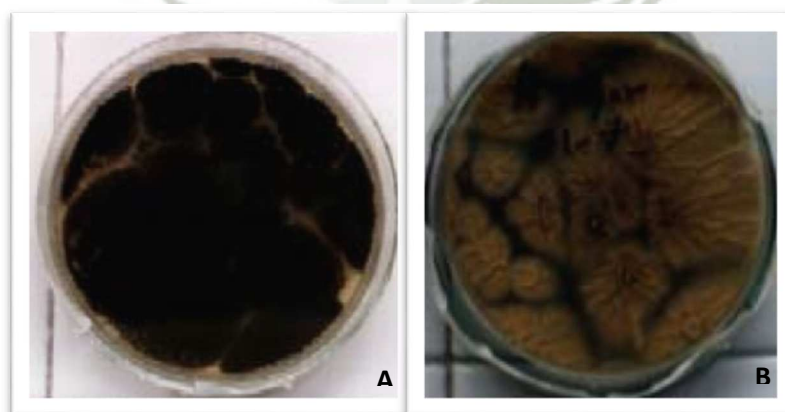


Figura. 11. Cepa fúngal activa de *Aspergillus niger* sp. obtenida en placa agar Sabouraud a 30°C. (A) vista frontal superior mostrando hifas de color negro parduzco característico de la especie; (B) vista frontal inferior mostrando las conidioesporas asexuales.

La obtención de la cepa fungal demostró que la temperatura de incubación y el medio de propagación resultaron adecuados para su establecimiento y colonización masiva.

4.2 Mantenimiento y adaptación de la cepa fungal de *A. Níger*

Luego de cinco días de incubación en baño termostático a 30°C con agitación constante a 150 rpm se obtuvo en los tres matraces la colonización completa que completó su adaptación y crecimiento a este nuevo tipo de medio “natural” lo que permitió especular que el mecanismo de crecimiento de la cepa de *A. niger* utilizada genera una ruta bioquímica de generación de invertasas para desdoblar y usar la sacarosa del medio y enzimas amilolíticas para poder descomponer el polímero C-H de almidón y romper su estructura en moléculas simples como las de glucosa para poder asimilar sus requerimientos de carbono y sustentar crecimiento vigoroso lo cual se evidenció por la casi completa desaparición de almidón cuando se agregó una gota de lugol a una alícuota de 1 ml. de medio libre de materia fungal y no presentó coloración azul intensa lo cual es característico de ausencia de almidón. La uniformidad de crecimiento fungal superficial resultó ser característico del comportamiento de la cepa utilizada en particular y generó confianza suficiente para su posterior aplicación en medios de producción que involucren lactosuero.

4.3 Preservación y almacenamiento crioprotector de la cepa

Al no disponer las células de agua en forma líquida, no fue posible el crecimiento fungal. Este resultó ser el mejor método de conservación desde todos los puntos de vista, pero tiene el inconveniente de requerir congelador permanente y, además, existe el peligro de que algún fallo del sistema de congelación produzca una subida no deseada de la temperatura durante el almacenamiento.

4.4 Obtención de inóculo fungal de producción

Los resultados en el SR mostraron una cepa fungal pura, microbiológicamente activa y sostenible en lactosuero (fuente de lactosa) y otros componentes

naturales como almidón (papa), sacarosa y licor de maíz que sirvió como inóculo para el medio de producción en el bioreactor BIOFLO 3000.

El contenido fungal generado en el SR fue observado y obtenido en forma superficial en el balón utilizado y mostró características netamente aerobias ya que la colonización mostró tendencia a respiración de oxígeno. Esta observación fue asegurada por la ausencia total de cepa fungal sumergida en el SR lo cual demostró que el *A. niger* adaptado a lactosuero y con función de inóculo resultó ser exigente y demandante de oxígeno.

El resultado de la operación de centrifugación a 5000 rpm por 5 minutos consiguió un sedimento fungal libre de medio agotado líquido que fue lavado dos veces con agua destilada estéril y, una final, con suero fisiológico para obtener por resuspensión, centrifugación y decantación el material fungal puro cuyo peso resultó ser $M_o = 0,0063 \pm 0,0008$ g. ($n=3$; $p<0,05$) lo cual permitió determinar que la concentración fungal fue de $X_o = 0,0006 \pm 0,0001$ g./ml. que se etiquetaron como el inóculo que sirvió para alimentar el medio de producción de lactosuero en NBS BIOFLO 3000 para sustentar fermentación fungal controlada.

Tratamiento del Lactosuero

4.5 Obtención y conservación de suero lácteo (lactosuero)

La figura 12 presenta volúmenes confinados en frascos gerber de 100 ml. de las muestras 1 y 2 obtenidas de lactosuero representativas de las muestras originales de 2,5 litros; cada una fue tomada en diferentes horarios de producción y resultaron, por análisis organoléptico, muy similares en su aspecto y textura, lo cual, demostró, en forma preliminar que el lactosuero obtenido proviene de la misma población y pueden, ambas muestras, ser catalogadas como de la misma procedencia.

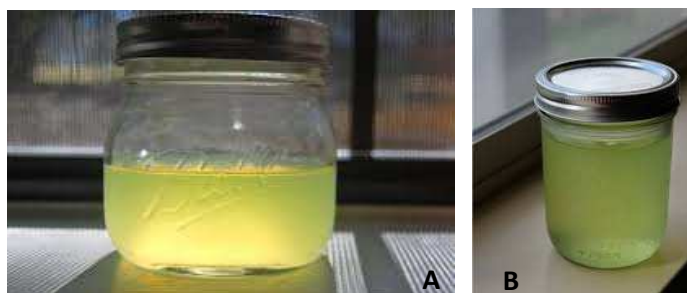


Figura. 12. Muestras de lactosuero ácido obtenidas de la línea de producción de queso parmesano (Laive S.A.). (A) Muestra 1; obtenida del turno 2 de trabajo (13:00 -21:00 h.) ; (B) Muestra 2; obtenida del turno 1 (5:00 -13:00 h.). Los horarios descritos resultaron ser importantes ya que son los que se trabajan en la empresa Laive S.A. y, organolépticamente no presentaron diferencias significativas.

4.6 Caracterización físico-química de suero lácteo

Las muestras de lactosuero así obtenidas se caracterizaron físico-químicamente determinando las propiedades físicas y químicas mostradas en la tabla 16.

Tabla 16. Propiedades físico-químicas de muestras de lactosuero dulce de origen de línea de producción de queso parmesano de Laive S.A.¹

Propiedad	Lactosuero		Referencia
	Muestra 1	Muestra 2	
Densidad ² , g./ml.	1,013	1,011	Lactosuero dulce: 1,010 – 1,024 g./ml. (Callejas y col. 2011)
pH ³	6,30	6,15	Lacto suero dulce : 6,45 (Rodríguez W. J. y col. , 2012)
Acidez total titulable ⁵ , %AL	0,11	0,16	Lacto suero dulce: 0,08-0,18 % (Callejas y col., 2011)
Salinidad ³ , ppm	1,43	1,49	Sin referencia
Sólidos totales disueltos ³ , ppm	1 373	1 502	Lacto suero dulce : 1 300 -1 800 ppm (Bon Rosas F. ,2009)
Conductividad ³ , µS/cm	2 761	2 644	Sin referencia
Oxígeno Disuelto ³ , ppm	3,11	2,98	Sin referencia
Lactosa ⁴ , %	11,64	11,82	Lacto suero dulce: 5-13 % Callejas y col. (2011)

¹ Props. físicas: densidad, salinidad, TDS, EC, OD; Props. químicas: pH, ATT, Lactosa; ² Método gravimétrico usando picnometría; ³ Multiparámetro Hannah HI 6128; ⁴ Método Fehling , AOAC (2000);⁵ Titulación con NaOH 0,1N

Como se observa en la tabla 16, todos los parámetros físico-químicos descritos recaen entre los límites reportados en la literatura por lo que determinó que las muestras utilizadas son representativas y normales de lactosuero dulce (determinado así por su valor de pH y su baja ATT).

El valor promedio de la densidad resultó ser 1,012 g. /ml. y del contenido de lactosa fue de 11,73 %, valores con los cuales se determinó una concentración promedio de este disacárido de 118,7 g. de lactosa por litro de lactosuero, el cual resultó ser un parámetro importante debido a que el único componente carbonado significativo en el lactosuero es la lactosa y con el que *A. niger* utilizó como sustrato y nutriente carbonado.

4.7 Pre-tratamiento de las muestras de lactosuero

Luego de llevar la muestra a centrifugación fue posible eliminar los coágulos generados obtener la muestra de lactosuero deproteinizada (LSD).). El peso húmedo del sedimento obtenido resultó ser 17,7145 g. contrastado con su peso seco de 10,6263 g. (40,02 % humedad) que determinó un contenido de proteína bruta de 0,42 % que se encuentra dentro de los límites reportados por Callejas y col. (2011) para este tipo de sueros lácteos (0,40 – 1,2%).

4.8 Fermentación Fungal en el reactor continuo perfectamente agitado – NBS Bioflo 3000

En la tabla 17 se muestra la composición en lactosa de cada una de las muestras utilizadas en la fermentación fungal en NBS BIOFLO 3000 calculadas por simple balance de masa asumiendo que la densidad del lactosuero entero y deproteinizado se mantiene constante e igual a 1,012 g./ml..

Los resultados presentados en la tabla 17 demuestran que el contenido de lactosa (como concentración) en las muestras deproteinizadas resultan ser mayores debido a que se concentran por la pérdida de volumen que sufren al coagular y sedimentar su contenido proteico por lo que en la fermentación fungal las muestras deproteinizadas inician con un mayor contenido de lactosa que las muestras enteras, aprox. en 0,9 g. adicionales por litro de muestra (0,75 % mayor) lo cual, estadísticamente, no resultó ser significativo para evaluar su efecto en la fermentación fungal.

Tabla 17. Composición en lactosa (g./l.) de las muestras de lactosuero originales y suplementadas con medio CA.

Muestra original	Lactosa, g/l	Muestra suplementada	Lactosa ¹ , g/l.
LSE	131,9	LSSES	117,9 (118,7)
LSD	132,8	LSDS	118,1 (119,6)

¹ Obtenidos por balance de masa; los resultados entre paréntesis muestran el valor experimental obtenido aplicando el método de Fehling (22).

La figura 13 presenta la configuración experimental del bioreactor NBS BIOFLO 3000 completamente armado mostrando sus dispositivos externos, el vessel de vidrio borosilicato, el HeadPlate de acero inoxidable, el motor de agitación y la chaqueta de calentamiento para mantener el equipo en estado isotérmico.

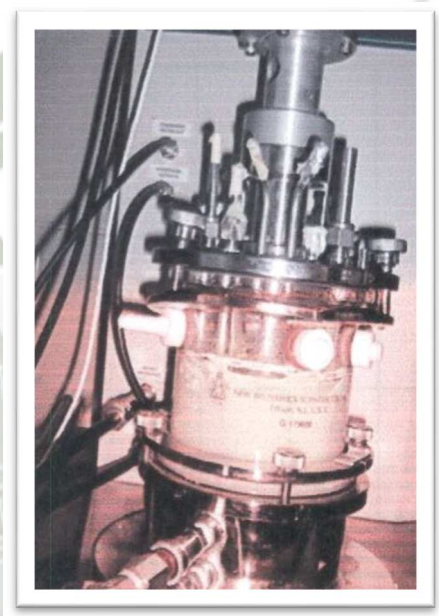


Figura. 13. Bioreactor de 1,5 l. (volumen de trabajo 1,25 l.) mostrando el vessel de vidrio borosilicato con la muestra de LSDS y el HeadPlate de acero inoxidable con los puertos utilizados. Nótese en el fondo de la figura la chaqueta de calentamiento y en la parte superior el motor de agitación y el cierre hermético para evitar contaminación.

La figura. 14 muestra la pantalla de control del panel del NBS BIOFLO 3000 indicando las principales variables en su disposición.

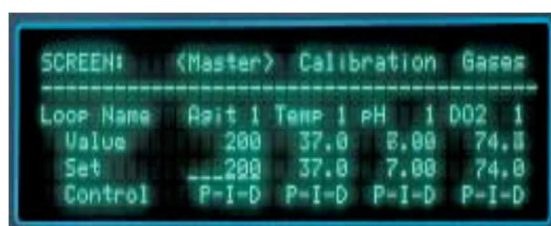


Figura. 14. Pantalla del BioFlo 3000 que indica los set-points y las variables de proceso simultáneamente. La pantalla es alfa-numérica, monocromática y permite fácil acceso para el control de, hasta, 13 variables e incluye calibración de sensores, crecimiento celular y manipulación por el usuario.

Utilizando el inóculo conseguido en el SR y conociendo el volumen de trabajo del bioreactor o de medio de fermentación (1 250 ml.) y el volumen de inóculo añadido (20 ml.) se determinó que la masa inicial (M_0 , g.) inicial en el período de fermentación fungal resultó ser $0,0126 \pm 0,0016$ g. ($n=3$; $p<0,05$) dentro del vessel del bioreactor lo cual permitió determinar que la concentración fungal resultó ser $X_0 = 0,0001$ g./l. para todos los ensayos analizados para evaluar el efecto de la temperatura y del medio lactosado en la fermentación fungal de *A. niger* en la búsqueda de producción de ácido cítrico como metabolito extracelular.

La figura 15 muestra la configuración experimental montada utilizando el NBS BIOFLO 3000 con medio lactosado y utilizando la cepa fungal de *A. niger* mostrando la conexión de todos sus dispositivos de control, incluyendo la consola automática, completamente mezclado y aerado y en pleno funcionamiento de acuerdo con lo recomendado por el fabricante (New Brunswick Co. NJ-USA).

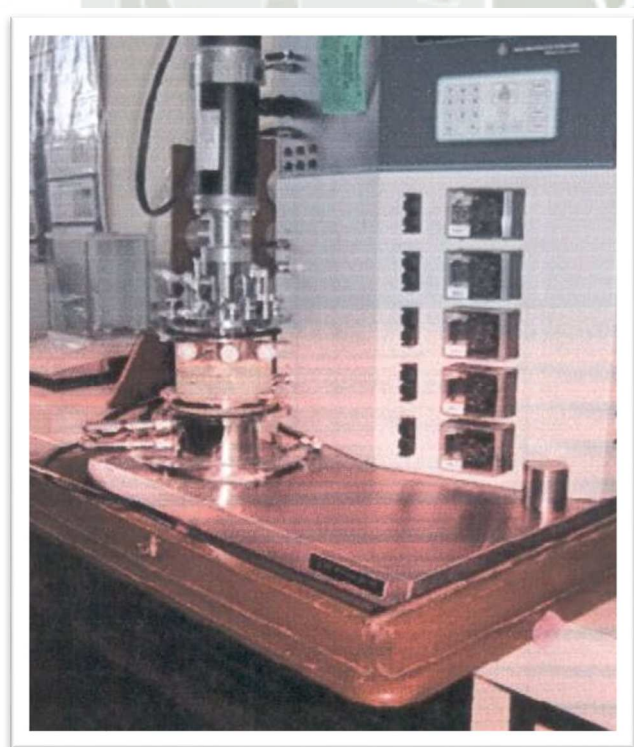


Figura. 15. Montaje experimental utilizado para evaluar el efecto de la temperatura y de medio lactosado (LSES y LSDS) en la bioproducción de ácidos orgánicos expresados como ácido cítrico utilizando la cepa fungal de *A. niger*. Nótese el ensamble correcto del motor de agitación, el HeadPlate anexo herméticamente, la chaqueta de calentamiento/enfriamiento y la pantalla monocromática de la consola de control automático.

4.9 Cinética de bioreacción fungal y parametrización cinética fungal

La figura 16 presenta los perfiles de variación positiva (incremento) de la masa fungal de *A. niger* a dos diferentes temperaturas cuando el medio lactosado utilizado fue LSES.

El crecimiento es sostenido y la masa, en ambos casos, aumenta de manera no-lineal como lo describe la literatura (17,21) y su exploración demuestra un comportamiento potencial (crecimiento peletizado) normal para este tipo de cepas microbianas. El efecto de la temperatura es evidente, se observa mayor masa fungal conseguida a mayor temperatura (30°C) que la conseguida a menor temperatura (20°C) en todo el período analizado. A las 192 h. (tiempo final permitido de crecimiento) el aumento en masa fungal superó en 79,80% cuando se utilizó una temperatura de 30°C sobre la conseguida a 20°C, con lo que, evidentemente, la temperatura ejerció un efecto potencialmente significativo sobre el crecimiento fungal de *A. niger* cuando se usó Lactosuero entero suplementado (LSES) como fuente natural de sustrato carbonado (lactosa). Se puede, entonces, afirmar que la lactosa contenida en el medio de fermentación utilizado resultó ser eficiente como fuente carbonada y fue asimilada óptimamente por la cepa fungal. El mecanismo de absorción resultó ser complejo y de acción enzimática para lograr reducir el tamaño molecular del disacárido a moléculas o unidades más pequeñas para que pudieran ser consumidas tal y como lo describen en la literatura diferentes autores (17,21,22). Finalmente, después de los 8 días de cultivo del hongo *A. niger* se pudo apreciar la profusa formación de *pellets* con un diámetro promedio de 5 mm. La forma esférica visualizada en microscopio a 400X y adquirida por el hongo obtenido se debió, principalmente, a la prolongada agitación a la que fue sometido durante la fermentación en ambiente confinada.

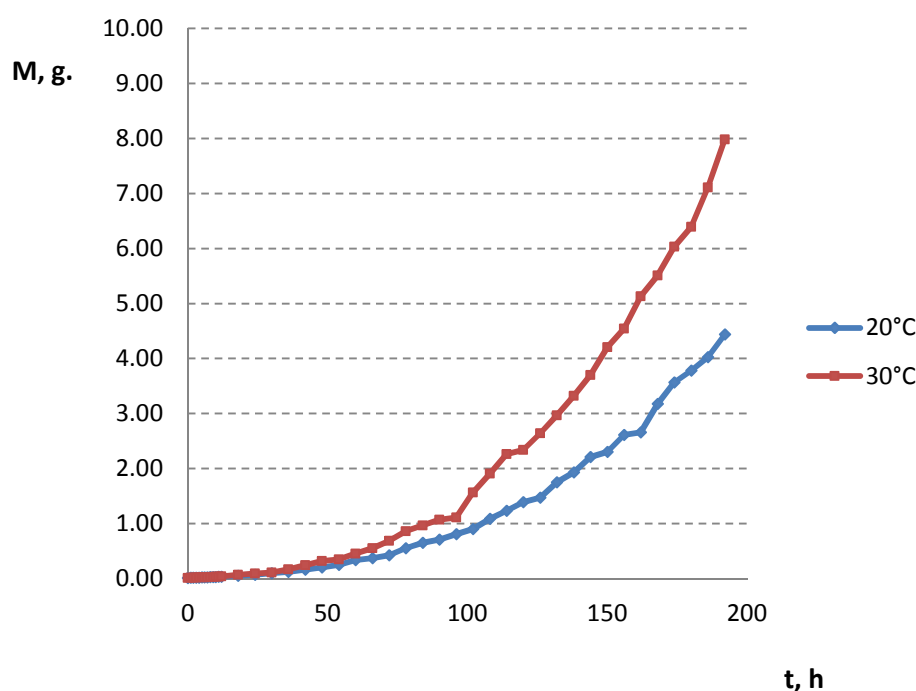


Figura. 16. Variación de la masa fungal (M) de *A. niger* con respecto al tiempo de fermentación (192 h.) mostrando el efecto de la temperatura (20 y 30°C) cuando se utilizó LSES en NBS-BIOFLO 3000 en modo de operación batch (tabla 21 del Anexo D).

Sobre este período de fermentación fungal de 192 h. se determinó la cinética de crecimiento de biomasa del *A. niger* y su parametrización característica asociada al medio lactosuero entero suplementado utilizado y en las condiciones de operación establecidas de acuerdo a la modelación peletizada descrita por la ecuación (5) :

$$T=20^{\circ}\text{C} : M^{1/3} = 0,2321 + 7,3000 \cdot 10^{-3} t \quad ; y$$

para

$$T=30^{\circ}\text{C} : M^{1/3} = 0,2314 + 9,2000 \cdot 10^{-3} t$$

Que representan adecuadamente el comportamiento experimental mostrado en la figura 24 y con las cuales se pudo determinar la masa fungal obtenida a $t=192$ h. (4,3603 g. para 20°C y 7,9736 g. para 30°C) que determinó el efecto real de la temperatura en el aumento de masa fungal analizado.

La figura 17 presenta la linealización de las ecuaciones que describen el comportamiento de la variación de masa fungal con el objetivo de determinar el parámetro cinético de crecimiento peletizado para *A. níger* en medio LSES a 20 y 30°C utilizando los datos experimentales obtenidos durante su evaluación; adicionalmente, la tabla 18 presenta los valores obtenidos del parámetro γ para caracterizar el comportamiento cinético del *A. níger* en medio LSES a 20 y 30°C mostrando una variación esperada direccionada en sentido de aumento de temperatura.

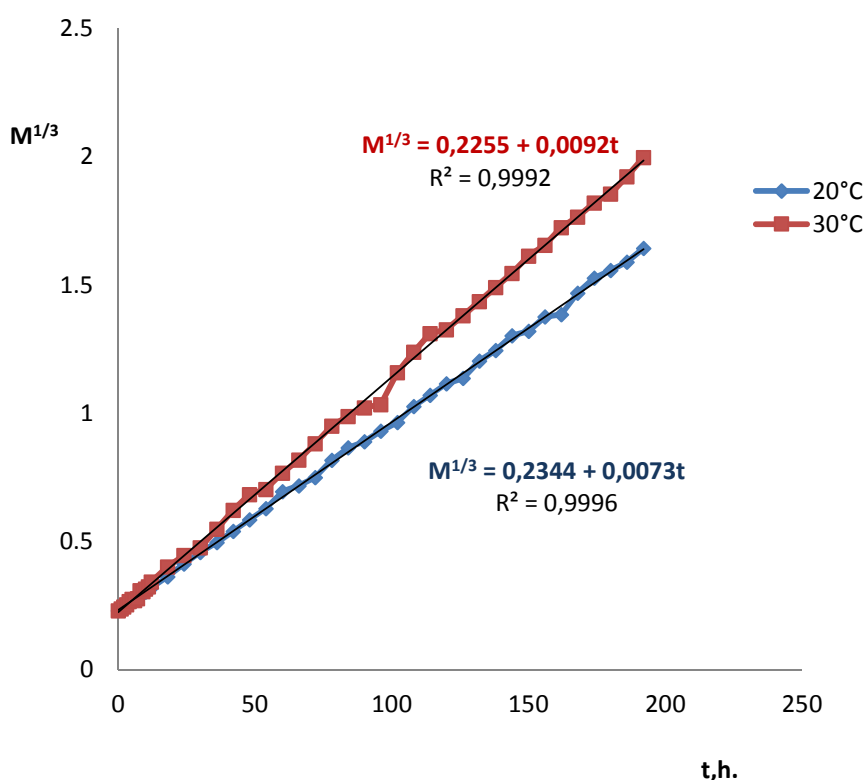


Figura. 17. Linealización del modelo de crecimiento peletizado para ambas temperaturas bajo análisis usando LSES como fuente de medio carbonado (tabla 21 del Anexo D). Las ecuaciones ajustadas proporcionan la parametrización cinética del *A. níger* (γ).

La linealización ($M^{1/3}$ vs. t) mostrada en la figura adjunta permitió determinar por regresión lineal la pendiente de las rectas obtenidas de donde se determinó el valor del parámetro γ a ambas temperaturas dividiendo ésta última entre 3 como lo determina su análisis de la ecuación 5 utilizada.

Tabla 18. Parámetros cinéticos de crecimiento peletizado (Υ^1) para *A. níger* en medio LSES a diferentes temperaturas.

Temperatura, °C	Υ , g. ^{1/3} .s ⁻¹	I.C. ²
20	0,0219	± 0,0011
30	0,0276	± 0,0008

¹ Obtenidos por regresión lineal de los datos experimentales de crecimiento fungal ajustados al modelo peletizado descrito en el capítulo III; ² Intervalos de confianza obtenidos con la distribución t-Student (n=3, v=2; p<0,05)

Los valores presentados en la tabla 18 permiten concluir que Υ aumenta a mayor temperatura por lo que la velocidad de crecimiento y aumento de masa fungal es mayor a 30°C potencializando su cinética con este factor; es decir, si se desea obtener mayor masa fungal en menor tiempo se debe utilizar mayor temperatura.

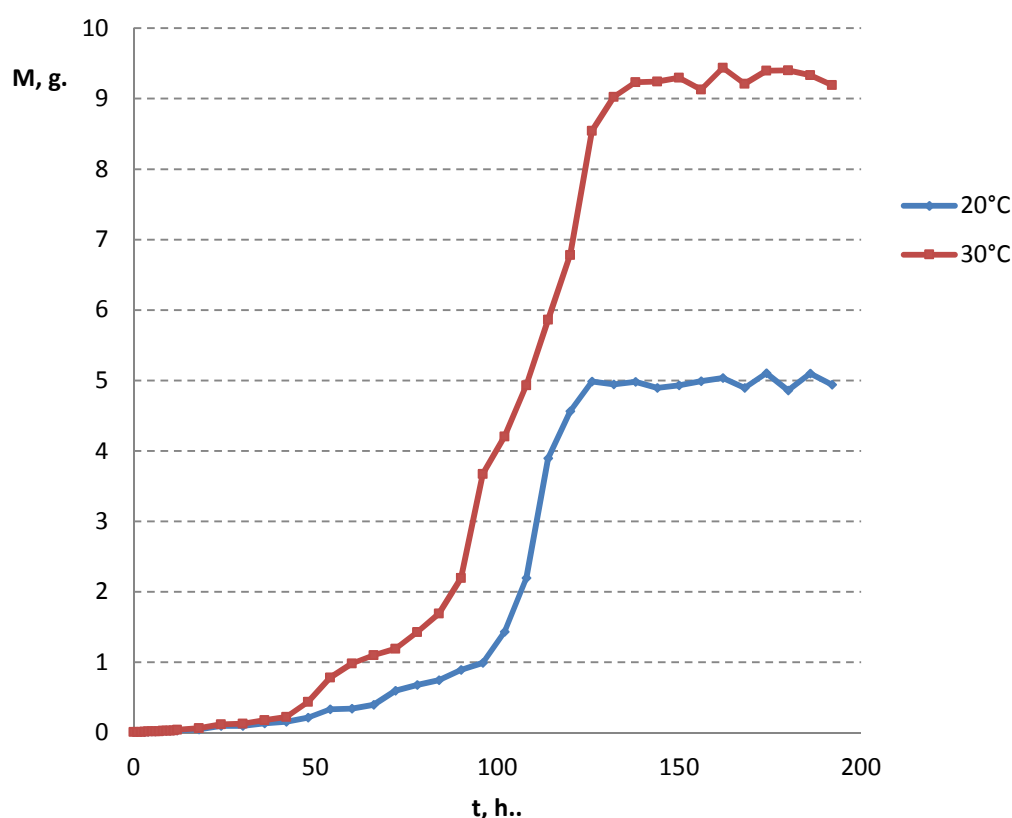


Figura. 18. Variación de la masa fungal (M) de *A. níger* con respecto al tiempo de fermentación (192 h.) mostrando el efecto de la temperatura (20 y 30°C) cuando se utilizó LSDS en NBS-BIOFLO 3000 en modo de operación batch (tabla 22 del Anexo D).

Para el caso del medio lactosuero deproteinizado suplementado (LSDS), la figura 18 presenta el perfil de variación de la masa fungal de *A. níger* con respecto al tiempo de fermentación la cual indica, a diferencia del uso de LSES analizado anteriormente, la aparición de un estado en el que la cepa entró en fase aparente estacionaria a partir de las 120 h. de cultivo a 20°C y de 135 h. a 30°C.

El análisis de la figura anterior permite determinar únicamente entre los tiempos de crecimiento la aplicación de la ecuación 5 de crecimiento peletizado. Los resultados experimentales permitieron ajustar las siguientes ecuaciones para este tipo de medio de cultivo (LSDS):

para

$$\begin{aligned} T=20^{\circ}\text{C} : \quad M^{1/3} &= 0,2314 + 1,0300 \cdot 10^{-2} t \quad ; y \\ T=30^{\circ}\text{C} : \quad M^{1/3} &= 0,2327 + 1,3900 \cdot 10^{-2} t \end{aligned}$$

Que representan adecuadamente el comportamiento experimental mostrado en la figura 26 y con las cuales se pudo determinar la masa fungal obtenida a cualquier tiempo por debajo del inicio de la fase estacionaria de la cepa fungal ya que a $t=192$ h. las ecuaciones anteriormente descritas no funcionarían o arrojarían resultados fiables ; sin embargo, experimentalmente se determinó que al final del periodo monitoreado se obtuvo 4,9401 g. para 20°C y 9,1943 g. para 30°C, valores que determinaron el efecto real de la temperatura en el aumento de masa fungal analizado utilizando LSDS. El ANOVA de significación determinó, al 95 % de confianza ($\alpha=0,05$) que las masas fungales obtenidas a las 192 h. de período fermentativo resultaron significativamente diferentes entre mismos medios de cultivo a diferentes temperaturas y entre diferentes medios de cultivo con lo que se puede aseverar que la masa fungal es afectada por la temperatura en incremento proporcional (se consigue mayor biomasa a mayor temperatura de trabajo) y que el medio LSDS es capaz de conseguir mejor crecimiento fungal que el medio LSES.

La figura 19 presenta la linealización de las ecuaciones que describen el comportamiento de la variación de masa fungal con el objetivo de determinar el

parámetro cinético de crecimiento peletizado para *A. niger* en medio LSDS a 20 y 30°C utilizando los datos experimentales obtenidos durante su evaluación; adicionalmente, la tabla 19 presenta los valores obtenidos del parámetro Υ para caracterizar el comportamiento cinético del *A. niger* en medio LSDS a 20 y 30°C mostrando una variación esperada direccionada en sentido de aumento de temperatura mostrando igual o similar tendencia que al usar medio LSES.

Tabla 19. Parámetros cinéticos de crecimiento peletizado (Υ^{-1}) para *A. niger* en medio LSDS a diferentes temperaturas.

Temperatura, °C	Υ , g. ^{1/3} .s ⁻¹	I.C. ²
20	0,0309	± 0,0042
30	0,0417	± 0,0021

¹ Obtenidos por regresión lineal de los datos experimentales de crecimiento fungal ajustados al modelo peletizado descrito en el capítulo III; ² Intervalos de confianza obtenidos con la distribución t-Student (n=3, v=2; p<0,05)

La linealización ($M^{1/3}$ vs. t) mostrada en la figura adjunta permitió determinar por regresión lineal la pendiente de las rectas obtenidas de donde se determinó el valor del parámetro Υ a ambas temperaturas dividiendo ésta última entre 3 como lo determina su análisis de la ecuación 5 utilizada, observándose que el grado de ajuste es menor que sus correspondientes valores al usar medio LSES por lo que se puede concluir que el grado de variabilidad e incertidumbre es mayor en el caso del uso del medio LSDS, presumiblemente, debido al pre-tratamiento de termocoagulación que sufrió y que podrían haber cambiado la composición del lactosuero por efectos de la alta temperatura a la que fue sometido ya que algunos componentes constitutivos o bioactivos (ácidos grasos, vitaminas, etc.) son termolábiles y pudieran haber afectado su composición natural y que mostró efecto en la fermentación fungal al que fue sometido.

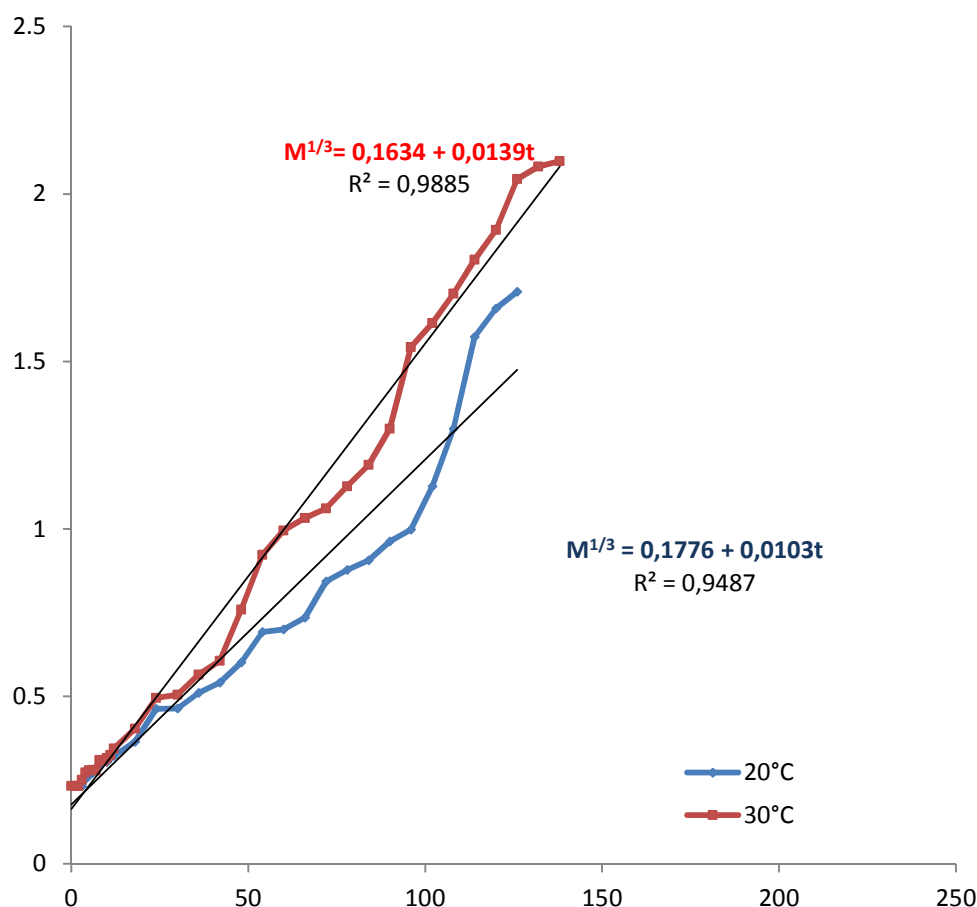


Figura. 19. Linealización del modelo de crecimiento peletizado para ambas temperaturas bajo análisis usando LSDS como fuente de medio carbonado (tabla 22 del Anexo D). Las ecuaciones ajustadas proporcionan la parametrización cinética del *A. niger* (Y).

Los valores presentados en la tabla 19 permiten concluir que Y aumenta a mayor temperatura por lo que la velocidad de crecimiento y aumento de masa fungal es mayor a 30°C potencializando su cinética con este factor; al igual que con el uso de LSES, por lo que si se desea obtener mayor masa fungal en menor tiempo se debe utilizar mayor temperatura. Los valores mostrados de Y en la tabla 19 son, significativamente mayores para ambas temperaturas que los presentados en la tabla 18 al igual que sus intervalos de confianza en los que se observa mayor rango al usar LSDS por las razones anteriormente mencionadas, lo cual demuestra que la cinética de crecimiento fungal del *A. niger* evaluada por sus parámetros cinéticos Y es mayor cuando se utiliza LSDS sobre el uso de LSES y que ,

definitivamente, la temperatura ejerce, para ambos medios analizados, efecto proporcional positivo; es decir, que se obtiene mayor rapidez de crecimiento fungal usando medio lactosado LSDS y a 30 °C lo cual concuerda con los resultados reportados por la mayor parte de los autores revisados en la literatura (7,11,17).

4.10 Biosíntesis de ácidos orgánicos expresados como ácido cítrico en bioreactor de producción batch

La biotransformación del nutriente carbonado (lactosa, principalmente) proveniente de los medios de cultivo ensayados (LSES y LSDS) se determinó por su consumo o desaparición por medio del mecanismo biocatalítico ejercido por la ruta metabólica activa de la cepa fungal de *A. niger* que efectúa conversión enzimática de la lactosa (disacárido) en sus unidades más pequeñas (glucosa y galactosa) que resultan ser mayormente más digeribles y asimilables por el microorganismo tal y como lo reporta Sánchez Toro y col. (2004) , quienes describen el mecanismo biocatalítico activo multienzimático generado por el metabolismo fungal del *A. niger* ensayado para romper y craquear moléculas poliméricas y/o de alto peso molecular en unidades más pequeñas asimilables que permiten ejecutar mayor cinética de producción de metabolitos primarios y secundarios en medio sumergido.

La figura 20 presenta los perfiles de variación de concentración de lactosa, como nutriente carbonado cuando se usó LSES como medio de cultivo a 20 y 30°C.

Como se observa en la figura abajo, la concentración de lactosa como sustrato limitante disminuyó lentamente hasta las primeras 12 horas a ambas temperaturas, pero luego disminuyó ostensiblemente hasta el séptimo día (alrededor de las 170 horas). A 30°C la velocidad de consumo resultó mayor que a 20°C lo cual resultó lógico debido a que la masa de la cepa fungal resultó mayor para todos los períodos evaluados; es decir, que a mayor masa microbiana el contenido de nutriente resultó menor; sin embargo, al final de la fermentación no se alcanzó a consumir todos los azúcares reductores disponibles en el medio expresados como lactosa quedando mayor cantidad de lactosa en el medio LSES a menor

temperatura, lo que demostró que la conversión de lactosa por acción fungal fue mayor a mayor temperatura pero no pudo, en ninguno de los casos, llegar a consumo total (conversión 100%), lo que indicó que es necesario aumentar la conversión del sustrato estudiando el efecto de otras variables además de la temperatura.

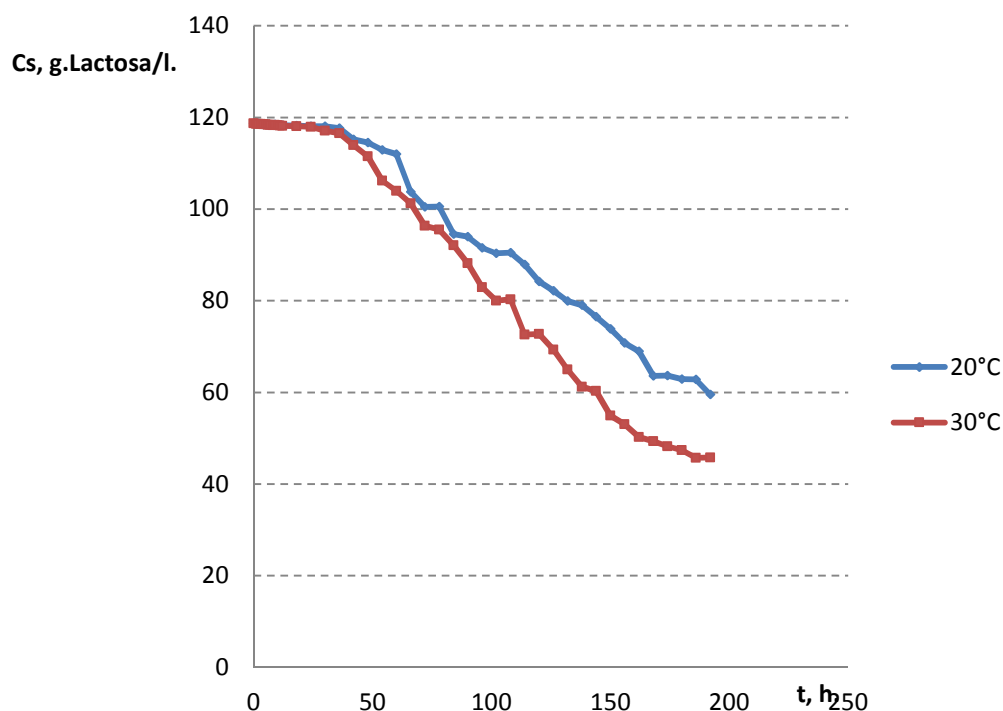


Figura. 20. Variación de la concentración de lactosa (C_s) con respecto al tiempo de fermentación (192 h.) mostrando el efecto de la temperatura (20 y 30°C) cuando se utilizó LSES en NBS-BIOFLO 3000 en modo de operación batch (tabla 21 del Anexo D).

El porcentaje de utilización de la lactosa como sustrato resultó de 59,56 % a 20°C y de 45,78% a 30°C, lo que demostró que es posible aumentar esta conversión moviendo otros factores o, permitiendo un mayor período de fermentación lo cual se evidenció para el *A. niger* evaluado en este medio debido a que finalizados los 8 días de monitoreo la cepa fungal no presenta estado estacionario que no podría ser descrito por las ecuaciones de crecimiento analizadas en el sistema batch conformado.

De otro lado, la figura 21 muestra los perfiles de variación de la concentración de lactosa (C_s , g./l.) en función del tiempo de fermentación para el caso del medio de cultivo LSDS donde se observa que a menor temperatura el consumo es más lento y que al cabo de las 192 h. de fermentación la conversión de lactosa es mucho mayor a 30°C.

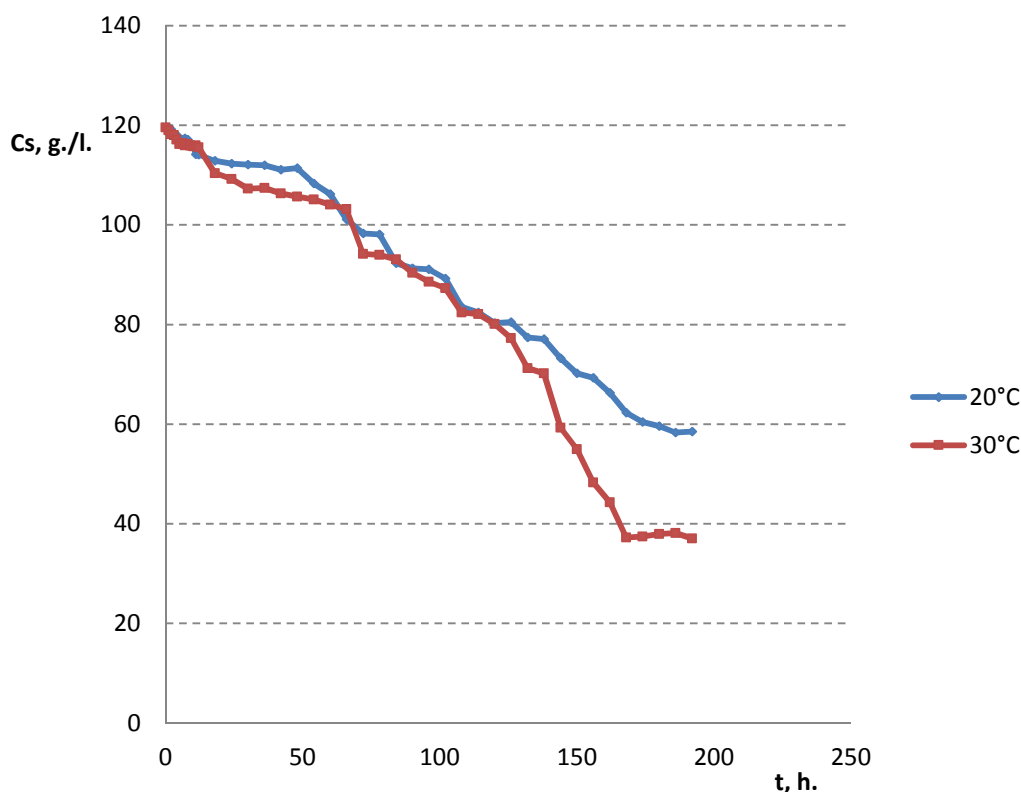


Figura. 21. Variación de la concentración de lactosa (C_s) con respecto al tiempo de fermentación (192 h.) mostrando el efecto de la temperatura (20 y 30°C) cuando se utilizó LSDS en NBS-BIOFLO 3000 en modo de operación batch (tabla 22 del Anexo D).

Como se observa en la figura 21, la concentración de lactosa como sustrato limitante disminuyó lentamente hasta las primeras 8 horas a ambas temperaturas a diferencia del medio LSES que fue de 12 h, pero luego disminuyó ostensiblemente hasta el último día (192 horas) para la operación a 20°C y hasta el séptimo día (172 h) para el caso a 30°C determinándose que a 30°C la velocidad de consumo resultó mayor que a 20°C, como en el caso anterior, lo

cual resultó lógico debido a que la masa de la cepa fungal resultó mayor para todos los períodos evaluados; es decir, que a mayor masa microbiana el contenido de nutriente resultó menor; sin embargo, al final de la fermentación con este medio LSDS no se alcanzó a consumir todos los azúcares reductores disponibles en el medio expresados como lactosa quedando mayor cantidad de lactosa en el medio LSDS a menor temperatura como en el caso del LSES pero que se demostró que la conversión de lactosa por acción fungal fue mayor a mayor temperatura pero no pudo, en ninguno de los casos, llegar a consumo total (conversión 100%). El porcentaje de utilización de la lactosa como sustrato resultó mayor en ambas temperaturas que en el caso del medio LSES (51,10 % a 20°C y de 69,06 % a 30°C), lo que demostró que es posible aumentar esta conversión cambiando los medios de cultivo, modificándolos y/o suplementando como fue este caso. El análisis del crecimiento fungal indicó que presentó estado estacionario a partir de las 130 h., aproximadamente para ambas temperaturas porque se especula que el consumo de nutriente carbonado lo utilice la cepa fungal para sustentar la producción de metabolitos extracelular más que para sustentar aumento y crecimiento celular lo cual lo hace completamente deseable para los objetivos de esta investigación.

La cepa fungal empleada demostró su capacidad de biosintetizar ácidos orgánicos debido a la evidencia experimental de la disminución del pH de ambos medios lactosados empleados y a ambas temperaturas, tal y como se observa en la figura 22 que presenta la variación del pH como variable de sustento para demostrar generación de ácidos en solución.

La tendencia de decrecimiento en el perfil de variación de pH es concluyente en la capacidad de generación de ácidos por la cepa de *A. niger* empleada y de que éstos resultan ser ácidos orgánicos débiles cuya concentración debe ser necesariamente significativa ya que sus constantes de disociación resultan ser pequeñas a las temperaturas evaluadas. De acuerdo con su equilibrio termodinámico, es posible la mezcla de ácidos como el cítrico (Callejas y col. 2001), oxálico, pirúvico, itacónico entre otros que los diferentes géneros de *Aspergillus* pueden generar y de las condiciones en las que son generados, pero

debido a que *A. niger* es específico y la lactosa es componente carbonado reportado por otros autores, la obtención de ácido cítrico es selectiva sobre la formación de otros ácidos orgánicos, lo cual se evidenció en la titulación potenciométrica que mostró tres mesetas indicando tres diferentes equilibrios termodinámicos recordando que el ácido cítrico es tri-carboxílico y que el ácido oxálico, por ejemplo, es di-carboxílico.

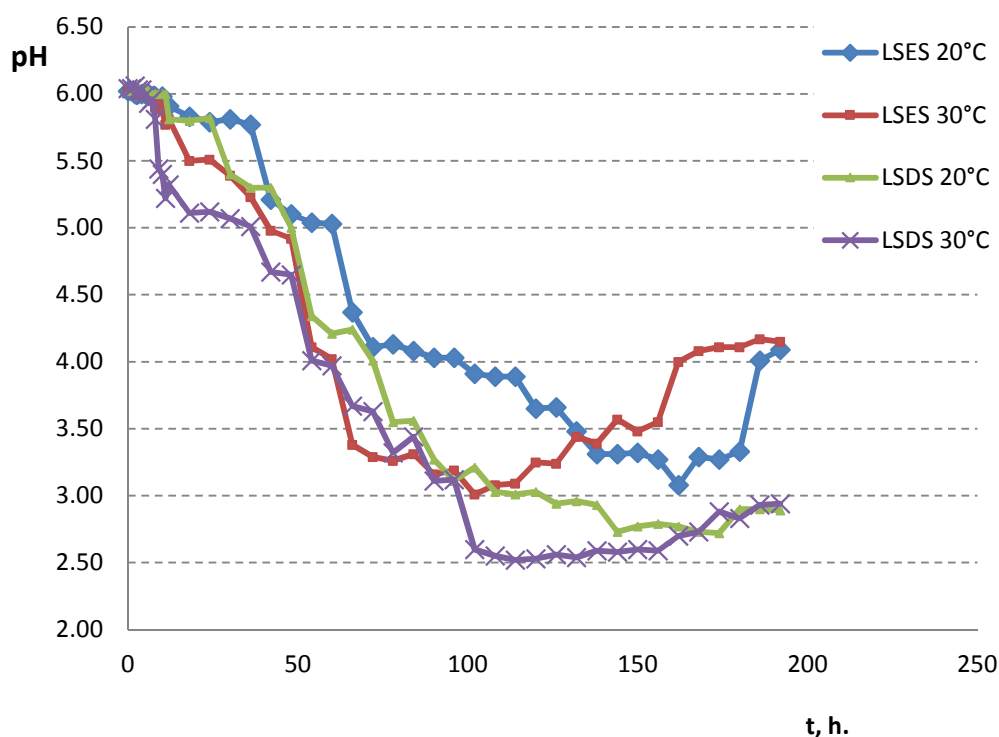


Figura. 22. Variación del pH de los medios lactosados líquidos (LSES y LSDS) después de iniciada la fermentación fungal con *A. niger* con respecto al tiempo de fermentación (192 h.) mostrando el efecto de la temperatura (20 y 30°C) en NBS-BIOFLO 3000 en modo de operación batch (tablas 21 y 22 del Anexo D).

Como se observa en la figura anterior en todos los casos trabajados a 30°C a partir de las 100 h. de fermentación se inicia un período de estancamiento en el pH debido a la posible inhibición por producto que sufre el medio utilizado y a que, debido a conclusiones anteriores, a mayor temperatura la velocidad de generación de producto (ácidos orgánicos, cítrico en particular, resultó mayor. Sin embargo, a 20°C los medios utilizados muestran una cinética menor pero mayormente sostenida ya que la inhibición se presenta más allá de 170 h. lo cual sería deseable

si se estuvieran produciendo metabolitos secundarios, lo cual no fue objetivo de este estudio. El pH mínimo obtenido resultó ser 2,50 obtenido en el trabajo del medio LSDS a 30°C por lo que se presume es el medio adecuado para generar mayor cinética de producción metabólica con esta cepa fungal.

La bioproducción de ácidos orgánicos en general y de cítrico utilizando lactosuero entero y deproteinizado se presentan de acuerdo a las concentraciones obtenidas y expresadas en gramos por litro fueron calculadas utilizando la ecuación 6 y después de ejecutar la valoración potenciométrica con solución de NaOH 0,01N (tablas 21 y 22 del Anexo D) en las figuras 23 y 24 en los que se diferencia claramente la trofofase (etapa de formación de biomasa) de la idiofase (etapa de biosíntesis de producto) que se inicia claramente a partir de las 12 h. de fermentación. La formación de ácido cítrico en el tiempo demuestra que este metabolito está indirectamente relacionado con el crecimiento celular, ya que se puede observar un desfase entre las curvas correspondientes y relacionadas lo cual indicó que a medida que el microorganismo fungal consume el sustrato (lactosa) expresa metabolismo segregando ácidos como metabolitos extracelulares lo cual se evidencia completamente por la disminución del pH del medio durante todo el proceso fermentativo.

Lo expresado anteriormente fundamenta y sustenta claramente la elección del lactosuero como fuente natural y considerada como subproducto con poco valor comercial para obtener una alternativa biotecnológica para la producción de ácido cítrico con las aplicaciones y sustentabilidad que éste y otros ácidos orgánicos poseen (Capítulo I).

La figura 23 muestra los perfiles de variación de la concentración de ácido cítrico generada en sistema cerrado controlado (BIOFLO 3000) cuando se usó como medio nutritivo LSES a las temperaturas de 20 y 30°C y donde se puede apreciar que para las 192 h. de fermentación se generó mayor cantidad de ácido cítrico a 30°C y que de acuerdo a la tendencia observada a partir de las 170 h, aproximadamente, su producción se estabiliza o adquiere constancia por lo que se puede determinar que a partir de este período la producción de ácido cítrico puede

sufrir inhibición por pH y generar a partir de ese tiempo metabolitos secundarios indeseables.

La cinética de producción de ácido cítrico es comparable con la de generación y crecimiento de biomasa pues es mayor en todos los casos a 30°C. El parámetro cinético de producción pudo ser calculado dividiendo la concentración de ácido a las 192 h. sobre el consumo determinado de lactosa en el medio de fermentación. Para 30°C se obtuvo un coeficiente cinético de 0,000217 g. AC/g. lactosa. h y para 20°C de 0,000208 g. AC/g. lactosa. h y concluyendo que se formó mayor cantidad de ácido por unidad de tiempo y por g. de lactosa a 30°C utilizando LSES.

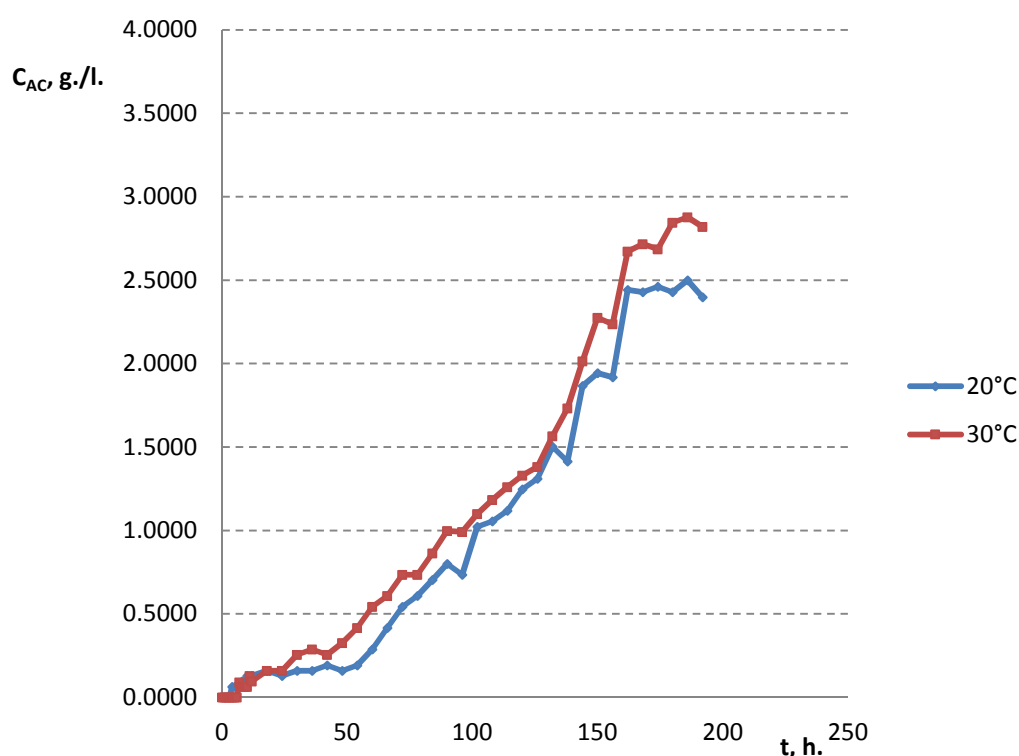


Figura. 23. Variación de la concentración de ácido cítrico (C_{AC} , g./l.) con respecto al tiempo de fermentación (192 h.) mostrando el efecto de la temperatura (20 y 30°C) cuando se utilizó LSES en NBS-BIOFLO 3000 en modo de operación batch (tabla 21 del Anexo D).

Existen pocos reportes sobre la producción de ácido cítrico a partir de lactosuero; Somkuti y Bencivengo (1981) realizaron ensayos en Erlenmeyers, mientras

Hossain *et al.* (1983), intentaron optimizar el proceso en bioreactores a nivel de laboratorio utilizando cepas mutantes y modificando las condiciones del cultivo sumergido. En estos cultivos se empleó el hongo *A. niger*, pero sin suplementos a la lactosa y sin deproteinizar el lactosuero. Abou-Zeid *et al.* (1983) reportaron la obtención de ácido cítrico a partir de una mezcla de semillas de dátiles y suero de leche utilizando *Candida lypolitica* pero no utilizaron cepas fungales. El-Samragy *et al.* (1996) investigó la producción de ácido cítrico a partir de suero de leche con la adición de sal y metanol para dos cepas de *A. niger*, pero las concentraciones obtenidas fueron muy bajas. El-Holi y Al-Delaimy (2003) adicionaron concentraciones significativas de diferentes azúcares al suero de leche, así como metanol, fosfatos y riboflavina, con el fin de aumentar la concentración de ácido cítrico en cultivos superficiales utilizando *A. niger*, con resultados positivos. Sin embargo, la concentración obtenida sin aditivos fue sustancialmente baja. En estos estudios tampoco se ensayó la suplementación ni pre-tratamiento de la lactosa del suero por lo que los resultados obtenidos son alicientes y demandan mayores ensayos y esfuerzos de investigación.

De otro lado, la figura 24 presenta los perfiles de variación de la concentración de ácido cítrico generada en sistema cerrado controlado (BIOFLO 3000) cuando se usó como medio nutritivo LSDS a las temperaturas de 20 y 30°C y donde se puede apreciar que para las 192 h. de fermentación se generó mayor cantidad de ácido cítrico a 30°C mucho más significativa que cuando se usó LSES y que de acuerdo a la tendencia observada a partir de las 150 h, aproximadamente, su producción se estabiliza o adquiere constancia por lo que se puede determinar que a partir de este período menor al obtenido usando LSES la producción de ácido cítrico puede sufrir inhibición por pH y generar a partir de ese tiempo metabolitos secundarios indeseables por lo que el medio LSDS es apropiado para conseguir mayor cantidad de ácido cítrico en menor tiempo y minimizar su inhibición o estacionariedad para evitar metabolismos secundarios indeseables.

La cinética de producción de ácido cítrico en este medio resultó ser completamente comparable con la de generación y crecimiento de biomasa pues es mayor en todos los casos a 30°C. El parámetro cinético de producción para el

medio LSDS pudo ser obtenido a partir de los datos experimentales y resultaron en de 0,000213 g. AC/g. lactosa. h para 30°C y 0,000211 g. AC/g. lactosa. h para 20°C. Como se puede observar estos parámetros cinéticos no revistieron diferencia significativa ($n=3$; $p<0,05$) con el uso de LSES y LSDS y a diferentes temperaturas por lo que la cinética representó un estado poco significativo en la generación de ácido cítrico durante las 192 h. de fermentación pues se desarrollaron casi con idéntica velocidad. La aplicación de ANOVA en ambos casos determinó, sin embargo, diferencia significativa ($n=3$, $p>0,05$) entre las concentraciones obtenidas de ácido cítrico y entre los medios utilizados (LSES y LSDS) y entre las temperaturas ensayadas (20 y 30°C).

Como se observa en la figura 32, se obtuvo mayor concentración de ácido cítrico en 40% superior a una temperatura de 30°C sobre la obtenida a 20°C, lo que evidenció el efecto significativo de incremento en la producción de ácidos orgánicos.

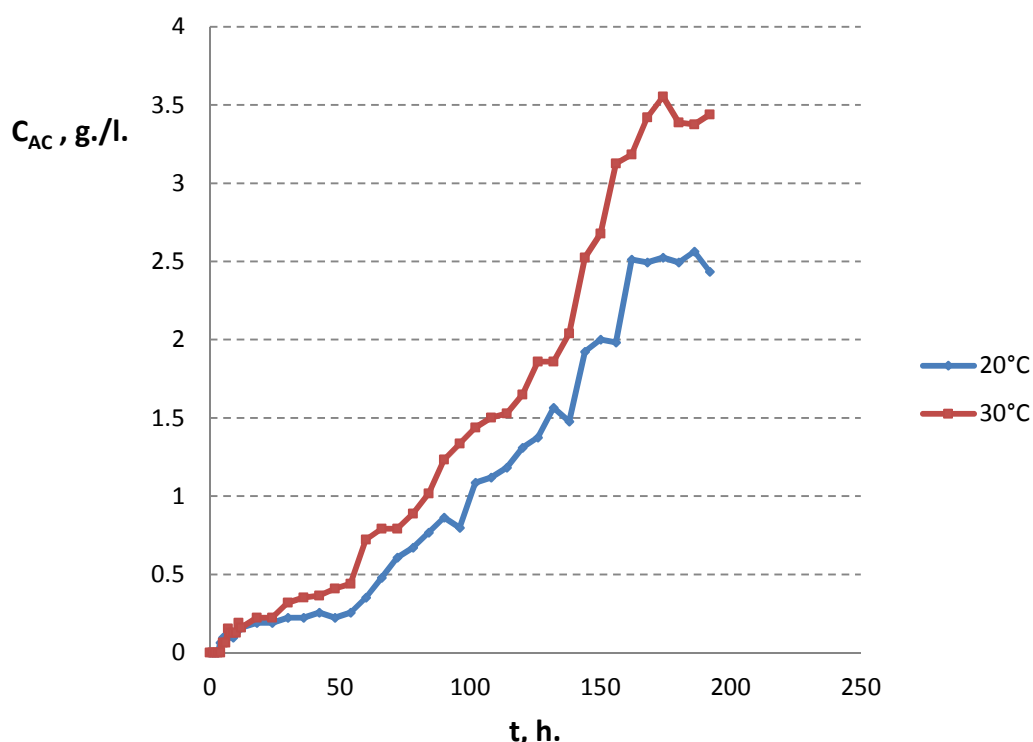


Figura. 24. Variación de la concentración de ácido cítrico (C_{AC} , g./l.) con respecto al tiempo de fermentación (192 h.) mostrando el efecto de la temperatura (20 y 30°C) cuando se utilizó LSDS en NBS-BIOFLO 3000 en modo de operación batch (tabla 22 del Anexo D).

Finalmente, la tabla 20 presenta una tabla resumen de los principales parámetros obtenidos durante la fermentación fungal de *A. niger* cuando se utilizó dos diferentes medios nutritivos (LSES y LSDS) y dos diferentes temperaturas (20 y 30 °C)

Tabla 20. Resumen de parámetros obtenidos durante la fermentación fungal de *A. niger* por 192 h. en ambiente controlado NBS BIOFLO 3000 para la bioproducción de ácido cítrico

Medio de cultivo	LSES		LSDS	
Temperatura	20°C	30°C	20°C	30°C
pH	4,09	4,15	2,89	2,94
M, g.	4,4393	7,9822	4,9401	9,1943
$Y, g. \cdot l^{-1} \cdot s^{-1}$	0,0219	0,0276	0,0309	0,0417
Cs, g./l.	58,5	37	59,5600	45,78
% Conversión	49,82	61,43	51,10	69,06
C _{AC} , g./l.	2,3970	2,8189	2,4354	3,4390

Capítulo V: Conclusiones

1. Se adaptó la ruta metabólica del *Aspergillus niger*, logrando orientarla hacia la producción de ácido cítrico.
2. Se caracterizó el lactosuero utilizado obteniendo: a) apariencia poco viscosa y translúcida; b) pH cercanos a la neutralidad; c) contenidos sólidos disueltos escasos; d) conductividad media y alto contenido de lactosa lo cual resultó deseable para los objetivos de este estudio.
3. Se evaluó el efecto de la temperatura resultando ser la de 30°C como temperatura óptima. Temperaturas menores parecen reducir su actividad por el decremento de sus energías libres termodinámicas.
4. Se logró determinar su parámetro característico Υ , que presentó un valor máximo de 0,0417 g.^{1/3}.s⁻¹ cuando la cepa fungal trabajó con LSDS y a 30°C y se logró obtener hasta 0,047 g. de ácido cítrico por gramo consumido de lactosa en 8 días de operación a 30°C.
5. Los resultados experimentales obtenidos se validaron estadísticamente a un nivel de confiabilidad igual a 95% con ayuda de SPSS v.21.

Recomendaciones

1. Se recomienda explorar la posibilidad de utilizar cepas industriales o registradas tipo ATCC de *A. niger* que garanticen un alto nivel de producción y selectividad de ácido cítrico.
2. Se requiere una interacción entre industria y universidad que garantice secreto industrial para llevar a cabo estos estudios con las cepas mencionadas.
3. Se sugiere utilizar la misma muestra de lactosuero como medio de adaptación o incluir una etapa de pre-adaptación en medio nutritivo líquido con una posterior adaptación en suero de leche.
4. Se invita a continuar los estudios de obtención de ácido cítrico con *Aspergillus niger* en erlenmeyer con diferentes grados de agitación para definir otras condiciones de cultivo en el bioreactor que posibiliten un aumento del rendimiento del producto.
5. Se propone utilizar un mejor control de temperatura en la biosíntesis del ácido cítrico, como por ejemplo un dispositivo electrónico ya que éste es un factor que afecta el rendimiento en la producción de ácido cítrico.

Referencias

1. Abou - Zeid, A. Baghlaf, A.O. Khan, J.A. (1983). ***Utilization of date seeds and cheese whey in production of citric acid by Candida lipolytica***. En: Arab Gulf J.Sci. Res. Vol 1, No 1, pp 267 - 283.
2. Agudelo Motato, María Alejandra; Sánchez Gómez, Valentina del Pilar. (1999). ***Obtención de ácido itacónico por fermentación con Aspergillus terreus***. Universidad Nacional de Colombia. Manizales.
3. Amiot, J. (2001). ***Ciencia y tecnología de la leche***. Editorial Acribia, S.A. España.
4. Applikon®. (1991). ***Dependable Instruments***. User Manual Autoclave Bioreactor 3 Litter. Nov./Dec.
5. Arenas, Roberto.(2003). ***Micología Médica Ilustrada: Clínica, Laboratorio y Terapéutica***. Editorial Interamericana, McGraw – Hill. Segunda Edición. México.

6. Baena, Sandra; Campos, Claudia; Rojas, Germán. (1994). ***Aguas residuales de la industria láctea: Naturaleza y composición de las aguas residuales.*** Revista Ambiente y Desarrollo Pontificia Universidad Javeriana. Año 2, No 2 y3, Mayo – Septiembre.pp.83
7. Boehringer Mannheim/r-biopharm. (2001). ***Citric Acid. UV method for the determination of citric acid in foodstuffs and other materials.*** Cat. No. 0 139 076.
8. Brown, C.M; Campbell, I; Priest, F.G. (2009). ***Introducción a la biotecnología.*** 3era. Ed., Editorial Acribia, S.A. España.
9. Campo, Carlos; Duque Vélez, Hugo Alexander. (2000). ***Determinación de parámetros para la obtención de ácido itacónico en un bioreactor de tanque con agitación.*** Universidad Nacional de Colombia. Manizales. pp. 37-47.
10. Crueger, Wulf; Crueger, Anneliese. (2003). ***Biotecnología: Manual de microbiología industrial.*** Editorial Acribia S.A. España.
11. Díaz, Abel. (1999). ***Diseño estadístico de experimentos.*** Editorial de la Universidad de Antioquia. España.
12. Dellweg, H. (2008). ***Biotechnology: A comprehensive treatment in fungal species.*** Volume 3: Biomass, Microorganisms, Products I and Energy. Edited by H – J. Rehm and G.Reed. N.J./USA.
13. Difco, Laboratories. (2008). ***DIFCO Manual.*** 21th Edition. USA.
14. Gallego, Darío; Cuenca, Jairo. (1998). ***Análisis de tres alternativas para la separación de las proteínas del suero lácteo proveniente de queserías.*** Universidad Nacional de Colombia. Medellín.
15. García – garibay, J.; López – Munguía, G. y Quintero, R. (2003). ***Biotecnología Alimentaria.*** 4ta. Ed. Editorial Limusa. México.

16. Hossain, M. Ahmed, Brooks, J. D.; Maddox, I. S. (2009). *The effect of trace elements on citric acid production from whey permeate by fermentation using Aspergillus niger*. In J. Microbiology. Vol 19. Bangladesh. 102-103 pp.17-34.
17. Jagnow, Gerhard. (2001). *Biotecnología: Introducción con experimentos modelo*. 2da. Ed. ,Editorial Acribia, S.A. España.
18. Kafaro, V. (1999). *Modelirovaniye Biojímicheskij Reaktorov. Lesnaya promy shlennost*. Ed. MIR. Moscow.
19. Kirk, Othmer. (2004). *Encyclopedia of chemical technology*. Volume 6th. John Wiley and Sons, Inc. Sixth edition. Canada.
20. Madriñan, Cecilia. (1998). *Módulo de química de los alimentos*. Universidad del Valle. pp. 527-239.
21. Marth, Elmer. (1993). *Aprovechamiento del suero por fermentación*. En: Industrias Lácteas. Vol. 3. Jul. – Ago., pp. 17-26.
22. Nöller, Carl R. (1998). *Química orgánica*. 13era. Ed.. Editorial Interamericana S.A. México D.F. , México.
23. Prescott, Samuel. (2001). *Microbiología industrial*. 3era. Ed. Editorial Aguilar S.A. Madrid. España.
24. Spreer, E. (2001). *Lactología industrial*. 2da. Ed., Editorial Acribia, S.A. Madrid. España.
25. Suárez M, F. J. (2002). *Fermentación láctica en continuo a partir de suero de leche*. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín.
26. Wainwright, M. (2005). *Introducción a la biotecnología de los hongos*.2da. ed., Editorial Acribia, S.A. España.
27. Ward, O. P. (2003). *Biotecnología de la fermentación: Principios, procesos y productos*. 2da. Ed., Editorial Acribia, S.A. España.

28. Zarros, E., Tortajada, C., García, M.D. And Uruburu, F. (2003). *Storage of stock cultures of filamentous fungi at -80°C.: effects of different freezing-thawing methods*. Microbiología SEM. 9, 28-33 (1993).
29. Zirsop, B.E. (2000). *The stability of industrial organisms". Commonwealth Mycological Institute. Kew*
30. Zonions, A.H.S. (1991). *Preservation of fungi* . Methods in Microbiology. Vol. 4. Academic Press. London, 113-151.
31. www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r_12/12_06_citrico.htm
32. www.drwebsa.com.ar/aam/revvol31/v31-2-03.htm
33. www.ejb.org/content/vol5/issue2/full/5/
34. www.infocarne.com/comunes/imágenes/Compos1.gif
35. www.red6.org/~bioland/nutricompoust-mo.htm
36. www.roche.com/vitamins/who/pdf/rvlnk011s.pdf
37. www.sagpya.mecon.gov.ar/agrico/publicaciones/aceite/composición.htm

Anexo A

Composición del medio sabouraud

Medio de cultivo	Composición (g/L)	Condiciones de preparación
Agar Sabouraud	Peptona: 10g/L D-Glucosa: 40g/L Agar: 12g/L	Suspender 65g del polvo en 1 litro de agua purificada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 minuto hasta disolver completamente. Distribuir en tubo o en otros recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15-20 minutos.

Anexo B

Composición del medio de adaptación

Medio de cultivo	Composición (g./l.)	Condiciones de preparación
Agar Sacarosa-Papa	Extracto de papa: 300g/L Sacarosa: 15g/L Agua destilada: 1000ml Agar: 15g/L	Se ralla 300 g de papa con cáscara blanca y se agrega 1 L de agua. Se calienta en cocinilla durante 45 minutos. Luego se filtra por gasa, se repone el agua perdida y se agrega 15g sacarosa y 15 g de agar. Se esterilizan 15-20 minutos a 121°C.

Anexo C

Método de Fehling para determinación de lactosa en medio

líquido

Cepa utiliza en la fermentación: *Aspergillus niger*

Método: de Fehling

Fundamento: Poder reductor del azúcar sobre la sal cúprica del reactivo

Nomenclatura empleada en la tabla:

Nº: Número de la muestra

Procedimiento:

a) Cálculo del Título de Fehling

- Colocar en una bureta la solución de glucosa al 5 x 1000
- Colocar en un erlenmeyer de 250 ml, 10 ml de Fehling A y 10ml de Fehling B exactamente medidos, añadir 25ml de agua destilada y someter a fuego directo hasta ebullición constante.
- Dejar caer gota a gota desde la bureta la solución de glucosa hasta viraje del color azul al amarillo, para terminar en pardo. Anotar el gasto obtenido.

$$\text{Título de Fehling} = \frac{\text{Gasto de azúcar reductor} \times 5}{1000}$$

b) Obtención del Lactosuero

Medir 20 ml de leche y transferir a un matraz de 100ml, adicionar 40 ml de agua destilada que esté entre 40 a 42 °C y añadir 1 ml de ácido acético. Luego someter a baño maria hasta completa coagulación, enfriar y transferir el

lactosuero a una fiola de 100ml, completar a volumen y filtrar.

c) Determinación de Lactosa

Colocar el lactosuero en una bureta y dejar caer gota a gota sobre un matraz que contiene 10ml de Fehling A y 10ml de Fehling B más los 25 ml de agua destilada y continuar en forma similar al cálculo de título de Fehling, hasta obtener el color pardo o rojo ladrillo (Cu_2O).

$$\text{g\% de Lactosa} = \frac{\text{Título de Fehling}}{\text{Gasto de lactosuero}} \times 100$$



ANEXO D

Datos Experimentales de Fermentación

TABLA 21. Datos experimentales en BIOFLO 3000 para el uso de LSES a 20 y 30°C

t, h.	Vmedio, ml.	pH		M, g.		Cs, g./l.		20°C			30°C		
		20°C	30°C	20°C	30°C	20°C	30°C	V, ml.	V, l.	CAC, g./l.	V, ml.	V, l.	CAC, g./l.
0	1270	6,02	6,02	0,0125	0,0124	118,7	118,7	0	0	0,0000	0	0	0,0000
1	1265	6,02	6,02	0,0140	0,0138	118,7000	118,6	0	0	0,0000	0	0	0,0000
2	1260	6,00	6,00	0,0143	0,0150	118,7000	118,59	0	0	0,0000	0	0	0,0000
3	1255	6,00	6,00	0,0159	0,0167	118,6590	118,59	0	0	0,0000	0	0	0,0000
4	1250	6,00	6,00	0,0171	0,0192	118,4300	118,52	1	0,001	0,0639	0	0	0,0000
5	1245	6,00	5,99	0,0200	0,0212	118,4500	118,53	1	0,001	0,0639	0	0	0,0000
6	1240	6,00	5,99	0,0205	0,0201	118,4300	118,39	1	0,001	0,0639	0	0	0,0000
7	1235	5,98	5,96	0,0240	0,0217	118,4500	118,33	1	0,001	0,0639	1,4	0,0014	0,0895
8	1230	5,98	5,90	0,0256	0,0298	118,4300	118,32	1,5	0,0015	0,0959	1	0,001	0,0639
9	1225	5,96	5,92	0,0285	0,0289	118,4800	118,33	1	0,001	0,0639	1	0,001	0,0639
10	1220	5,98	5,88	0,0281	0,0316	118,3000	118,29	2	0,002	0,1278	1	0,001	0,0639
11	1215	5,93	5,77	0,0319	0,0345	118,2800	118,21	1,5	0,0015	0,0959	2	0,002	0,1278
12	1210	5,91	5,81	0,0329	0,0409	118,2800	118,18	2	0,002	0,1278	1,5	0,0015	0,0959
18	1205	5,83	5,50	0,0485	0,0656	118,2300	118,06	2,5	0,0025	0,1598	2,5	0,0025	0,1598
24	1200	5,79	5,51	0,0710	0,0894	118,0500	117,91	2	0,002	0,1278	2,5	0,0025	0,1598
30	1195	5,81	5,39	0,0967	0,1091	118,0700	117,11	2,5	0,0025	0,1598	4	0,004	0,2557
36	1190	5,77	5,23	0,1230	0,1658	117,6700	116,56	2,5	0,0025	0,1598	4,5	0,0045	0,2876
42	1185	5,21	4,98	0,1588	0,2426	115,2300	113,96	3	0,003	0,1918	4	0,004	0,2557

48	1180	5,10	4,92	0,2009	0,3205	114,5200	111,53	2,5	0,0025	0,1598	5,1	0,0051	0,3260
54	1175	5,04	4,11	0,2499	0,3505	112,9100	106,22	3	0,003	0,1918	6,5	0,0065	0,4155
60	1170	5,03	4,02	0,3363	0,4535	112,0400	104	4,5	0,0045	0,2876	8,5	0,0085	0,5433
66	1165	4,37	3,38	0,3706	0,5506	103,7800	101,23	6,5	0,0065	0,4155	9,5	0,0095	0,6073
72	1160	4,11	3,29	0,4233	0,6877	100,4500	96,37	8,5	0,0085	0,5433	11,5	0,0115	0,7351
78	1155	4,13	3,26	0,5488	0,8608	100,5600	95,55	9,5	0,0095	0,6073	11,5	0,0115	0,7351
84	1150	4,08	3,31	0,6509	0,9659	94,5200	92,11	11	0,011	0,7031	13,5	0,0135	0,8629
90	1145	4,03	3,16	0,7072	1,0691	93,9900	88,22	12,5	0,0125	0,7990	15,6	0,0156	0,9972
96	1140	4,03	3,19	0,8083	1,1112	91,5500	82,95	11,5	0,0115	0,7351	15,5	0,0155	0,9908
102	1135	3,91	3,01	0,9012	1,5632	90,3300	80,01	16	0,016	1,0227	17,2	0,0172	1,0994
108	1130	3,89	3,08	1,0854	1,9064	90,4600	80,33	16,5	0,0165	1,0547	18,5	0,0185	1,1825
114	1125	3,89	3,09	1,2315	2,2612	87,9000	72,58	17,5	0,0175	1,1186	19,7	0,0197	1,2592
120	1120	3,65	3,25	1,3902	2,3391	84,2300	72,76	19,5	0,0195	1,2465	20,8	0,0208	1,3296
126	1115	3,66	3,24	1,4697	2,6409	82,1900	69,32	20,5	0,0205	1,3104	21,6	0,0216	1,3807
132	1110	3,48	3,44	1,7474	2,9677	79,9400	64,99	23,5	0,0235	1,5022	24,5	0,0245	1,5661
138	1105	3,31	3,39	1,9320	3,3203	79,0300	61,22	22,1	0,0221	1,4127	27,1	0,0271	1,7323
144	1100	3,31	3,57	2,2113	3,6998	76,5500	60,33	29,2	0,0292	1,8665	31,5	0,0315	2,0135
150	1095	3,32	3,48	2,3031	4,2072	73,9000	54,94	30,4	0,0304	1,9432	35,6	0,0356	2,2756
156	1090	3,27	3,55	2,6099	4,5434	70,8200	53,09	30	0,03	1,9176	35	0,035	2,2372
162	1085	3,08	4,00	2,6606	5,1289	68,9800	50,28	38,2	0,0382	2,4418	41,8	0,0418	2,6719
168	1080	3,29	4,08	3,1744	5,5064	63,6000	49,33	38	0,038	2,4290	42,5	0,0425	2,7167
174	1075	3,27	4,11	3,5677	6,0351	63,6500	48,21	38,5	0,0385	2,4610	42	0,042	2,6847
180	1070	3,33	4,11	3,7824	6,3966	62,8800	47,4	38	0,038	2,4290	44,5	0,0445	2,8445
186	1065	4,01	4,17	4,0239	7,1119	62,8300	45,7	39,1	0,0391	2,4993	45	0,045	2,8765
192	1060	4,09	4,15	4,4393	7,9822	59,5600	45,78	37,5	0,0375	2,3970	44,1	0,0441	2,8189

TABLA 22. Datos experimentales en BIOFLO 3000 para el uso de LSDS a 20 y 30°C

t, h.	Vmedio, ml.	pH		M, g.		Cs, g./l.		20°C			30°C		
		20°C	30°C	20°C	30°C	20°C	30°C	V, ml.	V, l.	CAC, g./l.	V, ml.	V, l.	CAC, g./l.
0	1270	6,02	6,04	0,0124	0,0126	119,6	119,6	0	0	0	0	0	0
1	1265	6,04	6,04	0,0124	0,0126	119,6	119	0	0	0	0	0	0
2	1260	6,03	6,06	0,0124	0,0126	119,2	118,2	0	0	0	0	0	0
3	1255	6,04	6,03	0,0124	0,0157	118	118	0	0	0	0	0	0
4	1250	6,02	6,03	0,0161	0,0202	118,1	117,1	1	0,001	0,0639213	0	0	0
5	1245	6,04	5,99	0,0183	0,0218	117,4	116,2	1,5	0,0015	0,095882	1	0,001	0,0639213
6	1240	6,02	5,93	0,0201	0,0221	117,1	116,4	1,5	0,0015	0,095882	1	0,001	0,0639213
7	1235	6	5,96	0,024	0,0217	117,4	116	1,5	0,0015	0,095882	2,4	0,0024	0,1534112
8	1230	6	5,81	0,0256	0,0298	117,1	116,2	2	0,002	0,1278426	2	0,002	0,1278426
9	1225	6	5,44	0,0285	0,0289	116,3	115,9	1,5	0,0015	0,095882	2	0,002	0,1278426
10	1220	6	5,4	0,0281	0,0316	116,1	115,8	2	0,002	0,1278426	2	0,002	0,1278426
11	1215	6	5,22	0,0319	0,0345	114,2	116	2,5	0,0025	0,1598033	3	0,003	0,191764
12	1210	5,81	5,32	0,0334	0,0409	114,1	115,6	2,5	0,0025	0,1598033	2,5	0,0025	0,1598033
18	1205	5,8	5,11	0,048499	0,0656	112,9	110,4	3	0,003	0,191764	3,5	0,0035	0,2237246
24	1200	5,82	5,12	0,0992	0,1213	112,3	109,2	3	0,003	0,191764	3,5	0,0035	0,2237246
30	1195	5,4	5,07	0,0997	0,1291	112,1	107,3	3,5	0,0035	0,2237246	5	0,005	0,3196066
36	1190	5,3	5,01	0,1332	0,1809	112	107,4	3,5	0,0035	0,2237246	5,5	0,0055	0,3515673
42	1185	5,3	4,67	0,158762	0,2234	111,1	106,3	4	0,004	0,2556853	5,7	0,0057	0,3643515
48	1180	5	4,65	0,2178	0,4378	111,4	105,7	3,5	0,0035	0,2237246	6,4	0,0064	0,4090964
54	1175	4,34	4,01	0,3321	0,7843	108,3	105,1	4	0,004	0,2556853	6,9	0,0069	0,4410571
60	1170	4,21	3,97	0,3429	0,9856	106,2	104,1	5,5	0,0055	0,3515673	11,3	0,0113	0,7223109

66	1165	4,24	3,67	0,3976	1,1021	101,1	103,2	7,5	0,0075	0,4794099	12,4	0,0124	0,7926243
72	1160	4,01	3,63	0,5989	1,1945	98,3	94,2	9,5	0,0095	0,6072525	12,4	0,0124	0,7926243
78	1155	3,55	3,32	0,6772	1,4309	98,1	94	10,5	0,0105	0,6711738	13,9	0,0139	0,8885063
84	1150	3,56	3,44	0,7456	1,6903	92,3	93,1	12	0,012	0,7670558	15,9	0,0159	1,016349
90	1145	3,27	3,11	0,8934	2,1943	91,3	90,4	13,5	0,0135	0,8629378	19,3	0,0193	1,2336814
96	1140	3,11	3,12	0,9929	3,6738	91,1	88,6	12,5	0,0125	0,7990165	20,9	0,0209	1,3359556
102	1135	3,21	2,6	1,432	4,2054	89,2	87,3	17	0,017	1,0866624	22,5	0,0225	1,4382297
108	1130	3,03	2,55	2,1945	4,9305	83,5	82,4	17,5	0,0175	1,1186231	23,5	0,0235	1,502151
114	1125	3,01	2,52	3,8934	5,8641	82,4	82,1	18,5	0,0185	1,1825444	23,9	0,0239	1,5277195
120	1120	3,03	2,53	4,5612	6,7811	80,3	80,1	20,5	0,0205	1,310387	25,8	0,0258	1,64917
126	1115	2,94	2,56	4,9876	8,5423	80,5	77,3	21,5	0,0215	1,3743083	29,1	0,0291	1,8601104
132	1110	2,96	2,54	4,9467	9,0237	77,4	71,2	24,5	0,0245	1,5660723	29,1	0,0291	1,8601104
138	1105	2,93	2,59	4,9823	9,2313	77,1	70,2	23,1	0,0231	1,4765825	31,9	0,0319	2,0390901
144	1100	2,73	2,58	4,8942	9,2433	73,2	59,3	30,1	0,0301	1,9240317	39,5	0,0395	2,5248921
150	1095	2,77	2,6	4,9312	9,2982	70,2	54,94	31,3	0,0313	2,0007373	41,9	0,0419	2,6783032
156	1090	2,79	2,59	4,9921	9,1309	69,3	48,3	31	0,031	1,9815609	48,9	0,0489	3,1257525
162	1085	2,77	2,7	5,0364	9,4395	66,3	44,3	39,3	0,0393	2,5121078	49,8	0,0498	3,1832817
168	1080	2,73	2,73	4,8934	9,211	62,3	37,2	39	0,039	2,4929314	53,5	0,0535	3,4197905
174	1075	2,72	2,88	5,1044	9,3959	60,4	37,4	39,5	0,0395	2,5248921	55,6	0,0556	3,5540253
180	1070	2,9	2,83	4,8566	9,4002	59,6	37,9	39	0,039	2,4929314	53	0,053	3,3878299
186	1065	2,9	2,93	5,0992	9,3327	58,3	38,1	40,1	0,0401	2,5632449	52,8	0,0528	3,3750456
192	1060	2,89	2,94	4,9401	9,1943	58,5	37	38,1	0,0381	2,4354022	53,8	0,0538	3,4389669