

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTOS**



**Producción de Ácido Cítrico a Partir de Aguas Residuales con Altos
Contenidos de Almidón Mediante Fermentación de Aspergillus
níger unigras 0007 ASP HSA Utilizando Microorganismos Libres e
Inmovilizados**

T E S I S

Por:

ALBERTO ISAAC ESCUDÉ SÁNCHEZ

Presentada como Requisito Parcial Para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Junio del 2007

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTOS

Producción de Ácido Cítrico a Partir de Aguas Residuales con Altos
Contenidos de Almidón Mediante Fermentación de Aspergillus
níger unigras0007 ASP HSA Utilizando Microorganismos Libres e
Inmovilizados

TESIS

Presentada por:

ALBERTO ISAAC ESCUDÉ SÁNCHEZ

Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como Requisito
Parcial para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.

APROBADA

M.C. María Hernández González
Presidente

M.C. Xóchitl Ruelas Chacón
Vocal

M.C. Felipa Morales Luna
Vocal

M.P. Francisco Hernández Centeno
Vocal suplente

Ing. José Rodolfo Peña Oranday
Coordinador de la División de Ciencia Animal

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. MÉXICO.
JUNIO DEL 2007

AGRADECIMIENTOS

A **Dios Padre** por darme la oportunidad de vivir y de poder culminar el presente trabajo de manera satisfactoria así como todas las bendiciones que ha dado a mi familia.

A mi **Alma Mater**, por abrirme las puertas de la institución para poder obtener una formación profesional además de todos los momentos vividos a lo largo de mi estancia en la universidad.

A mis amigos **Belinda y Manuel** que siempre me apoyaron y me brindaron su amistad incondicional en esta etapa de mi vida.

A mis primos **Sara y Chris** que igualmente me ayudaron siempre durante mi estancia en México y creyeron en mí.

A la **M.C. María Hernández González**, por toda la enseñanza brindada a lo largo de mi preparación profesional así como por su gran apoyo al realizar esta investigación, además de amistad incondicional.

A la **M.C. Xóchitl Ruelas Chacón**, por los conocimientos impartidos durante el transcurso de la carrera, aparte de la amistad y apoyo brindado en todo momento.

A la **M.C. Felipa Morales Luna**, por todo el apoyo e interés mostrado en la colaboración del presente trabajo.

Al **M.P. Francisco Hernández Centeno (el master)**, por haberme ayudado mucho en la culminación del presente trabajo así como por todos sus consejos.

A mis amigos y compañeros de generación gracias por su apoyo y amistad fuera y dentro de la universidad, en especial: **Sarai, Rosy, Liz, Breznev, Nuyen y Nubia** y a todos aquellos con quien tuve amistad durante mi estancia en la Universidad.

DEDICATORIAS

A mis padres

Lucy de Lourdes Sánchez Pinto

Alberto Isaac Escudé Kuri

Por ser la fuente de inspiración para poder conseguir siempre las metas que me he propuesto, enseñándome que todo se puede lograr si uno se esfuerza y tiene fé y por todo el sacrificio que hicieron para que yo pudiera lograr tener una carrera profesional. “Recuerden que este logro también es suyo”. Los amo.

A mi hermana **Lourdes** por siempre estar hay apoyándome aunque sea en la distancia. Te quiero mucho.

A mis tíos **Isabel y Ramón** por todo el apoyo incondicional que me brindaron desde el momento que llegue a México y por todos sus consejos que me sirvieron de mucho para la culminación de esta etapa importante en mi vida.

A mis Abuelitos: **Minerva, Violeta y Hugo**; por todas sus enseñanzas y cariño demostrado a lo largo de mi vida. Aunque sea en la distancia se que siempre están ellos ahí. Los quiero

A mi tía Guadalupe también por todo el apoyo y cariño demostrado siempre sin importar la circunstancia.

En general a toda la familia: Escudé y Sánchez.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	3
DEDICATORIAS	4
ÍNDICE GENERAL	5
ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	9
RESUMEN	10
INTRODUCCION	12
OBJETIVOS	13
1.1 OBJETIVO GENERAL	13
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
MARCO TEÓRICO	14
2.1 AGUAS RESIDUALES DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA EN GENERAL	14
2.1.1 Definición de aguas residuales	14
2.1.2 Clasificación de las aguas residuales en general.....	14
2.1.3 Clasificación de las aguas residuales industriales	15
2.1.4 Clasificación de las industrias alimentarias	16
2.1.4.1 Procesos desarrollados en las industrias alimentarias	16
2.1.4.2 Clasificación de los procesos utilizados en la industria alimentaria según el tipo de operación o fenómeno aplicado.....	17
2.1.5 Impacto de las aguas residuales de la industria alimentaria	18
2.1.6 Industrias involucradas y su afectación.....	19
2.2 TIPOS DE AGUAS RESIDUALES GENERADAS POR LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS	20
2.2.1 Características específicas de las aguas residuales de las industrias alimentarias.....	20
2.2.1.1 Industrias lácteas y derivadas.....	20
2.2.1.2 Industria cervecera	21
2.2.1.3 Industrias de aceites.....	21
2.2.1.4 Industria de conservas de legumbres y frutas	22
2.2.1.5 Industrias cárnicas y derivadas.....	22
2.3 AGUAS RESIDUALES RICAS EN CARBOHIDRATOS	23

2.3.1	Uso de los residuos orgánicos	24
2.3.1.1	Carbohidratos	24
2.3.1.1.1	Definición y composición de los carbohidratos.....	24
2.3.1.1.1.1	Monosacáridos	24
2.3.1.1.1.2	Disacáridos.....	25
2.3.1.1.1.3	Polisacáridos	25
2.3.1.1.2	El almidón	25
2.3.1.1.2.1	Distribución y obtención.....	25
2.3.1.1.2.2	Estructura y propiedades de los gránulos de almidón	26
2.3.1.1.2.3	Estructura de la amilosa	26
2.3.1.1.2.4	Estructura de la amilopectina	27
2.3.1.1.2.5	Distintos usos del almidón	28
2.3.1.1.2.6	Productos derivados del almidón.....	28
2.3.1.1.2.7	Bioproductos obtenidos a partir del almidón.....	29
2.3.2	Enzimas empleadas en la hidrólisis y síntesis del almidón	30
2.3.2.1	α Amilasas	31
2.3.2.1.1	Acción de la α Amilasa.....	31
2.3.2.2	Glucoamilasa	32
2.4	ÁCIDOS ORGÁNICOS EN GENERAL	33
2.4.1	Antecedentes	33
2.4.2	Los ácidos orgánicos en la industria de alimentos	33
2.4.2.1	Uso específico de los ácidos orgánicos en la industria de alimentos..	34
2.4.3	Ácido cítrico.....	35
2.4.3.1	Características generales	35
2.4.3.2	Historia del ácido cítrico.....	35
2.4.3.3	Demanda y producción mundial	36
2.4.3.4	El consumo	37
2.4.3.5	Usos del ácido cítrico.....	38
2.4.4	Alternativas para la producción de ácido cítrico	39
2.4.4.1	Obtención de ácido cítrico por fermentación	39
2.4.4.2	Producción fúngica de ácido cítrico	39
2.4.5	Género <i>Aspergillus</i>	40
2.4.5.1	Características generales	40

2.4.6 <i>Aspergillus niger</i>	41
2.4.6.1 Morfología.....	41
2.4.6.2 Propiedades Fisiológicas.....	41
2.4.6.2.1 Necesidad de Humedad.....	41
2.4.6.2.2 Necesidad de temperatura.....	41
2.4.6.2.3 Necesidad de oxígeno y de pH.....	42
2.4.6.2.4 Necesidades nutritivas.....	42
2.4.7 Ruta bioquímica para la obtención de ácido cítrico.....	42
2.4.8 Tipo de fermentaciones para la obtención de ácido cítrico.....	44
2.4.8.1 Cultivo de superficie.....	45
2.4.8.2 Proceso sumergido.....	45
2.5 BIOCATALIZADORES INMOVILIZADOS.....	46
2.5.1 Definición.....	46
2.5.2 Células inmovilizadas.....	46
2.5.2.1 Ventajas y desventaja de la inmovilización celular.....	46
2.5.2.1.1 Ventajas.....	46
2.5.2.1.2 Desventajas.....	47
2.5.3 Características que deben cumplir los métodos de inmovilización para ser aplicados.....	47
2.5.4 Características de las células inmovilizadas.....	48
2.5.5 Métodos de inmovilización celular.....	48
2.5.5.1 Inmovilización sin soporte.....	49
2.5.5.2 Absorción.....	49
2.5.5.3 Captura.....	50
2.5.6 Tipos de soportes para la inmovilización.....	51
2.5.6.1 Tipos de soportes inorgánicos.....	51
2.5.6.2 Tipos de soportes orgánicos.....	51
2.6 USO DE <i>OPUNTIA IMBRICATA</i> COMO SOPORTE ORGÁNICO.....	52
2.6.1 Género <i>Opuntia</i>	52
2.6.1.1 Valor nutricional.....	52
2.6.2 <i>Opuntia imbricata</i> (Nopal coyonoxtle, xoconoxtle, cardenche o choya) ...	52
2.6.2.1 Características generales.....	52

MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
3.1 ETAPA 1. PROLIFERACIÓN DEL MICROORGANISMO	54
3.1.1 Inducción del microorganismo.....	54
3.2 ETAPA 2. FERMENTACIÓN.....	55
3.2.1 Preparación del medio	55
3.2.2 Inoculación y monitoreo de la fermentación	56
3.3 ETAPA 3. FERMENTACIÓN MEDIANTE SISTEMA INMOVILIZADO DE CÉLULAS.	56
3.3.1 Preparación del soporte	56
3.3.2 Preparación del medio e inmovilización	56
3.3.3 Fermentación usando microorganismos inmovilizados	57
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
4.1 ETAPA 1 PROLIFERACIÓN DEL MICROORGANISMO	58
4.1.1 Inducción del microorganismo.....	58
4.2 ETAPA 2. FERMENTACIÓN.....	60
4.2.1 Preparación del medio	60
4.2.2 Inoculación y monitoreo de la fermentación	60
4.3 ETAPA 3. FERMENTACIÓN MEDIANTE SISTEMA INMOVILIZADO DE CÉLULAS.	63
4.3.1 Preparación del soporte	63
4.3.2 Preparación del medio e inmovilización	64
4.3.3 Fermentación usando microorganismos inmovilizados	64
CONCLUSIONES	68
BIBLIOGRAFÍA	69

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Clasificación de los procesos utilizados en la industria alimentaria según el tipo de operación o fenómeno aplicado.	18
TABLA 2. Tipos de aguas residuales generadas por las industrias de alimentos.	20
TABLA 3. Estructura y composición de varios gránulos de almidón	26
TABLA 4. Fuentes de obtención de α amilasas y glucoamilasas	31
TABLA 5. Usos del ácido cítrico en los diferentes sectores de la industria a nivel mundial.	38
TABLA 6. Métodos de inmovilización de células	49
TABLA 7. Algunos materiales usados para absorber células.....	53
TABLA 8. Adaptación del microorganismo a diferentes concentraciones de sacarosa y almidón.....	55
TABLA 9. Sales contenidas en 1000 ml de medio czapeck-dox,	55

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Estructura de la amilosa	27
FIGURA. 2 Estructura de la amilopectina.....	27
FIGURA 3. Estructura del ácido cítrico (García; et al, 1999).	35
FIGURA 4. Consumo de ácido cítrico por destino (España, 2004)	37
FIGURA 5. Ciclo del ácido cítrico	44
FIGURA 6. <i>Opuntia imbricata</i> (nopal coyonoxtle, xoconoxtle, cardenche o choya) .	53
FIGURA 7. Proliferación de <i>Aspergillus niger</i> en medio czapeck-dox.....	58
FIGURA 8. Crecimiento de esporas de aspergillus en el primer, tercer y quinto cultivo.....	59
FIGURA 9. Observación microscópica de <i>Aspergillus niger</i>	59
FIGURA 10. Monitoreo y consumo de almidón.	60
FIGURA 11. Monitoreo y consumo de azúcares totales.....	61
FIGURA 12. Producción de ácido cítrico.....	62
FIGURA 13. Resultados del monitoreo del ph cada 24 horas.....	63
FIGURA 14. Constitución final del soporte previo a la inmovilización.	64
FIGURA 15. Formación de biopelícula en el soporte.	64
FIGURA 16. Monitoreo y consumo de almidón.	65
FIGURA 17. Monitoreo y consumo de azúcares totales.....	66
FIGURA 18. Producción de ácido cítrico.....	66
FIGURA 19. Resultados del monitoreo del ph cada 24 horas.....	67

RESUMEN

Los desechos de la agroindustria tienen un efecto negativo en el ambiente, cuando son dispuestos en los cauces de ríos o alcantarillados, siendo común en nuestra sociedad. El poder contar con un proceso que permita utilizar estos desechos y además obtener algún producto de valor, permite a la agroindustria ofrecer mayores elementos para satisfacer las expectativas económicas y ambientales de la sociedad.

Es por ello que el presente trabajo tuvo como objetivo fundamental el aprovechamiento de aguas residuales con alto contenido de almidón para la obtención de ácido cítrico mediante el uso de *Aspergillus niger* como cepa inducida, utilizando microorganismos libres e inmovilizados.

Para lograr la depolimerización del almidón durante la fermentación, fue necesaria la inducción previa del microorganismo a diferentes concentraciones de sustrato, realizando cinco cultivos partiendo de sacarosa, hasta llegar a contener almidón como única fuente de carbono.

Posterior a la inducción con el microorganismo ya adaptado al almidón, se utilizaron dos tipos de fermentaciones: con el inóculo libre en el medio y realizando una fermentación con un soporte orgánico para inmovilizar las células, ambas sometidas a un proceso sumergido, para posteriormente evaluar la mejor alternativa para la producción del ácido cítrico. El medio fue sometido a agitación constante con temperaturas controladas de 31°C y se realizaron monitoreos de: pH, consumo de almidón, azúcares totales y ácido cítrico, cada 24 horas durante 5 y 6 días.

Se obtuvieron rendimientos de un 62% en relación al consumo de almidón y la obtención de ácido cítrico que alcanzó su mayor producción entre las 72 y 96 horas en el caso de la fermentación con células libres en el medio. En cuanto a la fermentación con células inmovilizados se pudo obtener rendimientos de consumo de almidón de un 97%, pero no fue posible la detección de ácido cítrico debido a la alteración o desviación del microorganismo sobre otra posible ruta metabólica que dio origen a otro tipo de subproducto no determinado en el presente trabajo.

INTRODUCCION

La industria alimentaria depende directamente del medio ambiente para garantizar un suministro de materias primas que permita obtener productos libres de contaminantes para el consumo humano. La preocupación de la industria alimentaria con respecto a sus aguas residuales se centra más en las cargas de contaminantes orgánicos. Si estas cargas no se previenen o controlan adecuadamente afectarán de manera negativa a los ecosistemas locales.

Los residuos restantes que quedan tras el máximo aprovechamiento en la industria alimentaria son utilizados con diferentes fines como lo es la obtención de subproductos alimenticios a través de diversos procesos, como lo son las fermentaciones, utilizando microorganismos específicos libres o inmovilizados.

Las aguas residuales generadas por algunos procesos de la agroindustria contienen grandes concentraciones de compuestos orgánicos, tales como el almidón, mismos que son una fuente de alimentación de microorganismos que convierten a estos efluentes en peligrosos focos de contaminación.

Para contrarrestar este problema, en el presente trabajo se plantea una opción de tratamiento de dichas aguas residuales ricas en almidones, que además hace posible la obtención de un subproducto de interés y aplicación industrial.

Los bioproductos obtenidos a partir del almidón incluyen una gran variedad de mercancías refinadas, reemplazando productos hechos de materia prima distinta o a través de síntesis química. Entre los productos que se pueden obtener del almidón se pueden mencionar ácidos orgánicos, aminoácidos, vitaminas y aditivos alimentarios. Para el caso del presente, la producción de ácido cítrico es el foco de atención.

OBJETIVOS

1.1 Objetivo General

- Obtener ácido cítrico a partir de aguas residuales con altas concentraciones de almidón mediante fermentación.

1.2 Objetivos específicos

- Obtener una cepa capaz de tener almidón como única fuente de carbono.
- Obtener ácido cítrico a partir de almidón mediante el uso microorganismos degradadores del mismo siguiendo las cinéticas de reacción.
- Inmovilizar en un soporte orgánico microorganismos productores de ácido cítrico.
- Obtener ácido cítrico, mediante el uso de un soporte orgánico.

MARCO TEÓRICO

2.1 Aguas residuales de la industria alimentaria en general

2.1.1 Definición de aguas residuales

Se denomina aguas residuales a aquellas que resultan del uso doméstico o industrial de la misma, también son llamadas, aguas residuales, negras o aguas cloacales (Marsilli, 2005).

Son residuales pues, habiendo sido usada el agua, constituyen un residuo, algo que no sirve para el usuario directo; son negras por el color que habitualmente tienen (Marsilli, 2005).

Algunos autores hacen una diferencia entre aguas servidas y aguas residuales en el sentido que las primeras solo provendrían del uso doméstico y las segundas corresponderían a la mezcla de aguas domésticas e industriales (Marsilli, 2005).

En todo caso, están constituidas por todas aquellas aguas que son conducidas por el alcantarillado e incluyen, a veces, las aguas de lluvia y las infiltraciones de agua del terreno (Marsilli, 2005).

2.1.2 Clasificación de las aguas residuales en general

Las aguas residuales se distinguen como urbanas, industriales y agropecuarias. Las primeras se subdividen en aguas domésticas y urbanas, las segundas en aguas de refrigeración directa o indirecta aguas de proceso: lavados, transporte, etc., y aguas de drenaje potencialmente contaminadas o limpias, y, las terceras en purines y lixiviados de estercoles (Anónimo 1., 2002).

En concreto, las aguas residuales industriales son las que proceden de cualquier actividad industrial en cuyo proceso de producción, transformación o manipulación se utilice el agua, incluyéndose los líquidos residuales, aguas de proceso y aguas de drenaje (Anónimo 1., 2002).

Los líquidos residuales derivan directamente de la fabricación de todo tipo de productos. Consisten en disoluciones acuosas a distinta concentración de los productos en el proceso productivo. Es imprescindible el tratamiento de esta agua previo a su vertido debido al poder contaminante que tienen, el cual es variable según la concentración de los agentes contaminantes (Anónimo 1., 2002).

2.1.3 Clasificación de las aguas residuales industriales

Las industrias se clasifican en cinco grupos según sus vertidos (Anónimo 1., 2002).

- Industrias con efluentes principalmente orgánicos: Papeleras, azucareras, mataderos, curtidos, conserveras, lecherías y subproductos, fermentaciones, preparación de productos alimenticios, bebidas y lavanderías.
- Industrias con efluentes orgánicos e inorgánicos: Refinerías, petroquímicas, coquerías, químicas y textiles.
- Industrias con efluentes principalmente inorgánicos: Químicas, limpieza y recubrimiento de metales, explotaciones mineras y salinas.
- Industrias con efluentes con materias en suspensión: Lavaderos de mineral y carbón, corte y pulido de mármol y otros minerales.
- Industrias con efluentes de refrigeración: Centrales térmicas y centrales nucleares.

2.1.4 Clasificación de las industrias alimentarias

Clasificación de la Unión Europea denominada N.A.C.E., (Nomenclatura General de las Actividades Económicas en la Unión Europea); ordena las industrias de alimentos de la siguiente manera (Seoáñez , 2003).

- Extracción y refinado de aceites y fabricación de grasas vegetales.
- Fabricación de conservas vegetales.
- Fabricación de productos de molinería, troceado y descascarado de frutos secos.
- Fabricación de pastas alimenticias y productos amiláceos.
- Industrias del pan, bollería, pastelería y galletas.
- Industria del azúcar.
- Fabricación de cacao, chocolate, confitería y productos alimenticios diversos.
- Fabricación de alcoholes etílicos de fermentación
- Industrias ecológicas, mosto de uva y elaboración de alcohol vínico; fabricación de sidra y de bebidas alcohólicas de cualquier tipo.
- Fabricación de cerveza y malta.
- Industrias de bebidas no alcohólicas.
- Centros de manipulación hortofrutícola y conservación frigorífica.

2.1.4.1 Procesos desarrollados en las industrias alimentarias

La mayor parte de las materias primas obtenidas de la naturaleza (sector agrícola o ganadero) deben ser tratadas en las industrias agroalimentarias mediante una serie de procesos tecnológicos industriales. La finalidad última de estos procesos es la producción de un artículo alimenticio preparado para su salida inmediata al

mercado y listo para su consumo. Los procedimientos son numerosos, y varían en función del tipo de industria alimentaria, de las características de la materia prima y, por supuesto del producto final que se desea obtener (Seoáñez, 2003)..

El estudio de los distintos procesos empleados en la industria alimentaria es importante desde el punto de vista medioambiental, pues los residuos que genera cada uno de ellos son diversos. Aunque las aguas residuales de la industria alimentaria presentan ciertas peculiaridades que las diferencian de los demás vertidos de otras industrias, como son los fuertes volúmenes de agua o su elevada carga orgánica y a veces mineral, estas aguas residuales suelen ser *especializadas*, y esta especialización es debida tanto a las materias primas como a la naturaleza del proceso de tratamiento aplicado. Ello justifica la necesidad de explicar, aunque sea de forma resumida los distintos procesos industriales utilizados en las industrias agroalimentarias. Estos procesos se pueden clasificar atendiendo a varios criterios. (Seoáñez, 2003).

2.1.4.2 Clasificación de los procesos utilizados en la industria alimentaria según el tipo de operación o fenómeno aplicado

En la tabla 1 se muestran los diferentes procesos usados en la industria alimentaria, y el fenómeno al que se deben.

Tabla 1. Clasificación de los procesos utilizados en la industria alimentaria según el tipo de operación o fenómeno aplicado.

Fenómeno	Proceso
Fenómenos de transmisión del calor	<ul style="list-style-type: none"> • Pasterización • Esterilización • Evaporación • Escaldado • Refrigeración • Congelación • Secado y deshidratado
Fenómenos mecánicos	<ul style="list-style-type: none"> • Clasificación • Molienda • Prensado • Mezcla y batido • Filtración • Emulsionado • Centrifugación • Fluidización • Homogenización
Fenómenos de separación de la materia	<ul style="list-style-type: none"> • Limpieza • Destilación • Extracción
Fenómenos relacionados con la radiación electromagnética	<ul style="list-style-type: none"> • Ionización • Horneado • Microondas, etc.
Fenómenos de ingeniería bioquímica (procesos biotecnológicos)	<ul style="list-style-type: none"> • Fermentación • Reacciones enzimáticas

(Seoáñez, 2003).

2.1.5 Impacto de las aguas residuales de la industria alimentaria

La industria alimentaria depende directamente del medio ambiente para garantizar un suministro de materias primas que permita obtener productos libres de contaminantes para el consumo humano. Debido a un amplio proceso de elaboración de un gran volumen de productos, la capacidad de repercutir al medio ambiente es considerable.

En un contexto ecológico, el interés respecto a la industria alimentaria se centra más en las cargas de contaminantes orgánicos que en el efecto de las sustancias

tóxicas. Si estas cargas no se previenen o controlan adecuadamente afectaran de manera negativa a los ecosistemas locales.

Aunque la disponibilidad de agua potable es esencial, la industria alimentaria requiere grandes volúmenes de este elemento para diversos usos ajenos al consumo, como la limpieza inicial de las materias primas, el lavado en canaletas, el escaldado, la pasteurización, la limpieza de los equipos productivos y la refrigeración del producto terminado (Spiegel ,2005).

Estos residuos de la industria alimentaria son por lo general bastante contaminantes, siendo el problema básico, el de los efluentes líquidos. Las aguas residuales de la industria alimentaria son de composición tan variada como los productos fabricados, y por lo tanto son difíciles de caracterizar tanto en calidad como en cantidad.

En líneas generales estas aguas residuales son esencialmente orgánicas, con una demanda de oxígeno importante, y por lo tanto necesitan en su mayoría tratamientos biológicos, así como físico-químicos (Seoáñez, 2003).

2.1.6 Industrias involucradas y su afectación

La industria alimentaria consume cantidades enormes de agua. Los usos son numerosos, pues puede ser utilizada en el transporte, como materia prima o como componente de ésta. También se usa el agua como vehículo térmico (agua de refrigeración, vapor de agua, etc.). Como ejemplo se cita algunos sectores de la industria alimentaria y el consumo general de agua que realizan (Seoáñez , 2003).

- Conservas vegetales: 10-35 m³ de agua/ Tm de materia prima.
- Mataderos: 2-7 m³ de agua / Tm de canal.

- Lácteas: 1-2 m³ de agua / Tm de leche.
- Azucareras: 0,30 m³ de agua/ Tm de materia prima.

La anterior circunstancia obliga a las industrias alimentarias a intentar reutilizar el agua que precisan, y esto lo hacen en proporciones considerables.

2.2 Tipos de aguas residuales generadas por la industria de alimentos

En la tabla 2, se muestran las operaciones desarrolladas en la industria alimentaria que originan aguas residuales, así como el tipo de industria que los genera.

Tabla 2. Tipos de aguas residuales generadas por la industrias de alimentos.

Ind. lechera	Ind. cervecera	Ind. aceites	Ind. de conservas legumbres y frutas	Mataderos
-Diluciones de leche tratada, mantequilla y suero. -El suero de la fabricación de quesos (muy contaminante).	-Las salas de braceo. -Las cubas de fermentación y almacenamiento. -Limpieza de botellas.	-Vertidos de lavado de materias grasas. -Vertidos de la saponificación de ácidos grasos.	-Aguas de lavado (poco contaminadas). -Aguas procedentes de los escaldadores (muy contaminadas).	-Proteínas. -Grasas. Carbohidratos.

(Anónimo, 2.

2.2.1 Características específicas de las aguas residuales de las industrias alimentarias.

2.2.1.1 Industrias lácteas y derivadas

Las plantas de tratamiento de leche realizan, por lo general, diferentes procesos del producto, por lo que los residuos que vierten serán de diferente tipo según el producto que se elabore (Seoáñez , 2003)..

Los vertidos residuales se componen de agua, leche y subproductos.

Contienen materia orgánica y otros productos putrescibles, que originan ácido láctico y precipitan la caseína y otros compuestos nitrogenados (Seoáñez , 2003)..

2.2.1.2 Industria cervecera

Las fábricas de cerveza necesitan un consumo de agua elevado en cada uno de sus procesos de fabricación, aunque generalmente realizan reciclados importantes (Seoáñez , 2003)..

Los efluentes contienen materia orgánica y varios productos inorgánicos.

Después de la cocción, el líquido residual tiene una fuerte carga de materia orgánica.

Las aguas de lavado también son dignas de tenerse en cuenta, pues aportan gran cantidad de hidratos de carbono.

En el proceso de la cerveza (fermentación, filtración, etc.) se producen gran parte de las aguas residuales con restos de cerveza y levadura (Seoáñez , 2003)..

2.2.1.3 Industrias de aceites

El principal contaminante vertido de estas industrias se denomina, alpechín, y es el residuo líquido no oleoso que se separa por sedimentación y centrifugación en la extracción del aceite de oliva. Es un líquido de color rojizo oscuro, de olor desagradable y sabor amargo constituido por las aguas de vegetación de la aceituna, llevando en suspensión tejidos, sustancias pécticas y aceites (Seoáñez , 2003).

2.2.1.4 Industria de conservas de legumbres y frutas

Los tipos de contaminantes que aparecen en la industria de conservas de legumbres y frutas son efluentes de tipo sólidos y líquidos. Los primeros están constituidos por recortes y pieles de frutos, huesos, partículas de tierra y restos no aprovechables.

Los residuos líquidos se componen de agua, sólidos en suspensión y sólidos en disolución. Generalmente se trata de suciedad adherida a los productos y desprendida por lavado, así como una concentración de materia orgánica originada en las operaciones de blanqueo, donde el agua se enriquece con grandes cantidades de azúcares, almidones y productos solubles del fruto.

Además, se hallan todos los restos procedentes de la limpieza de la maquinaria y naves de la fábrica (Seoáñez , 2003)..

2.2.1.5 Industrias cárnicas y derivadas

Comprenden principalmente los mataderos y las fábricas de conservas y embutidos.

Las aguas residuales y los residuos de las industrias cárnicas están formadas por los efluentes procedentes de las salas de sacrificio, tripería, vaciado de panzas, vehículos, aparatos y de diversas instalaciones (Seoáñez , 2003)..

El volumen producido varía considerablemente, y depende de la importancia de la instalación, del modo de explotación y del tamaño de las reses sacrificadas (Seoáñez , 2003)..

La DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno) es elevada en relación a la oxidación por el permanganato, característica común en todas las aguas residuales de mataderos, atribuida al alto contenido de albúminas y otros compuestos nitrogenados.

Las aguas residuales de mataderos se caracterizan por su rápida putrefacción, con desprendimiento de gases y olor nauseabundo. Provocan, por su contenido en grasas, obstrucciones por ciertos productos resultantes de su descomposición y averías en las bombas por residuos de tripas (Seoáñez , 2003)..

Si no se tratan convenientemente, proporcionan una DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno) muy elevada a los cursos de agua receptores y la destrucción de la microflora habitual del río. Provocan también la formación de depósitos de lodos y grasas, facilitan el desarrollo masivo de hongos y emiten olores molestos.

La presencia de sangre comunica al agua una coloración rojiza, visible a gran distancia del punto vertido (Seoáñez , 2003).

2.3 Aguas residuales ricas en carbohidratos

En un proceso general de elaboración de un alimento se generan residuos orgánicos. Se pueden generar como sólidos, o bien pueden eliminarse fragmentos de sólidos orgánicos junto con el agua empleada.

El porcentaje de residuos generado en la elaboración de productos es muy variable, ya que está determinado por: el tipo de materia prima a procesar, tamaño, forma, partes aprovechables, lo que implica que los niveles de residuos sean distintos en cada caso (Hermida, 1993; Lázaro, 1994; Ostolaza, 1998).

2.3.1 Uso de los residuos orgánicos

Los residuos restantes que quedan tras el máximo aprovechamiento en la industria transformadora también se utilizan con otros fines: alimentación animal, fertilizante, obtención de productos comercializables (Lázaro, 1994; Hermida, 1993).

2.3.1.1 Carbohidratos

2.3.1.1.1 Definición y composición de los carbohidratos

Los carbohidratos son compuestos que contienen carbono, hidrógeno y oxígeno en las proporciones 6:12:6. Durante el metabolismo se queman para producir energía, y liberan dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O).

Los carbohidratos están sobre todo en forma de almidones y diversos azúcares. Estos compuestos pueden dividirse en tres grupos:

- **Monosacáridos:** (ejemplo: glucosa, fructosa, galactosa).
- **Disacáridos:** (ejemplo: sacarosa, lactosa, maltosa).
- **Polisacáridos:** (ejemplo: almidón, glucógeno (almidón animal), celulosa).

2.3.1.1.1.1 Monosacáridos

Los carbohidratos más sencillos son los monosacáridos o azúcares simples.

La glucosa, a veces también denominada dextrosa, se encuentra en frutas, patatas, cebollas y otras sustancias vegetales; es la sustancia en la que se convierten muchos otros carbohidratos, como los disacáridos y almidones.

La fructosa se encuentra en la miel de abeja y algunos jugos de frutas.

2.3.1.1.1.2 Disacáridos

La sacarosa es el nombre científico para el azúcar de mesa (el tipo que, por ejemplo, se emplea para endulzar el té). Se produce habitualmente de la caña de azúcar, pero también a partir de la remolacha. La sacarosa se halla también en las zanahorias y la piña. La lactosa es el disacárido que se encuentra en la leche humana y animal. Es mucho menos dulce que la sacarosa. La maltosa se encuentra en las semillas germinadas.

2.3.1.1.1.3 Polisacáridos

Los polisacáridos son químicamente los carbohidratos más complejos. Tienden a ser insolubles en el agua y sólo se pueden utilizar algunos para producir energía.

Se encuentra en los granos cereales, así como en raíces comestibles tales como patatas y yuca. El almidón se libera durante la cocción, cuando el calor rompe los gránulos. (Anónimo 3.,2005)

2.3.1.1.2 El almidón

2.3.1.1.2.1 Distribución y obtención.

El almidón es una reserva energética de las plantas y para nosotros un alimento. Se encuentra en forma de pequeños granos en muchas partes, u órganos constituyentes de las plantas, especialmente en semillas y tejidos vegetales embrionarios, en tubérculos de papa, semillas de arroz, maíz o trigo. Ellos sirven de nutrientes para el proceso germinativo y en general para el desarrollo de las plantas (Arteaga y Carballo, 2005). Además los almidones y sus derivados

tienen gran aplicación en diferentes ramas de la industria, tales como la alimentaria, textil y papelera.

Los almidones de distinta procedencia tienen características diferentes y distintivas en cuanto a forma, distribución de tamaños, composición y cristalinidad de los granos. En el caso de la papa, los gránulos de almidón se encuentran libres en el interior de la célula, de tal modo que su aislamiento es un proceso sencillo (Badui, 1996).

2.3.1.1.2.2 Estructura y propiedades de los gránulos de almidón

El almidón es una mezcla de dos glucanos; amilosa y amilopectina. La mayor parte de ellos contienen un 20 – 30 % de amilosa, y entre un 70 – 80% de amilopectina. Lo anterior se describe mejor en la tabla 3.

Tabla 3. Estructura y composición de varios gránulos de almidón

TIPO	AMILOPECTINA (%)	AMILOSA (%)	TEMPERATURA DE GELATINIZACION (°C)	TAMAÑO DEL GRÁNULO (micras)
Maíz	73	27	62-72	5 – 25
Papa	78	22	58-67	5 – 100
Trigo	76	24	58-64	11 – 41

(Badui, 1996).

2.3.1.1.2.3 Estructura de la amilosa

La amilosa se compone exclusivamente de cadenas de restos de α – D – glucopiranosilo unidas por enlaces (1→ 4). (Figura. 1)

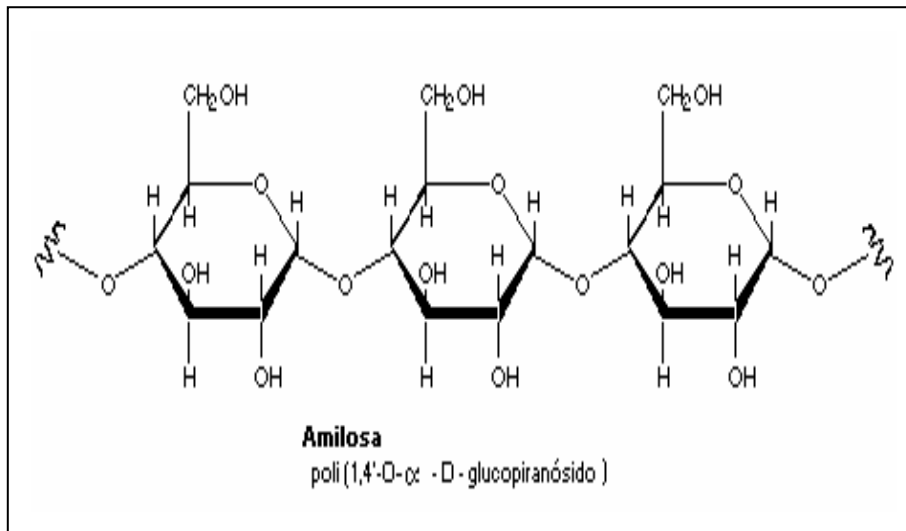


Figura 1. Estructura de la amilosa

2.3.1.1.2.4 Estructura de la amilopectina

La amilopectina es un glucano ramificado. (Figura. 2)

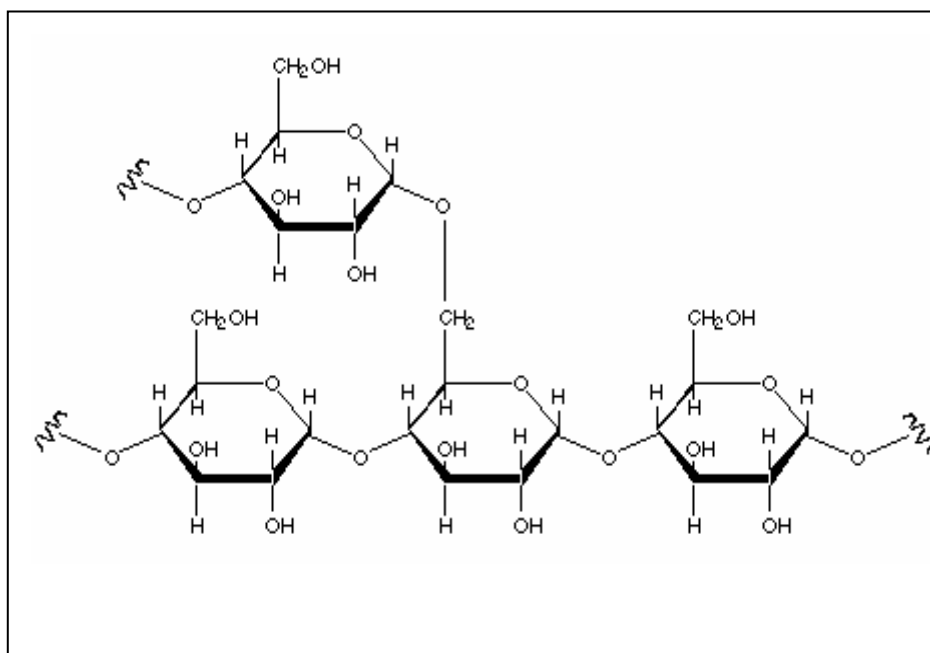


Figura. 2 Estructura de la amilopectina

Como promedio existe un punto de ramificación cada 15 – 30 restos de glucosa, si bien su reparto es bastante irregular. También la amilopectina forma dobles hélices ordenadas de forma paralela. La mayor contribución a la estructura cristalina de los gránulos de almidón proviene de la amilopectina. El peso molecular de la

amilopectina es muy elevado y por cada 400 restos de glucosa aproximadamente aparece uno de fosfato (Badui, 1996).

2.3.1.1.2.5 Distintos usos del almidón

El almidón es un importante aglutinante y espesante usado por ejemplo en sopas, salsas, alimentos infantiles, panadería, mayonesas. El almidón de maíz es el almidón comestible mas importante también como materia prima para la obtención de jarabe de almidón y de glucosa (Belitz y Grosch, 1997)..

La amilosa es útil para recubrimiento de frutas (dátiles, higos) y frutas desecadas o glaseadas, pues evita la adhesividad que normalmente poseen. La buena capacidad de formación de geles de amilosa dispersable la hace indicada para su uso en postres y salsas instantáneas (Belitz y Grosch, 1997)..

Las películas de amilosa se utilizan también para un mejor envasado de alimentos como cafés y té instantáneos (Belitz y Grosch, 1997)..

La amilopectina se utiliza extensamente como espesante, estabilizante y adhesivo (Belitz y Grosch, 1997).

2.3.1.1.2.6 Productos derivados del almidón

A partir de éste hidrato de carbono se obtienen distintos derivados, como la glucosa, dextrinas y los almidones modificados, todos ellos ampliamente usados en la elaboración de un gran número de alimentos e incluso en muchas otras industrias de productos no comestibles (Hermida, 1993), como por ejemplo el almidón de maíz; uno de los productos más importantes en la economía industrial de Estados Unidos. Se usa en la elaboración de papel, textiles, adhesivos, recubrimiento de superficies y

cientos de otras aplicaciones. Inclusive, se usa para recubrir la maquinaria de perforación en campos petroleros (Hefferson, 1999)..

Miles de productos industriales se obtienen del almidón del maíz o de almidones modificados, incluyendo la comida rápida, comida congelada y todo ese mundo que conforma la comida chatarra (Hefferson, 1999)..

Se considera a los almidones de maíz como materia prima para la elaboración de plásticos (Hefferson, 1999).

2.3.1.1.2.7 Bioproductos obtenidos a partir del almidón

Los bioproductos incluyen una gran variedad de mercancías refinadas a partir del almidón, reemplazando productos hechos de materia prima distinta o a través de síntesis química. El más conocido es el etanol, un aditivo de motores obtenido a partir de la fermentación del maíz. El etanol ha sido utilizado como aditivo de combustible de motores hace apenas 20 años (Hefferson, 1999)..

El etanol es hecho de la fermentación de azúcares del almidón.

Muchas refinerías de maíz producen tanto etanol como otros derivados del maíz: almidones, edulcorantes y aceites (Hefferson, 1999)..

En Estados Unidos el etanol como combustible está jugando un papel importante en el balance de pagos de ese país, pues evita importaciones de petróleo por unos 2 mil millones de dólares (Hefferson, 1999)..

La dextrosa, originada a partir de maíz fermentado, ha creado un grupo nuevo de bioproductos: ácidos orgánicos, aminoácidos, vitaminas y aditivos alimenticios (Hefferson, 1999)..

Los ácidos cítricos y lácticos, producidos de igual forma del maíz, pueden ser encontrados en cientos de productos alimenticios e industriales, y sirven como punto de partida para otros productos (Hefferson, 1999)..

Los aminoácidos de maíz también son parte de la alimentación industrial. La lisina obtenida a partir del maíz es utilizada en planteles industriales de cerdos y pollos como complemento alimenticio. Otros compuestos obtenidos del maíz que son añadidos a los piensos son la treonina y el triptófano (Hefferson, 1999)..

Las vitaminas C y E se derivan también del maíz. Y hasta aditivos como el glutamato monosódico proviene de la fermentación del maíz (Hefferson, 1999).

2.3.2 Enzimas empleadas en la hidrólisis y síntesis del almidón

Las enzimas empleadas pertenecen al grupo de las amilasas, las cuales son: α amilasa y glucoamilasa. La tabla 4 muestra sus fuentes más comunes.

Las amilasas han sido clasificadas de la siguiente manera (Hermida, 1993):

1. Por la configuración del carbón anomérico de sus productos.
2. El origen biológico
3. El tipo de ataque en el sustrato
4. Si producen una pendiente rápida en la viscosidad del sustrato (licuefacción) o una pendiente lenta (sacarificación)
5. El tipo de producto obtenido: D – glucosa, maltosa, maltotriosa.
6. La naturaleza de su estructura proteica.

Tabla 4. Fuentes de obtención de α Amilasas y Glucoamilasas

α AMILASAS
<i>Bacillus amiloliquefaciens</i>
<i>Bacillus licheniformis</i> (enzima termoestable, t_a óptima : 90°C.)
<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Aspergillus Níger</i>
Saliva humana
Páncreas porcino
Entre otras
GLUCOAMILASAS
<i>Aspergillus Níger</i>
<i>Rhizopus delegar</i>
<i>Rhizopus nivens</i>

(Belitz & Grosch, 1997)

2.3.2.1 α Amilasas

Son endoenzimas que catalizan la hidrólisis al azar de los enlaces α 1-4 glicosídicos de la región central de las cadenas de amilosa y amilopectina, a excepción de las cercanas a los puntos de ramificación (Robyt y Whelan, 1968)..

El modo de acción, propiedades y productos de degradación depende de la fuente de la enzima (Robyt y Whelan, 1968).

2.3.2.1.1 Acción de la α Amilasa

La acción de la α -amilasa en la porción de amilosa comienza en dos etapas: la primera, con una rápida degradación dando como resultado maltosa y maltotriosa, ya que ataca al azar al sustrato. Ocurre una rápida disminución de la viscosidad del gel de amilosa. La segunda etapa es mas lenta, ya que ocurre una hidrólisis lenta de los oligosacáridos provocando la formación de glucosa y maltosa (Zaborsky, 1973).

La hidrólisis de la amilopectina produce glucosa, maltosa, dextrinas límite y oligosacáridos conteniendo enlaces α -1, 6 glucosídicos. La mayor actividad de las amilasas ocurre en pH ácido de 4.5 – 7.0 (Whitaker, 1972).

2.3.2.2 Glucoamilasa

Las glucoamilasas liberan β -D- glucopiranososa de los extremos no reductores de la cadena de almidón, hidrolizando las uniones 1-4 y 1-6, estas últimas a menor velocidad, dando como productos de reacción: glucosa, maltosa y dextrinas (Barker and Fletewood, 1957).

Las dextrinas obtenidas de la licuefacción por alfa amilasas son rápida y totalmente convertidas a glucosa por la acción de la glucoamilasa (Barker and Fletewood, 1957)..

La glucoamilasa tiene su actividad óptima en pH de 4 – 5 y a una temperatura de 55 – 60°C en tiempos de más de 24 hrs.

Las dextrinas ramificadas son mucho menos susceptibles a la hidrólisis, debido a la baja velocidad que la glucoamilasa rompe los enlaces α (1 – 6) D-glucosídico, comparado con la velocidad a la que rompen los enlaces α -D- (1-4) (Barker and Fletewood, 1957).

El grado de transformación del almidón en glucosa se determina por el poder reductor del jarabe y se expresa como equivalentes de dextrosa. (Badui, 1996)

2.4 Ácidos orgánicos en general

2.4.1 Antecedentes

El uso de compuestos acidulantes en la conservación y mejora de propiedades organolépticas en alimentos es extenso. En particular, los ácidos que contienen uno o más carboxilos son aditivos alimentarios importantes. Estos ácidos, genéricamente denominados “ácidos orgánicos”, son intermediarios o productos terminales de ciclos metabólicos básicos por lo cual ocurren en una gran variedad de organismos vivos. Tales compuestos incluyen los ácidos cítricos, málico, láctico, acético, tartárico, fumárico y glucónico. Su producción se realiza mayoritariamente por métodos biológicos. (García; et al, 1999).

Los ácidos orgánicos tienen un uso muy amplio en la industria de los alimentos (Huerta, 2000).

2.4.2 Los ácidos orgánicos en la industria de alimentos

La incorporación de ácidos en alimentos cumple diversas funciones dependiendo de la aplicación particular. Tales aplicaciones se inscriben en la explotación de una o varias de las siguientes propiedades de los ácidos orgánicos, o sus sales (García; et al, 1999):

- Poder acidulante
- Capacidad amortiguadora o reguladora del pH
- Agente quelante de iones metálicos
- Emulsificante
- Efectos organolépticos

2.4.2.1 Uso específico de los ácidos orgánicos en la industria de alimentos

El principal uso de los ácidos orgánicos es la acidificación y control del pH en el producto final. Un pH bajo, retarda el crecimiento de microorganismos indeseables (principalmente bacterias) y aumenta la efectividad de conservadores como benzoatos y sorbatos. Asimismo, reduce la necesidad de tratamientos térmicos drásticos durante la esterilización de frutas y verduras enlatadas, o promueve la inactivación de enzimas indeseables. Un pH de 3 es indispensable para lograr una consistencia apropiada en geles de pectina, por lo cual los ácidos orgánicos son esenciales en la producción de conservas y jaleas de frutas. También pueden ensalzar o potenciar el sabor de un alimento dependiendo de sus propias características como saborizante y sus propiedades ácidas (García; et al,1999)..

Los ácidos tienen propiedades quelantes de iones metálicos. Estos iones son catalizadores de reacciones indeseables en alimentos como decoloración, rancidez, pérdida de nutrientes, etc. Consecuentemente, los ácidos orgánicos mejoran la protección producida por antioxidantes comunes como BHT (Butilhidroxitolueno), ascorbatos, etc. Por ejemplo, mezclas de ácido cítrico con antioxidantes son agregadas comercialmente a aceites, salchichas y carnes secas para prevenir rancidez. De igual manera, su uso durante el aprovechamiento de sangre en rastros retarda la coagulación al secuestrar iones de calcio esenciales en este fenómeno (García; et al,1999)..

En forma de sales, los ácidos moderan sabores ácidos extremos en bebidas carbonatadas y balancean el sabor amargo de edulcorantes artificiales. (García; et al,1999).

2.4.3 Ácido cítrico

2.4.3.1 Características generales

El ácido cítrico es un ácido tricarboxílico con 6 átomos de carbono el cual fue aislado inicialmente a partir del jugo de limón. Es un componente natural de muchas frutas cítricas (Scragg. A, 2004). (Figura 3)

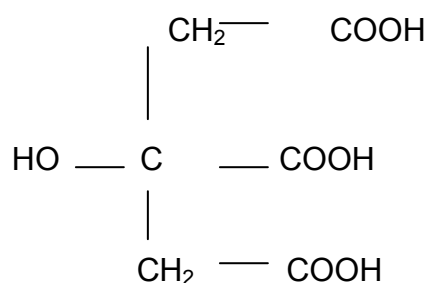


Figura 3. Estructura del ácido cítrico (García; et al, 1999).

El ácido cítrico, es sólido translucido o blanco. Se ofrece en forma granular; es inodoro, de sabor ácido fuerte, fluorescente al aire seco. Cristaliza a partir de soluciones acuosas concentradas calientes, con una molécula de agua, la cual se pierde cuando se calienta a 100°C, fundiéndose al mismo tiempo.

2.4.3.2 Historia del ácido cítrico

A partir del jugo de limón, Scheele logró aislar por primera vez en 1784 el ácido cítrico usando el proceso de cal-sulfúrico para separar el caldo que contiene ácido cítrico.

En 1860 comenzó a obtenerse el ácido cítrico de las frutas mediante el uso de sales de calcio. Este proceso tenía un rendimiento muy bajo. Eran necesarias de 30 a 40 toneladas de limones para obtener una tonelada de ácido cítrico.

En 1880 la compañía Pfizer fundada por los alemanes Charles Pfizer y Charles Erhart, comenzaron a fabricar ácido cítrico, utilizado por varias industrias, de ese tiempo, volviéndose de esta forma su producto mas importante.

En 1893 fue producido sintéticamente por Wehmer a partir de la fermentación de la glicerina.

Antes de que se desarrollaran los procesos microbianos la principal fuente de ácido cítrico eran los cítricos provenientes de Italia (limones con un contenido entre 6 y 7 %) y el citrato de lima. En 1917 debido a la imposibilidad de comprar limones italianos y citrato de lima, comienzan a experimentar otros métodos para obtenerlo (España, 2004).

2.4.3.3 Demanda y producción mundial

Aproximadamente el 70% del ácido cítrico producido se usa en la industria de alimentos y bebidas, el 12% en productos farmacéuticos y cerca del 18% para otros usos industriales. En la industria alimentaria se usa principalmente como acidulante debido a su alta solubilidad, su extremadamente baja toxicidad y su sabor agrio agradable.

El aumento de la demanda ha estimulado la creación de procesos mas eficaces. La demanda actual es de casi 220 000 toneladas métricas por año. Estados Unidos es el principal productor (180 000 toneladas por año) con Pfizer y Miles Lab Inc., como las compañías mayores. (Scragg. A, 2004) Aparte de Estados Unidos

este aditivo se fabrica en más de 20 países. La Unión Europea y China son los otros dos restantes con mayor producción a nivel mundial.

Recientemente, se observó un aumento importante en la capacidad productiva de Europa Oriental y del Lejano Oriente, particularmente en China. China produce proporcionalmente menor volumen de ácido cítrico de alta calidad, es decir, purificado y refinado. Sin embargo, su capacidad de elaboración del producto crudo representa el 24% del total mundial (España, 2004).

2.4.3.4 El consumo

La expansión de la demanda mundial de ácido cítrico se debe, fundamentalmente, a su uso como aditivo en la industria de alimentos y bebidas. Por ejemplo, en Estados Unidos este sector demanda el 72% del total.

El consumo de ácido cítrico en el mundo crece a razón de 5-8% anual y la tendencia parece mantenerse estable. (Figura 4)

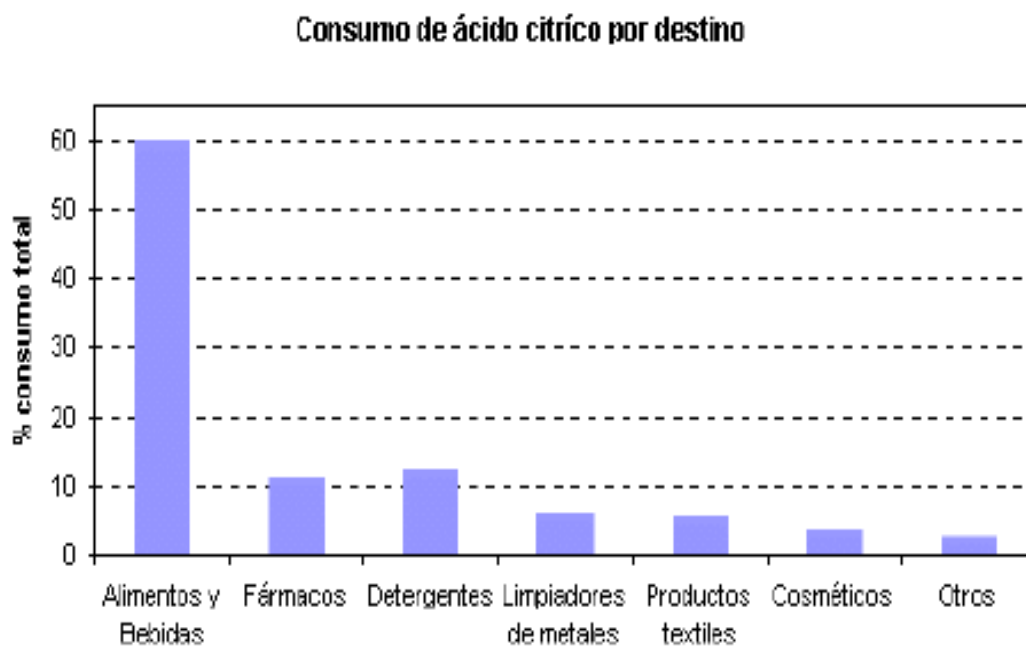


Figura 4. Consumo de ácido cítrico por destino (España, 2004)

2.4.3.5 Usos del ácido cítrico

Las aplicaciones del ácido cítrico (tabla 5) en los diferentes sectores es muy amplia y variada mas en la industria de los alimentos. Su amplia aceptación resulta en un constante desarrollo de nuevos usos y formulaciones. (García; et al, 1999).

Tabla 5. Usos del ácido cítrico en los diferentes sectores de la industria a nivel mundial.

Industria	Área	Usos
De bebidas Alimentaria	General Vino Bebidas carbonatadas Confección Alimentos congelados Productos lácteos	-Saborizante -Conservador -Eliminador de turbidez -Previene el deterioro -Previene la turbidez -Inhibe la oxidación -Sabor "Fresco" -Ayuda a la carbonatación -Saborizante -Antioxidante -Mejoramiento del color -Regulador del pH -Inactiva metales traza -Emulsionador
Farmacéutica		-Disolvente y saborizante -Efervescencia
De cosméticos Otras		-Antioxidante y sinérgico -Recubrimiento electrolítico de metales, tratamiento de agua de calderas -En detergentes -Curtido -Textiles

(Scragg, 2004)

2.4.4 Alternativas para la producción de ácido cítrico

2.4.4.1 Obtención de ácido cítrico por fermentación

En la actualidad, el ácido cítrico se produce mediante fermentaciones fúngicas. Aunque existe la síntesis química no se ha creado, ningún proceso comercial basado en ella, que sea más eficaz que las fermentaciones (Scragg, 2004).

Aunque se han seleccionado un gran número de bacterias, levaduras y hongos superiores para la producción de ácido cítrico, *Aspergillus niger* ha sido el organismo de elección por casi 80 años (Scragg, 2004). Para la producción comercial de ácido cítrico solamente se usan cepas mutantes de *Aspergillus niger* ya que son las que más cantidad producen por unidad de tiempo. También se pueden producir productos laterales no deseados como ácido oxálico, ácido isocítrico y ácido glucónico pero la síntesis de éstos compuestos es fácilmente suprimible por las cepas mutantes. (Huerta, 2000).

2.4.4.2 Producción fúngica de ácido cítrico

En 1917, Currie reportó la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* desarrollado en medios con azúcares a pH bajo. A pH alto, *A. niger* produce ácido oxálico.

Las razones del dominio de *A. niger* sobre otros organismos son (Scragg, 2004):

1. facilidad de manejo;
2. el uso de la materia prima, barata como substrato;

3. rendimientos altos y consistentes;
4. económicamente convenientes.

2.4.5 Género *Aspergillus*

2.4.5.1 Características generales

Los *Aspergillus* son mohos muy abundantes. Algunas especies intervienen en las alteraciones que experimentan los alimentos, mientras que otros son de utilidad para preparar determinados alimentos. Raper y Fennell distinguen dieciocho grupos de *Aspergillus* y admiten 132 especies. (Frazier y Westhoff, 1993)

Los mohos de esta especie crecen bien en concentraciones elevadas de azúcar y de sal y, por lo tanto, en muchos alimentos con escaso contenido de humedad. Los conidios de las especies de mohos de este grupo tienen un cierto tinte verde, y sus ascosporas se encuentran dentro de ascas cuyos peritecios tienen un color que varía desde amarillo a rojizo. Algunos autores incluyen a estos mohos en el género *Eurotium* de los *Ascomycetes*, denominación reservada para designar a los representantes que tienen una fase perfecta (sexual).

Si bien es cierto que algunos géneros de *Aspergillus* intervienen en la alteración de muchos tipos de alimentos, determinados géneros de los mismos son útiles en la elaboración de ciertos alimentos o componentes de los mismos (Frazier y Westhoff, 1993). Además ofrecen ventajas para ser utilizados en la obtención de enzimas a nivel industrial, sobresalen: alto nivel de producción, la facilidad del cultivo, y el que sus productos sean considerados “GRAS” (generally regarded as safe), lo que

permite que se utilicen en la industria de alimentos tanto para el hombre, como para animales (Gretty y Marcel, 2003).

2.4.6 *Aspergillus niger*

2.4.6.1 Morfología

Las cabezas esporales son grandes, muy próximas unas a otras, y de forma esférica, pudiendo tener color negro, negro parduzco o pardo morado. Los conidios son rugosos con bandas de pigmento. Algunas cepas poseen esclerocios de un color variable desde el color gris al negruzco (Frazier & Westhoff, 1993)..

2.4.6.2 Propiedades Fisiológicas

2.4.6.2.1 Necesidad de Humedad

En comparación con la mayoría de las levaduras y de las bacterias, *Aspergillus* necesita menor cantidad de humedad disponible; entre un 14 y 15% impedirá o retardará su crecimiento (Frazier & Westhoff, 1993)..

2.4.6.2.2 Necesidad de temperatura

Su temperatura optima de crecimiento se encuentra entre de 25 a 30° C (Frazier & Westhoff, 1993).

2.4.6.2.3 Necesidad de oxígeno y de pH

Los mohos son aerobios, es decir, necesitan oxígeno para crecer; esto es cierto por lo menos en los que crecen en la superficie de los alimentos como es el caso de *Aspergillus* (Frazier & Westhoff, 1993)..

Crece mejor a un pH ácido entre 3.5 a 4.5 (Frazier & Westhoff, 1993).

2.4.6.2.4 Necesidades nutritivas

Son capaces de utilizar muchos tipos de alimentos, que van desde sencillos hasta complejos (Frazier & Westhoff, 1993). Distintas fuentes de carbono se utilizan industrialmente para su desarrollo que incluyen glucosa, sucrosa, jugo de caña, almidón, y melazas de caña y de remolacha. (Scragg, 2004).

2.4.7 Ruta bioquímica para la obtención de ácido cítrico

El ácido cítrico es un intermediario estándar del ciclo TCA (Ciclo de los ácidos tricarboxílicos) y se produce como un producto de exceso debido a una operación incorrecta del mismo . (Scragg, 2004).

Dos enzimas claves son importantes en la fermentación del ácido cítrico, la aconitasa y la isocitrato deshidrogenasa. Las actividades de estas enzimas disminuyen a niveles muy bajos durante la etapa de producción, en tanto que aumenta la actividad de la citrato sintasa (Scragg, 2004).

Puesto que para la síntesis del ácido cítrico se necesita la condensación de una unidad de acetilo con oxalacelato, es necesario generar aceptor suficiente (oxalacelato) para que la producción continúe. (Scragg, 2004).

La síntesis del ácido cítrico (Figura 5) se puede dar mediante cuatro vías o reacciones esenciales que son:

1. La carboxilación directa del piruvato catalizada por la enzima málica, esta reacción produce malato, el cual se oxida fácilmente a oxalacelato;
2. La carboxilación del piruvato catalizada por el piruvato carboxilasa;
3. La carboxilación del fosfoenilpiruvato (PEP) catalizada por la PEP carboxicinasa;
4. La vía global del glioxalato que utiliza las enzimas claves isocitrato liasa y malato cintasa.

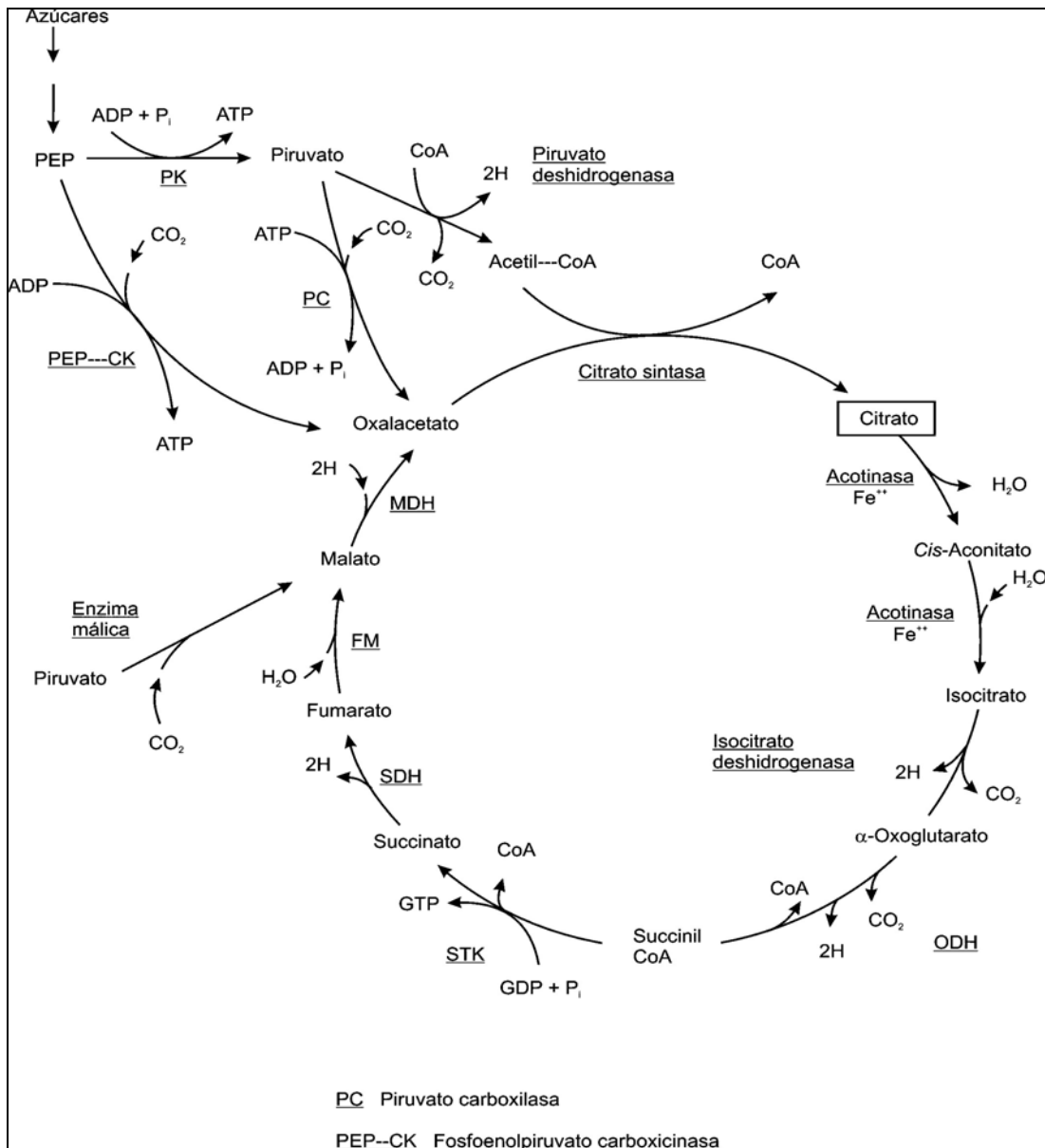


Figura 5. Ciclo del ácido cítrico

2.4.8 Tipo de fermentaciones para la obtención de ácido cítrico

Hay dos técnicas básicas de procesos de fermentación para el ácido cítrico (Scragg, 2004):

1. Cultivo de estacionario o de superficie;
2. Cultivo sumergido

2.4.8.1 Cultivo de superficie

Se permite que un medio estéril con azúcar fluya en recipientes de acero inoxidable o de aluminio, arreglados en fila en cámaras de fermentación estériles. El medio se inocula con esporas de *A. niger* a una temperatura constante de 28-30° C durante 8-12 días. El organismo crece y se extiende sobre la superficie acidificando el medio (Scragg, 2004).

El cultivo superficial tiene la ventaja de ser simple en su operación y menos sensible a variaciones ambientales que el cultivo sumergido. Sin embargo, las bajas productividades tienden a ser obsoleta esta técnica (García; et al, 1999).

2.4.8.2 Proceso sumergido

Este es el principal proceso en uso en el que se inocula el medio seguido por la agitación y aeración vigorosas y controladas en fermentadores. El periodo de fermentación se reduce bastante (3-5 días) a 25-30° C (Scragg, 2004).

La técnica de cultivo sumergido es mas eficiente y menos intensa en mano de obra que el de superficie pero requiere de un monitoreo constante y un control preciso (García; et al, 1999).

2.5 Biocatalizadores inmovilizados

2.5.1 Definición

La inmovilización se puede definir como el proceso por el cual el movimiento de enzimas o células, se ve restringida total o parcialmente en el espacio, dando lugar a una forma de célula insoluble en el agua.

Estas células se encuentran soportadas o ligadas a una matriz. Un ejemplo claro se encuentra en el suelo donde existen enzimas inmovilizados naturales, durante la putrefacción de una planta, animal o microbio, que se absorben en las partículas del suelo, y células inmovilizadas en forma de partículas de micelio naturales (Wiseman, 1985).

2.5.2 Células inmovilizadas

Este tipo de sistema con células inmovilizadas comenzó a aplicarse desde los años 70.

2.5.2.1 Ventajas y desventaja de la inmovilización celular

2.5.2.1.1 Ventajas

- Las fermentaciones en lote se pueden reemplazar por reacciones continuas.
- Las células inmovilizadas permiten el uso de una densidad celular considerablemente mayor, con lo que se logra la intensificación del proceso (Scragg, 2004).

2.5.2.1.2 Desventajas

- A menudo el sistema celular completo es menos sensible a cambios en las condiciones de operación como el pH.
- Impone barreras disfuncionales adicionales (pared celular) de modo que se puede requerir de la permeabilización de las células. En este caso, puede ser difícil el mantenimiento de la integridad celular (Scragg, 2004).

2.5.3 Características que deben cumplir los métodos de inmovilización para ser aplicados

Los métodos para inmovilizar células deben reunir los siguientes criterios (Scragg, 2004):

1. Debe ser seguro. El enorme costo para la determinación de la seguridad de un producto significa que se debe evitar el uso de reactivos químicos novedosos y se debe usar materiales aceptables para su aplicación en alimentos.
2. El proceso no debe ser complicado, puesto que el uso de soportes caros y procedimientos largos aumentará los costos del proceso.
3. Debe ser suave a fin de mantener la viabilidad celular, la integridad de la membrana o la actividad enzimática.
4. Debe tener larga duración en lo que respecta al soporte y la actividad celular, puesto que llenar de nuevo un reactor celular resulta caro.

5. La actividad celular se debe mantener tanto como sea posible. Esto implica la unión firme de las células al fin de evitar mermas por fuga de células, pero no tan extrema como para provocar restricciones disfuncionales.
6. Debe ser barato.

2.5.4 Características de las células inmovilizadas

La inmovilización generalmente aumenta la estabilidad de la actividad enzimática dentro de las células inmovilizadas. Sin embargo, en muchos casos la actividad de estas células es menor que la actividad de las células suspendidas debido a la naturaleza heterogénea del sistema. En una cama o película habrá reducción de sustrato hacia el centro de la cama o la base de la película. El transporte de masa interno del sustrato, nutrientes o producto, será afectado por la carga de la cama, que en todos los casos reducirá la actividad (Scragg, 2004).

2.5.5 Métodos de inmovilización celular

Los métodos usados para inmovilizar células (tabla 6) son en general de dos tipos: unión a soportes insolubles y atrapar o captura.

Tabla 6. Métodos de inmovilización de células

Unión	
• Sin soporte	Agregación o formación de flóculos
• Con soporte	Unión covalente
	Adsorción para la formación de biopelículas
Captura	
	Formación de biopelículas
	Polímero orgánico
	Polímero inorgánico
	Membrana semipermeable

(Scragg, 2004)

2.5.5.1 Inmovilización sin soporte

Algunos organismos tienden a formar agregados o flóculos en cultivos en suspensión, por ejemplo, ciertas cepas de levaduras. Las condiciones del medio, como la adición de polielectrólitos, pueden producir agregación.

Las esporas de hongos y bacterias también se pueden considerar como contenedores estabilizantes de muchas enzimas.

Las paredes celulares de los organismos contienen grupos amino y carboxilo libres que pueden entrecruzarse usando reactivos como el glutaraldehído.

2.5.5.2 Absorción

Muchos microorganismos tienden a adherirse a superficies sólidas en la naturaleza. Esta capacidad para formar películas se ha usado en el tratamiento de

aguas negras. Algunas células de mamíferos son dependientes de anclaje y requieren para crecer camas o portadores hechos de dextranos, celulosa o colágena.

También se han usado como soportes ciertos portadores inorgánicos como el vidrio, cerámica y óxidos metálicos. (Tabla 7)

Tabla 7. Algunos materiales usados para absorber células

Soporte	Tipo de célula	Producto
Intercambiador de iones básico, aniónico	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanol
Astillas de madera	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanol
Cerámica	<i>Acetobacter</i>	Ácido acético
Vidrio poroso	<i>Saccharomyces carlbergensis</i>	Cerveza
Vidrio poroso	<i>E.coli</i>	Metano
Colchones de fibra de vidrio	<i>Zymomonas mobilis</i>	Biomasa
	<i>Pseudomonas sp.</i>	Etanol

(Scragg, 2004)

2.5.5.3 Captura

La captura de células en una red tridimensional de polímero es un método muy popular. Se han usado polímeros similares a los utilizados con las enzimas para atrapar células completas, como poliacrilamida, poliuretano, colágena y gelatina (Scragg, 2004).

2.5.6 Tipos de soportes para la inmovilización

Como soportes de inmovilización se emplean una gran variedad de compuestos naturales o sintéticos, orgánicos o inorgánicos, que difieren en tamaño forma densidad o porosidad, y que se utilizan en forma de laminas, tubos, fibras, cilindros, o, mas popularmente esferas.

El tamaño de partícula del soporte es un factor crucial puesto que determina la extensión de las restricciones de difusión de la actividad celular (Wiseman, 1985).

2.5.6.1 Tipos de soportes inorgánicos

- Naturales: arena, silicatos, arcillas.
- Sintéticos: vidrios con porosidad, cerámicas (Anónimo.4, 2005).

2.5.6.2 Tipos de soportes orgánicos

- Naturales: pedazos de madera, antracita, colágeno, celulosa, alginatos, carragenatos, albúmina.
- Sintéticos: PVC, polipropileno, poliacrilamida, resinas de intercambio iónico, epóxidos, poliuretanos. (Anónimo.4, 2005)

2.6 Uso de *Opuntia imbricata* como soporte orgánico

2.6.1 Género *Opuntia*

Se encuentra en un amplio rango de ecosistemas semiáridos con flora y fauna diversos en el Norte de México, ampliamente distribuida en comunidades específicas llamadas nopaleras y esta representado por 104 especies (López; et al, 1997).

2.6.1.1 Valor nutricional

El uso de *Opuntias* como alimento para animales domésticos y silvestres ha sido muy importante en las regiones áridas y semiáridas del Norte de México durante siglos. Constituye la principal fuente de agua y fibra en los sistemas de producción tradicionales, particularmente durante la época seca de invierno y primavera. *Opuntia* es un ingrediente clave para suplementar la dieta de los animales domésticos (López; et al, 1997).

2.6.2 *Opuntia imbricata* (*Nopal coyonoxtle, xoconoxtle, cardenche o choya*)

2.6.2.1 Características generales

Este tipo de especie exhibe una gran variabilidad y se encuentra ampliamente distribuida en los estados de Coahuila, Zacatecas, San Luis Potosí, Chihuahua, Aguascalientes, Durango, Jalisco y Guanajuato. Crece bien en suelos relativamente pobres y es una planta invasora típica de pastizales. Usado como forraje de cabras y ovejas, debido a su contenido de fibra, resultado obtenido según análisis

bromatológicos que muestran un 7.81% en base a materia seca (López; et al, 1997).

(Figura 6)



Figura 6. *Opuntia imbricata* (Nopal coyonoxtle, xoconoxtle, cardenche o choya)

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de la investigación se llevaron a cabo las siguientes etapas:

3.1 ETAPA 1. Proliferación del microorganismo

Durante la presente investigación se trabajó con una cepa de *Aspergillus niger unigras* 0007 ASP HSA, la cual fue proporcionada por el Departamento de Fitomejoramiento de la UAAAN, misma que se propagó en medio de cultivo Czapeck-dox, y se incubó durante 72 horas a 35° C. Posteriormente se mantuvo en refrigeración, con resiembras a intervalos de un mes durante el desarrollo del trabajo.

3.1.1 Inducción del microorganismo

Una vez proliferado el microorganismo se procedió a la inducción del mismo. Se utilizó caldo conteniendo las sales formuladas en el medio de cultivo Czapeck-dox, las cuales son: NaCl, NH₄PO₄, (NH₄)₂SO₄, MgCl₂, KCl, CuCl₂ y sacarosa como única fuente de carbono; se incubó durante 72 horas a 35° C, hasta la observación macroscópica del micelio y enseguida se realizó su estudio microscópico mediante un microcultivo (Iliná, 2002); la operación fue repetida, variando la fuente de carbono en el medio de cultivo como se indica en la tabla 8 hasta tener al almidón como única fuente de carbono.

Tabla 8. Adaptación del microorganismo a diferentes concentraciones de sacarosa y almidón

Fuente de carbono		
	Sacarosa %	Almidón %
1er. cultivo	100 %	0 %
2do.cultivo	75 %	25 %
3er.cultivo	50 %	50 %
4to.cultivo	25 %	75 %
5to.cultivo	0 %	100 %

3.2 ETAPA 2. Fermentación

3.2.1 Preparación del medio

Para la preparación del medio se utilizó almidón natural de papa , el cual fue extraído mediante procesos de licuado y filtrado. Se utilizaron 2 papas con un peso aproximado de 230g cada una, las que se adquirieron en un supermercado de la localidad, las cuales fueron licuadas con 1000 ml de agua destilada. Se filtró para eliminar residuos no deseados, fibras principalmente; el medio fue ajustado y adicionado con sales para tener la constitución mostrada en la tabla 9, conteniendo almidón como única fuente de carbono.

Tabla 9. Sales contenidas en 1000 ml de medio Czapeck-dox, con almidón como única fuente de carbono

Ingrediente	Gramos
Almidón	30
NaCl	10
NH ₄ PO ₄	4
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
MgCl ₂	0.2
KCl	0.2
CuCl ₂	0.1

El pH del medio de cultivo se ajustó entre 3.5 y 4.0. Posteriormente fue esterilizado en autoclave a 120° C y 15 lbs de presión por 20 minutos.

3.2.2 Inoculación y monitoreo de la fermentación

Los matraces, previamente esterilizados, se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se prepararon por separado 3 matraces con un inóculo de 2×10^6 esporas/ml, adaptado a consumir almidón como única fuente de carbono. Una vez obtenido el medio inoculado, se sometió a agitación constante con los matraces sumergidos, en baño maría a una temperatura controlada de 31° C y se procedió a muestrear cada 24 horas, durante 6 días. Se realizaron mediciones de: pH, por medio de un potenciómetro HANNA Modelo HI991001; almidón por el método espectrofotométrico (Fernández; et al, 2000); azúcares totales utilizando fenol-sulfúrico (Dubois; et al, 1956) y ácido cítrico por el método piridina-anhídrido acético (Saffran; et al).

3.3 ETAPA 3. Fermentación mediante sistema inmovilizado de células.

3.3.1 Preparación del soporte

Se utilizó como soporte tallos secos de coyonoxtle (*Opuntia imbricata*), a las que se les quitó la cáscara y se cortaron a un diámetro de 7cm. Posteriormente se sometieron a esterilización para eliminar cualquier tipo de microorganismo ya existente en su interior.

3.3.2 Preparación del medio e inmovilización

Para la inmovilización del microorganismo se preparó medio con almidón modificado como única fuente de carbono, conteniendo las sales en las cantidades indicadas en la tabla 9. El medio se esterilizó a 15 lbs de presión durante 20

minutos. Posteriormente se procedió a introducir el soporte, previamente esterilizado, dentro de los matraces y a la inoculación de 2×10^6 esporas/ml.

La muestra se mantuvo en agitación constante con los matraces sumergidos en baño maría, a una temperatura controlada de 31° C, durante 4 días, a fin de permitir la formación de la biopelícula sobre el soporte.

3.3.3 Fermentación usando microorganismos inmovilizados

Una vez formada la biopelícula, se procedió a preparar el medio para la fermentación como se describió durante la etapa 2, y se monitoreó de la misma manera, teniendo como única variable el uso del soporte con la biopelícula formada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ETAPA 1 Proliferación del microorganismo

Transcurrido el tiempo de incubación, se pudo observar que el microorganismo (cepa de *Aspergillus niger unigras* 0007 ASP HSA) proliferó rápidamente en el medio como se puede observar en la figura 7.

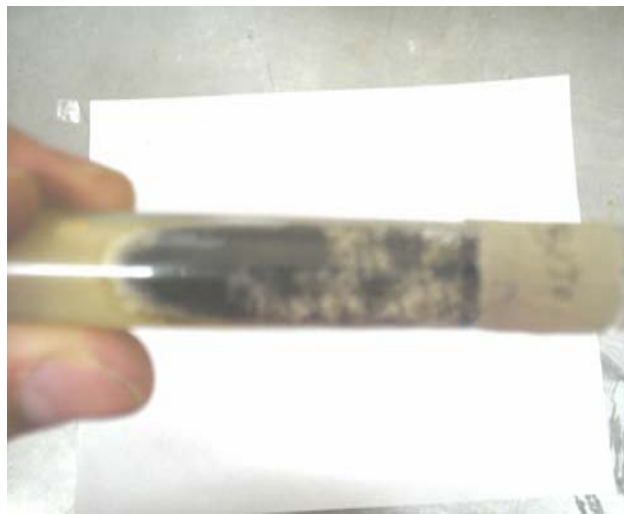


Figura 7. Proliferación de *Aspergillus niger* en medio Czapeck-dox.

4.1.1 Inducción del microorganismo

Durante las diferentes resiembras que se realizaron para lograr la inducción del microorganismo; partiendo de sacarosa como sustrato hasta llegar a almidón como única fuente de carbono, se pudo observar el crecimiento de esporas en cada uno de los cultivos. La figura 8 muestra el crecimiento de *Aspergillus niger* del: a. primer cultivo con sacarosa, b. tercera siembra con una concentración sacarosa/almidón 1:1, c. ultimo cultivo, en el que se utilizó solamente almidón, como fuente de carbono, cabe mencionar que el cultivo conteniendo la relación 75-25 sacarosa almidón tubo que ser repetida 2 veces debido a la ausencia de crecimiento.

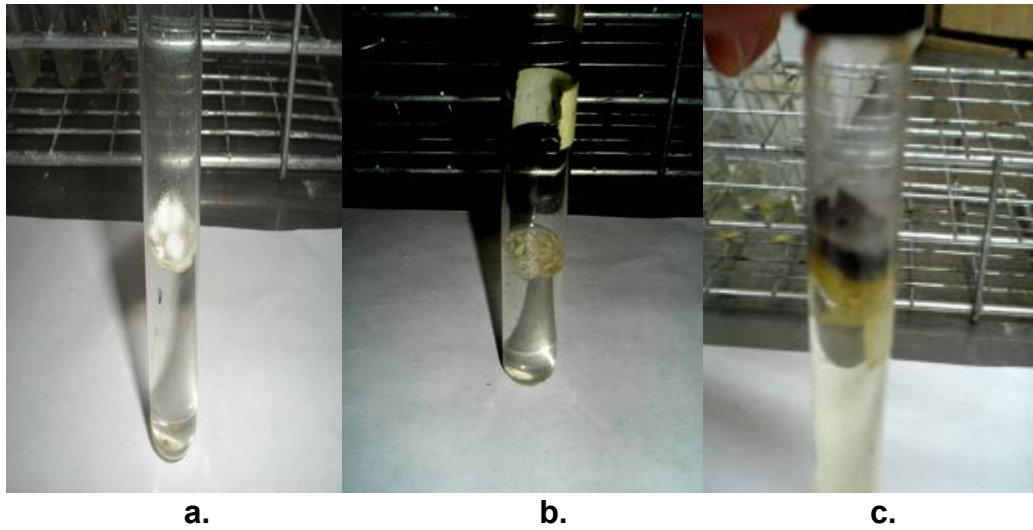


Figura 8. Crecimiento de esporas de *Aspergillus* en el primer, tercer y quinto cultivo.

Se puede observar en la figura 8 el crecimiento notable de la formación de esporas en el medio durante los diferentes cultivos realizados, hasta llegar a la observación clara del micelio, el cual contenía almidón como única fuente de carbono. Seguidamente se realizó un estudio microscópico de la cepa de *Aspergillus* mediante un microcultivo, para poder apreciar sus caracteres morfológicos; tal y como se presenta en la figura 9.



Figura 9. Observación microscópica de *Aspergillus niger*.

4.2 ETAPA 2. Fermentación

4.2.1 Preparación del medio

Se obtuvo un medio de cultivo con las características descritas en el capítulo de materiales y métodos.

4.2.2 Inoculación y monitoreo de la fermentación

Una vez inoculados los matraces se realizó un monitoreo de los mismos para evaluar los siguientes parámetros: almidón, azúcares totales, ácido cítrico y pH.

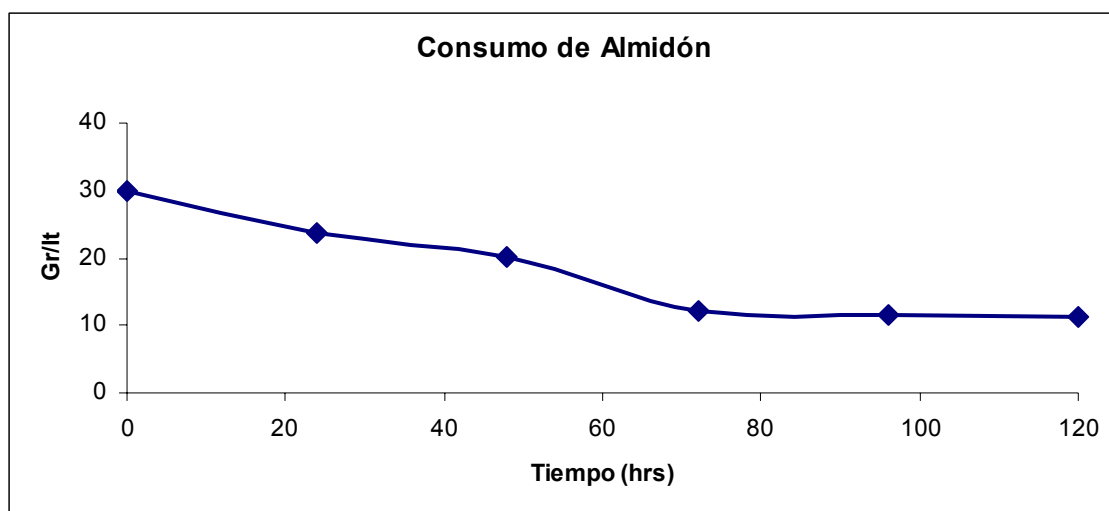


Figura 10. Monitoreo y consumo de almidón.

En la figura 10 se muestra el consumo de almidón partiendo de el tiempo 0 con una concentración inicial de 30 g/lit de almidón, hasta llegar a su consumo máximo a las 72 horas aproximadamente, manteniéndose estable hasta las 120 horas, con una concentración final de 11.24 g/lit de almidón. El consumo total fue de 18.76 g/lit con un rendimiento total del 62.52%. Estos resultados se asemejan a trabajos presentados anteriormente por (Prado; et al, 2005) donde reportan un consumo máximo del almidón a las 72 horas, utilizando bagazo de yuca como sustrato para la fermentación de ácido cítrico en estado sólido.

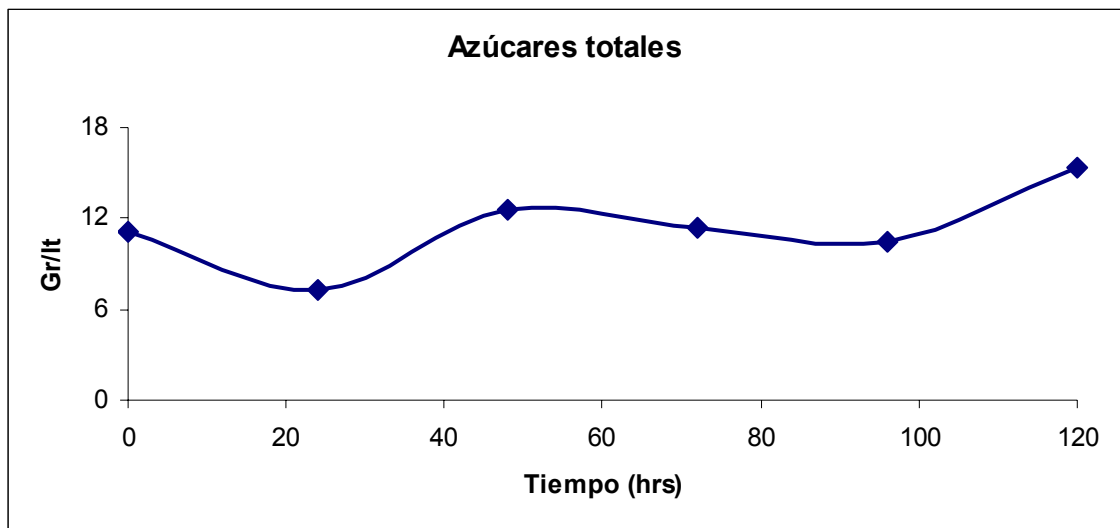


Figura 11. Monitoreo y consumo de azúcares totales.

En la figura 11 se muestra el consumo de azúcares totales, donde se evidencian los ciclos de degradación y consumo del sustrato (almidón). El consumo de azúcares se demuestra en los decrementos, los cuales son ocasionados por la creciente población microbiana, y los incrementos que se puedan observar en la figura mencionada, son ocasionados por la actividad enzimática propia de la degradación del sustrato por el mismo microorganismo. Estos resultados concuerdan con estudios realizados por (Tirado y Ortiz, 2005) en la obtención de carotenoides mediante biocatálisis fúngica ; donde atribuyen este comportamiento a la producción de enzimas extracelulares que son liberadas por el microorganismo para poder consumir el sustrato e integrarlo a la célula para su posterior metabolismo.

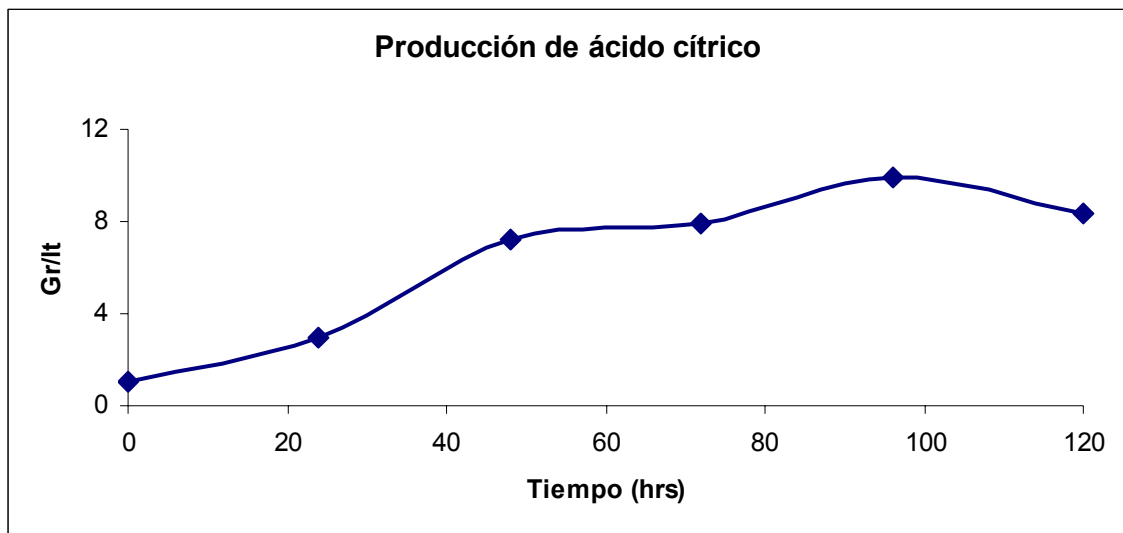


Figura 12. Producción de ácido cítrico.

En la figura 12 se observa el incremento en la producción de ácido cítrico, desde las 24 horas, donde es baja, seguido de este intervalo de tiempo se obtiene una producción significativa del ácido en el medio hasta las 96 horas donde alcanza su punto máximo de producción, seguido de un decremento que puede ser atribuible a lo descrito por (Desrosier, 1997) el cual menciona que el microorganismo para obtener sus nutrientes y completar su metabolismo primero ataca los sustratos mas simples como son los azúcares, después los alcoholes hasta llegar a consumir ácidos orgánicos. Los resultados obtenidos en la figura se asemejan a trabajos realizados por (González; et al, 2005) reportando que la producción de ácido cítrico alcanza un valor máximo entre las 72 y 96 horas de fermentación, utilizando sacarosa como fuente de carbono.

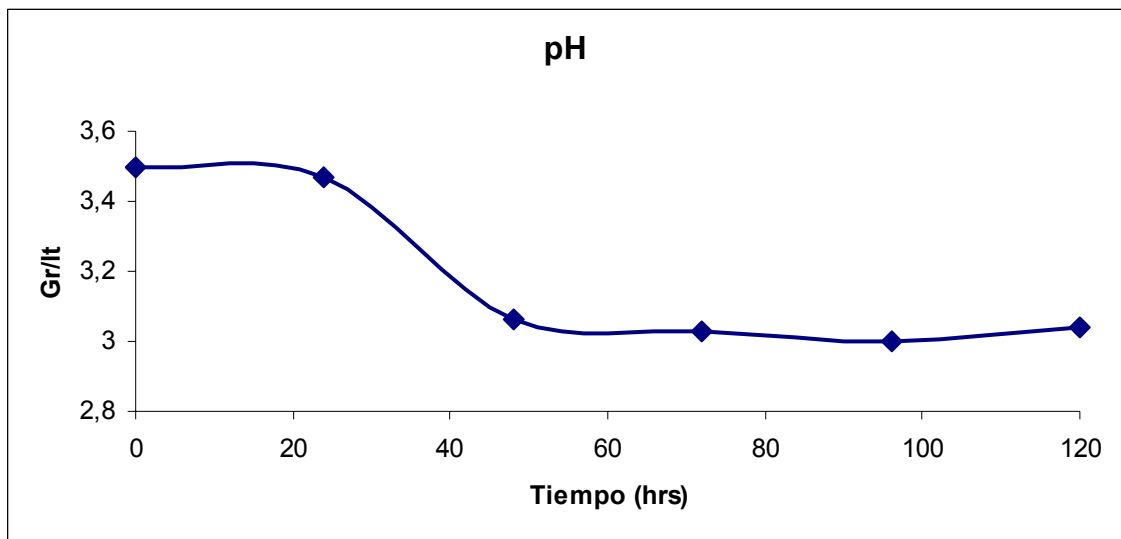


Figura 13. Resultados del monitoreo del pH cada 24 horas.

Se puede observar en la figura 13 que el pH del medio de las 0 a las 24 horas, tiene una ligera disminución con un posterior decremento acelerado alrededor de las 24 y 48 horas, ocasionado por el incremento de la acidez en el medio en la etapa de producción del ácido cítrico, posteriormente el pH se mantiene hasta finalizar las 120 horas. El comportamiento del pH en el medio durante la fermentación concuerda con lo descrito por (Scragg .A, 2004), donde menciona que la etapa de crecimiento requiere un pH ligeramente mayor que la etapa de producción. Durante está, a menudo se permite que el pH disminuya puesto que los hongos pueden tolerar acidez considerable.

4.3 ETAPA 3. Fermentación mediante sistema inmovilizado de células.

4.3.1 Preparación del soporte

Antes de someter al microorganismo a la inmovilización, fue necesario que el soporte tuviera la constitución deseada para lograr la fijación requerida de las células, por lo cual se procedió a preparar el soporte mediante las características descritas en el capítulo 3 de materiales y métodos. La figura 14 muestra la constitución final del soporte previa a la inmovilización de las células.



Figura 14. Constitución final del soporte previo a la inmovilización.

4.3.2 Preparación del medio e inmovilización

El medio fue preparado mediante las características ya descritas anteriormente, utilizando como soporte al tallo de coyonoxtle para la formación espontánea de la biopelícula dentro del medio como se puede observar en la figura 15.

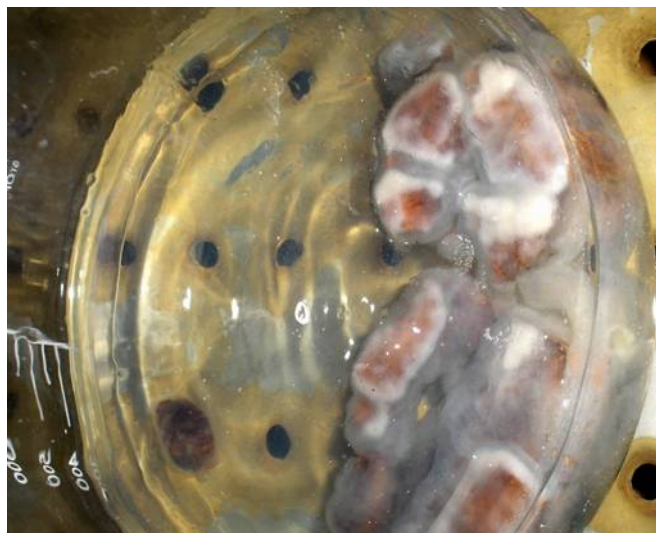


Figura 15. Formación de biopelícula en el soporte.

4.3.3 Fermentación usando microorganismos inmovilizados

Una vez formada la biopelícula, se preparó nuevamente medio para la fermentación y se monitorearon nuevamente los parámetros descritos en la etapa 2.

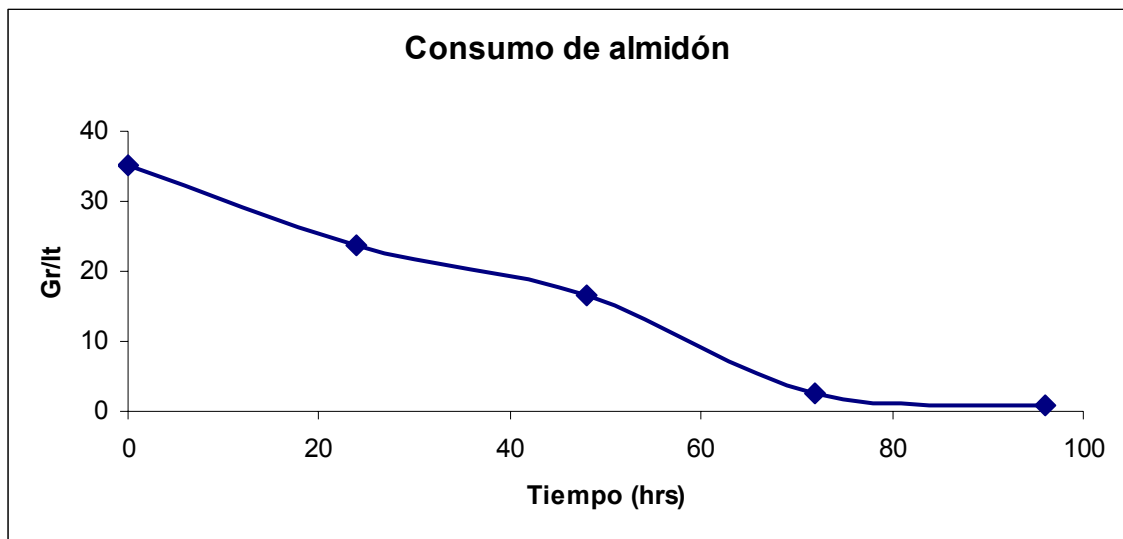


Figura 16. Monitoreo y consumo de almidón.

En la figura 16 se puede observar el consumo de almidón partiendo de el tiempo 0 con una concentración inicial de 35 g/lit de almidón, hasta llegar a su consumo máximo a las 72 horas aproximadamente, manteniéndose estable hasta las 96 horas, con una concentración final de 0.82 g/lit de almidón. El consumo total fue de 34.18 g/lit con un rendimiento del 97.67%. Este resultado presenta el mismo comportamiento observado en la figura 10 con respecto al consumo máximo del almidón a las 72 horas y nuevamente concuerda con las referencias de los autores ya mencionados en dicha figura. Se puede observar que el consumo de almidón fue más acelerado en la figura 16 durante los diferentes intervalos de tiempo atribuible a la estabilidad celular del microorganismo en la fijación de células al soporte lo que incrementa una mayor formación de células y un consumo acelerado de sustrato; lo cual concuerda con lo descrito por (Wiseman, 1985) donde menciona que la estabilidad de las enzimas o de las células aumenta por inmovilización y/o la concentración de enzima se eleva.

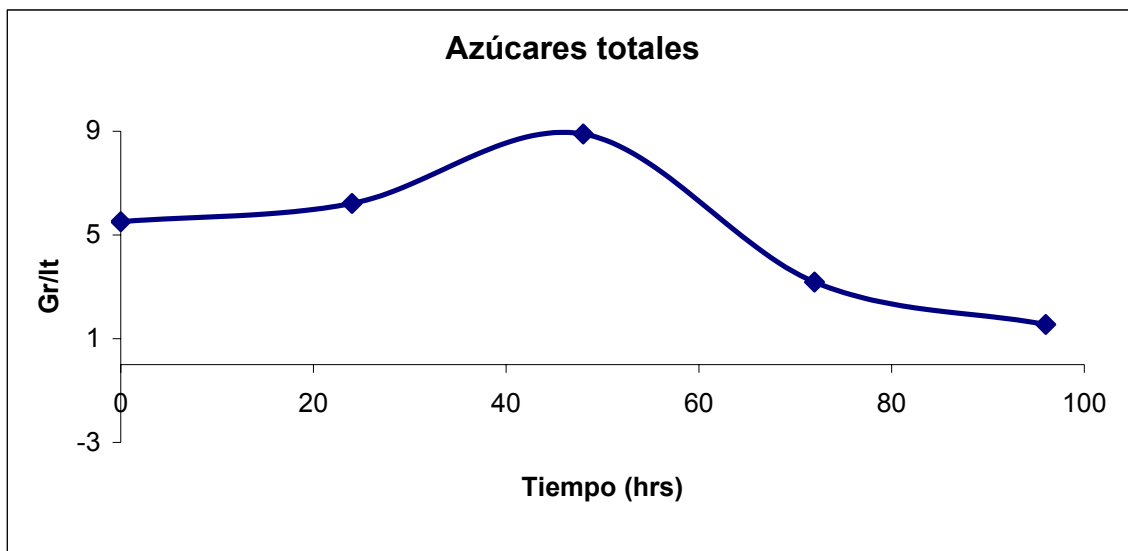


Figura 17. Monitoreo y consumo de azúcares totales.

La figura 17 muestra el consumo de azúcares totales donde se observa el incremento de las 24 a las 48 horas con su posterior decremento, de las 48 horas en adelante. El comportamiento es similar al descrito anteriormente en la figura 11; a diferencia que a partir de las 48 horas se mantiene su decremento, consumiendo aproximadamente el 98% del azúcar total en el medio. Nuevamente este consumo acelerado puede ser atribuido a la estabilidad celular ya descrita por (Wiseman, 1985) en la figura 16.

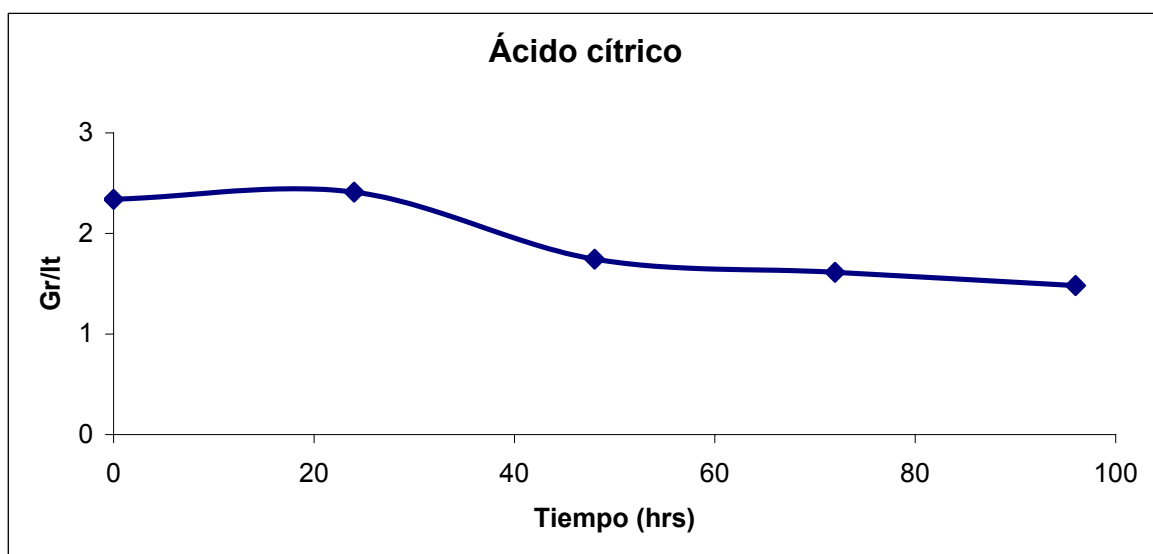


Figura 18. Producción de ácido cítrico.

En la figura 18 se puede observar que hubo un decremento notorio en la tendencia del ácido cítrico a partir de las 24 horas, hasta el final de la cinética, lo cual nos indica que no hubo producción de ácido cítrico, posiblemente debido a la desviación del microorganismo sobre otra ruta metabólica obteniendo otro tipo de subproducto durante la fermentación, lo cual hace referencia a lo descrito por (Wiseman, 1985) que habla acerca de la aplicación de *A. niger* para la obtención de celulasas y glucoamilasas en medios con soportes con soportes inmovilizados y/o la posible producción de productos laterales de la ruta del ácido cítrico esto en referencia a lo descrito por (Huerta, 2002) que al momento de la fermentación de ácido cítrico se pueden producir productos laterales no deseados como ácido oxálico, ácido isocítrico y ácido glucónico.

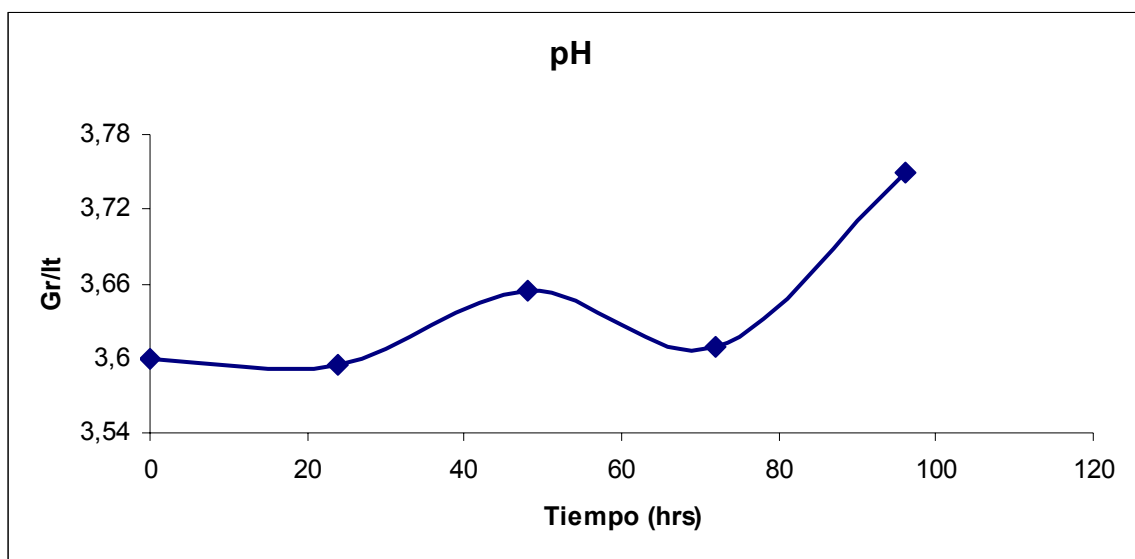


Figura 19. Resultados del monitoreo del pH cada 24 horas.

En la figura 19 se puede observar los decrementos e incrementos del pH durante la cinética partiendo de un 3.6 hasta llegar a un 3.76 a las 96 horas. Lo cual nos puede indicar que el microorganismo no necesita de un pH muy bajo para la obtención del subproducto que se halla obtenido.

CONCLUSIONES

La cepa de *Aspergillus niger unigras* 0007 ASP HSA, fue capaz de crecer en el medio con los nutrientes necesarios para su metabolismo, teniendo al almidón como única fuente de carbono.

Es posible la obtención de ácido cítrico a partir de aguas residuales ricas en almidón, mediante el uso de microorganismos como *Aspergillus niger* en un medio líquido.

Se obtuvo una degradación de un 62% del almidón total contenido en el medio, mediante el uso de una fermentación sumergida, en un tiempo de 120 horas.

La producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger* alcanzó su valor máximo de producción entre las 72 y 96 horas de fermentación, mediante el uso de células libres dentro del medio.

El soporte orgánico de Coyonoxtle (*Opuntia imbricata*), permitió la fijación del microorganismo, dándose la formación espontánea de biopelícula lo cual muestra que este tipo de soporte tiene características para lograr la absorción adecuada de células.

Se pudo consumir el 97% del almidón contenido en el medio a las 96 horas, utilizando como soporte orgánico el coyonoxtle.

En la inmovilización no se detectaron concentraciones considerables de ácido cítrico; como lo fue en el medio fermentado con células libres, debido a la formación de cualquier otro subproducto, o a la posible producción de productos laterales de la ruta del ácido cítrico.

BIBLIOGRAFÍA

ANÓNIMO. 1, 2002, Clasificación de aguas residuales industriales, revista ambientum. <http://www.ambientum.com>

ANÓNIMO. 2, Tratamiento de efluentes.

<http://www.ubp.edu.ar/todoambiente/empresasyambientes/Industrias.htm>

ANÓNIMO. 3, 2005, Departamento de agricultura, Nutrición humana en el mundo en desarrollo, Depósito de documentos de la FAO.

<http://www.fao.org/DOCREP/006/W0073S/w0073s0d.htm>

ANÓNIMO. 4, 2005, Biocatalizadores inmovilizados, Universidad Nacional de Quilmes, Departamento de ciencia y tecnología, Argentina.

<http://bioprocesos.unq.edu.ar/Celulas%20inmovilizadas%20TP.pdf>.

ARTEAGA C.Y. & Carballo R.L.(2005), Carbohidratos, Universidad Pinar del Río, Facultad de forestal y agronomía, Departamento de Química.

<http://www.monografias.com/trabajos24/carbohidratos/carbohidratos.html>

BADUI D., S. (1996) Química de los alimentos. Pearson education. 3 ed. Mexico.

BARKER, S.A & Fleetwood, J.G. (1957) J. Chem. Soc. 4857

BELITZ H.D., Grosch, W. (1997). "Química de los alimentos". Ed Acribia, S.A., Zaragoza.

DESROISIER, N. W., 1997, Elementos de Tecnología de Alimentos, Décima Segunda Edición, Editorial CECOSA, México.

DUBOIS, m. et, al. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28:530.

ESPAÑA. J, 2004, Historia del ácido cítrico

<http://www.monografias.com/trabajos17/acido-citrico/acido-citrico.htm>

FERNÁNDEZ R., J. F. 2000. determinación de almidón por método espectrofotométrico, utilizando yodo-yoduro.

FRAZIER, W. C. y D. C. Westhoff, 1962, Food microbiology, Mc Graw-Hill, New York, U.S.A. pp: 23-29.

GARCÍA .M, Quintero. R, López. A, 1999, Biotecnología Alimentaria, México Distrito Federal, Editorial Limusa, S.A de C.V, Grupo Noriega Editores. pp: 553-562.

GONZÁLEZ C., Méndez A., Contreras J., Rodríguez R., Martínez J., Aguilar C., 2005, Estudio cinético de la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* utilizando sacarosa como fuente de carbono, Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, México.

GRETTY, K., V. y Marcel, G. C. 2003. Biopelículas de *Aspergillus Niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos, Revista (1), Perú. pp: 78-87.

HEFFERSON. W, (1999), Consolidation in the food and agriculture system. Report to the National Farmers Union, *U.S. Department of Commerce, Bureau of the Census, Foreign Trade Division* , Boletín 99, Red por una América latina transgénicos.

http://www.ecoportal.net/contenido/temas_especiales/transgénicos/mas_sobre_el_mais_transgénico.htm

HERMIDA, J.R. 1993. Tratamiento y aprovechamiento del orujo de aceituna. Tecnologías complementarias en la industria alimentaria. pp:137-148.

HUERTA R, 2000, Producción industrial de ácidos orgánicos.
<http://coli.usal.es/Web/educativo/biotec.microb/tomos/25RamiroHuertaRodríguez.pdf>

ILINÁ .A, 2002, Manual de Prácticas del curso crédito 1, Introducción a la Biotecnología, Universidad Autónoma de Coahuila, México. p 38

LÁZARO L., Arauzo J. (1994). Aprovechamiento de residuos de la industria de conservas vegetales. Hidrólisis enzimática. Zulia (12).pp:227,240.

LÓPEZ .J, Fuentes .J, Rodríguez .A, 1997, Producción y uso de *Opuntia* como forraje en el centro-norte de México, universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México.

<http://www.fao.org/docrep/007y2808s/y2608s08.htm>

MARSILLI . A , 2005, Definición de agua residual
<http://www.tierramor.org/Articulos/tratagua.htm>

ORTÍZ .A, 2005, Obtención y caracterización de carotenoides presentes en los pétalos de la flor de cempoalxochitl (*tagetes erecta L.*) mediante biocatálisis fúngica, Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México. pp 36-40.

OSTOLAZA M. 1998. Aprovechamiento Energético de residuos Orgánicos. Ingeniería Química.pp:55-160

PRADO .F, Vandenberghe .L y Soccol .C, 2005, Relation between Citric acid Production by Solid-state Fermentation from Cassava bagase and Respiration of *Aspergillus niger* LPB 21 in Semi-pilot Scale, Departamento de ingeniería Química, Universidad Federal de Paraná; Centro Politécnico, Brasil.

ROBYT, J.F. y Whelan W.J.(1968). "Starch and its derivatives". J.A. Radley, ed., Chapman and Hall, London, 4th edition.

SAFFRAN and Densted. (). Determinación de ácido cítrico por el método de piridina/anhídrido acético.

SEOÁNEZ, M., 2003, Manuel de tratamiento, reciclado, aprovechamiento y gestión de las aguas residuales de las industrias alimentarias, España, Ediciones Mundi-Prensa.

SCRAGG A., 2004, Biotecnología para ingenieros “Sistemas biológicos en procesos tecnológicos”, México Distrito Federal, Editorial Limusa, S.A de C.V, Grupo Noriega Editores. pp:243-255

SPIEGEL .J, Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo, Protección ambiental y cuestiones de salud pública.

<http://www.mtas.es/insht/Enc01T/pdf/tomo2/ss.pdf>

TIRADO, .G .J .M, 2005, Obtención del colorante de la semilla de achiote (Bixa orellana) utilizando microorganismos celulolíticos, Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México. pp 58-61.

WHITAKER, J.R. (1972) Principles of Enzymology for the Food Sciences. Dekker, New York.

WISEMAN .A, 1985, Manual de biotecnología de los enzimas, España, Editorial Acribia, S.A. pp:139,280-282.

ZABORSKY O.R, (1973) Immobilized enzymes. CRC Press, Ohio.