



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana

Azcapotzalco

División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Posgrado en Ingeniería de Procesos

Bioproceso para obtener ácido cítrico, a partir de un
material lignocelulósico.

T E S I S

Que presenta el
M. en C. Raymundo Guzmán Gil
Para obtener el grado de

Doctor en Ingeniería de Procesos

Directores de Tesis:

Dra. Margarita Mercedes González Brambila

Departamento de Energía

Dr. José Luis Contreras Larios

de la UAM-Azcapotzalco

Ciudad de México
Marzo del 2021

Dedicatoria

Dedico este trabajo con mucho cariño a mis

padres, hermanos, amigos, profesores

y toda aquella persona que me apoyó para el desarrollo del mismo.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco, por la formación como profesionista y también por el apoyo para el desarrollo de la presente investigación, en particular al Laboratorio de Análisis de Procesos, y al Laboratorio de Procesos Catalíticos.

Muchas gracias por todas las enseñanzas y apoyo incondicional Dra. Margarita Mercedes González Brambila y Dr. José Luis Contreras Larios.

Agradezco al Ing. Edgar Rivera López, al Dr. Rafael Pérez Flores y al Dr. Hugo Eduardo Solís Correa, por su apoyo y amistad incondicional.

Dedico este trabajo en forma muy especial a mis padres Ma. del Rocío Gil Mercado, Ricardo Guzmán Lovera, a mis hermanos Ricardo, Ruth, Juventino, Rocío, Rolando y Mari.

Con cariño dedico este trabajo a todos mis amigos, quienes han estado a mi lado en los buenos y malos momentos.

Por último, quiero dedicar este trabajo a la familia Rivera, Gil, Solís, González, Contreras, Pérez, Salado, Hernández, Guzmán, Dávila y Moreno, por todo su apoyo y cariño.

1. Introducción

1.1 Resumen

El propósito de este estudio fue desarrollar un proceso biotecnológico para producir ácido cítrico, mediante la biorreacción de residuos de *Opuntia ficus indica*, como materia prima, a partir del Residuo Agroindustrial generado en la Alcaldía Milpa Alta, Ciudad de México. Los hongos *Pycnoporus cinnabarinus* y *Aspergillus niger* realizaron los procesos de biorreacción en biorreactores homogéneos. La eficiencia de la deslignificación con *Pycnoporus cinnabarinus* se midió bajo diferentes condiciones de operación: pH de 4 y 6, temperaturas de 30° C y 50° C; y tamaño de partículas de 0.074 mm y 0.25 mm, y la eficiencia de la biotransformación con *Aspergillus niger* se midió bajo diferentes condiciones de operación: pH de 2 y 4, 20 g/L y 30 g/L de celulosa, y concentraciones altas y bajas de metales traza: Cobre (Cu), Manganeso (Mn) y Zinc (Zn). La deslignificación y la producción de ácido cítrico se evaluó mediante espectroscopía IR y los efectos de los factores y sus interacciones se evaluaron mediante el análisis de varianza (ANOVA). Además, durante las biorreacciones se mantuvo bajo control el pH, el oxígeno disuelto (OD) y el potencial de óxido reducción (ORP), así como las concentraciones de biomasa y de carbohidratos reductores totales, para su determinación se utilizaron los métodos de Bradford y del ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) respectivamente. Mediante el análisis de la espectroscopía IR se midieron los porcentajes de deslignificación, logrando alrededor del 67 % de deslignificación durante las biorreacciones. La cantidad máxima de ácido cítrico obtenida fue de 6.2 g/L en las condiciones de operación optimizadas, a partir de 20 g de celulosa, y los valores de las constantes asociadas a la formación de producto fueron α de 2.91, β de 4.28, μ_m de 0.1362 d⁻¹, k_s de 0.603 g sustrato/l, k_d de 0.0102.

1.2 Abstract

The purpose of this study was to develop a biotechnological process to produce citric acid, through the bioreaction of *Opuntia ficus indica* residues, as raw material, from Agroindustrial Residue generated in the Milpa Alta Delegation, Mexico City. The microorganisms *Pycnoporus cinnabarinus* and *Aspergillus niger* performed the bioreactions process in homogeneous bioreactors. The efficiency of the deslignification with *Pycnoporus cinnabarinus* was measured under different operating conditions: 4 and 6 pH levels, 30° C and 50° C temperatures; and 0.074 mm and 0.25 mm particle size, and the efficiency of the biotransformation with *Aspergillus niger* was measured under different operating conditions: 2 and 4 pH levels, 20 g/L and 30 g/L of cellulose, and high and low concentrations of trace elements: Copper (Cu), Manganese (Mn) and Zinc (Zn). The deslignification and citric acid production was evaluated by IR spectroscopy and the effects of the factors and their interactions were evaluated through the analysis of variance (ANOVA). Moreover the pH, dissolved oxygen (DO) and the oxide-reduction potential (ORP) were monitored during the bioreactions, as well as the concentrations of biomass and total reducing carbohydrates, using the methods of Bradford and 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) respectively. Using analysis of IR spectroscopy percentages of deslignification were observed around 67% during bioreactions. The maximum citric acid amount obtained was 6.2 g/L at the optimized operation conditions, from 20 g of cellulose, and the values of the constants associated with product formation were α of 2.91, β of 4.28, μ_m of 0.1362 d⁻¹, k_s of 0.603 g substrate/l, k_d of 0.0102.

CONTENIDO

Dedicatoria	i
Agradecimientos	i
1. Introducción	ii
1.1 Resumen	ii
1.2 Abstract	iii
CONTENIDO.....	iv
Índice de figuras	vi
Índice de tablas.....	ix
Acrónimos y sinónimos.....	xi
2. Antecedentes.....	1
2.1 <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	1
2.1.1 Metabolismo <i>P. cinnabarinus</i>	2
2.2 <i>Aspergillus niger</i>	4
2.2.1 Metabolismo de <i>A. niger</i>	4
2.3 <i>Opuntia ficus-indica</i>	6
2.3.1 Producción de nopal en la Ciudad de México.....	7
2.3.2 Composición de <i>O. ficus-indica</i>	7
2.4 <i>Ruta metabólica de la celulosa</i>	9
2.5 <i>Inmovilización de células</i>	10
2.6 <i>Diseño de experimentos con varios factores</i>	11
2.6.1 Experimentos de caracterización de un proceso.....	11
2.6.2 Experimentos factoriales	12
2.6.3 Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)	13
2.6.4 Regresión lineal múltiple.....	13
2.7 <i>Modelado en procesos de fermentación por lote</i>	14
3. Justificación	16
4. Planteamiento del Problema.....	16
4.1 <i>Hipótesis</i>	17
4.1.1 Objetivos	17
5. Metodología.....	17
5.1 <i>Pretratamiento de los residuos de O. ficus indica</i>	18
5.2 <i>Resiembra y propagación de hongos</i>	18
5.2.1 Cepa de <i>P. cinnabarinus</i>	18

5.2.2	Cepa de <i>A. niger</i>	19
5.2.3	Extracción de esporas de botella Roux.....	19
5.3	<i>Implementación de técnicas analíticas</i>	20
5.3.1	Cuantificación de D-glucosa	20
5.3.2	Cuantificación de biomasa.....	22
5.3.3	Cuantificación del ácido cítrico	24
5.4	<i>Determinación de la composición de las espinas de <i>O. ficus indica</i> y el licor post-fermentativo (durante la obtención de ácido cítrico)</i>	25
5.4.1	Composición de las espinas de <i>O. ficus indica</i>	25
5.4.2	Caracterización del licor post-fermentativo (ácido cítrico)	26
5.4.3	Determinación de espectros IR.....	26
5.5	<i>Preparación de soluciones buffer</i>	27
5.6	<i>Diseños de experimentación factorial 2^k</i>	27
5.7	<i>Evaluación de la deslignificación de <i>O. ficus indica</i>, e hidrólisis de celulosa</i>	28
5.7.1	Preparación de inóculos.	29
5.7.2	Operación de los biorreactores.....	31
5.8	<i>Metodología de superficie de respuesta</i>	32
6.	Resultados.....	33
6.1	<i>Resiembra y propagación de <i>P. cinnabarinus</i></i>	33
6.2	<i>Resiembra y propagación de <i>A. niger</i></i>	34
6.2.1	Espectros infrarrojos (materia prima).....	34
6.3	<i>Composición de la materia prima</i>	36
6.4	<i>Evaluación de la capacidad de <i>P. cinnabarinus</i> para deslignificar</i>	36
6.5	<i>Análisis de la operación de los biorreactores con <i>P. cinnabarinus</i></i>	45
6.5.1	Análisis del porcentaje de despolimerización de la lignina	46
6.5.2	Evaluación de las condiciones de operación durante la deslignificación de <i>O. ficus indica</i>	49
6.6	<i>Evaluación de la capacidad de <i>Aspergillus niger</i> para hidrolizar celulosa</i>	53
6.7	<i>Análisis de la operación de las fermentaciones con <i>A. niger</i></i>	57
6.7.1	Análisis de la hidrólisis de la celulosa para la obtención del ácido cítrico....	57
6.7.2	Evaluación de las condiciones de operación durante la obtención del ácido cítrico.	60
6.7.3	Simulación de la cinética de formación de ácido cítrico con <i>Aspergillus niger</i> .	66
7.	Conclusiones	71
8.	Referencias	72
9.	Anexos	I
9.1	<i>MSR deslignificación de <i>O. ficus-indica</i> usando el hongo <i>P. cinnabarinus</i></i>	I

9.2	MSR obtención de ácido cítrico usando el hongo <i>A. niger</i>	III
9.3	Validación de normalidad, varianza constante e independencia	VI
9.3.1	Porcentaje de deslignificación de <i>O. ficus-indica</i>	VI
9.3.2	Concentración de ácido cítrico, g/L.....	VIII
9.4	Diagrama de flujo de la metodología	X
9.5	Deslignificación de <i>Opuntia ficus indica</i>	XI
9.5.1	Monitoreo durante la operación de los biorreactores (<i>P. cinnabarinus</i>).....	XI
9.5.2	Espectros IR (<i>P. cinnabarinus</i>)	XVIII
9.6	Obtención de ácido cítrico	XXV
9.6.1	Monitoreo durante la operación de los biorreactores (<i>A. niger</i>).....	XXV
10.	Apéndices	i
10.1	Apéndice A: Normalidad, varianza constante e independencia.....	i
10.2	Apéndice B: Fundamentos teóricos.	i
10.2.1	Introducción a los métodos espectrométricos	i
10.2.2	Propiedades generales de la radiación electromagnética	ii
10.2.3	Propiedades ondulatorias de la radiación electromagnética	ii
10.2.4	El espectro electromagnético.....	iii
10.2.5	Transmitancia y Absorbancia.....	iv
10.2.6	La ley de Beer	v
10.2.7	Calibración de los métodos instrumentales.....	v
10.2.8	Espectrometría de absorción molecular ultravioleta/visible	vi
10.2.9	Espectroscopía en el Infrarrojo (IR)	vii

Índice de figuras

Figura 2.1.	Esquema general de los procesos biotecnológicos [1].	1
Figura 2.2	Esquema del ciclo catalítico del mediador (3-HAA)/lacasa (Adaptado de Polak [11])	4
Figura 2.3.	Regulación de la producción del ácido cítrico, adaptación de Melzer [18].	5
Figura 2.4.	Representación esquemática de las enzimas que intervienen en el ciclo de ácidos tricarbónicos (ácido cítrico) adaptación de Campbell [19].....	6
Figura 2.5.	Composición de la lignocelulosa de <i>O. ficus indica</i> (Adaptación de Yang y Vignon) [24, 28].	8
Figura 2.6.	Relación central del ciclo del ácido cítrico con el catabolismo, adaptación de Campbell [19].....	9
Figura 2.7.	Representación esquemática de los sitios de actuación de las distintas enzimas celulolíticas, modelo de Montenecourt. Adaptado de Lucas [31].	10
Figura 2.8.	Diagrama de experimento para fermentación con <i>A. niger</i> (Biorreactor), adaptado de Montgomery [33].	12
Figura 5.9.	Ubicación del Centro de acopio de nopal-verdura, Alcaldía Milpa Alta, Ciudad de México.	17

Figura 5.10. Contenedores de residuos generados en el Centro de acopio de nopal-verdura, Alcaldía Milpa Alta, Ciudad de México.	18
Figura 5.11. Espinas de nopal	18
Figura 5.12. Espectro UV-vis del ácido 3,5-Dinitrosalicílico.....	21
Figura 5.13. Curva de calibración para cuantificar glucosa, $\lambda=371$ nm.....	22
Figura 5.14. Espectro UV del reactivo Bradford	23
Figura 5.15. Curva de calibración para cuantificar biomasa, $\lambda= 532$ nm.	23
Figura 5.16. Espectro UV de ácido cítrico con piridina y anhídrido acético	25
Figura 5.17. Curva de calibración para cuantificar ácido cítrico, $\lambda= 347$ nm.....	25
Figura 5.18. Proceso de preparación de inóculo de basidios de <i>P. cinnabarinus</i>	29
Figura 5.19. Proceso de preparación de inóculo de conidiosporas de <i>A. niger</i>	30
Figura 6.20. Esquema general del bioproceso para obtener ácido cítrico por fermentación, a partir de un material lignocelulósico.	33
Figura 6.21. (A) Resiembra y propagación, (B) incubación y (C) desarrollo de basidiosporas de <i>P. cinnabarinus</i>	34
Figura 6.22. (A) Resiembra y propagación, (B) incubación y (C) desarrollo de conidiosporas de <i>A. niger</i>	34
Figura 6.23. (a) Alcohol p-cumarílico, (b) Alcohol coniferílico y (c) Alcohol sinapílico.....	35
Figura 6.24. Espectro IR: (a) bagazo de nopal, (b) espinas de nopal, (c) celulosa y (d) fenol.	35
Figura 6.25. Biorreactor sin influencia de variables a controlar, <i>P. cinnabarinus</i>	37
Figura 6.26. Monitoreo del CO ₂ producido por <i>P. cinnabarinus</i> , biorreactor Fb.....	37
Figura 6.27. Evolución del O ₂ disuelto e incremento de biomasa dentro del biorreactor, Fb en la fermentación con <i>P. cinnabarinus</i>	38
Figura 6.28. Variación del ion amonio, carbohidratos reductores totales (CTR), pH y potencial de óxido reducción (ORP) dentro del biorreactor Fb, en la fermentación con <i>P. cinnabarinus</i>	39
Figura 6.29. Espectro IR: materia prima y sólido recuperado de la fermentación Fb, con <i>P. cinnabarinus</i>	40
Figura 6.30. Adaptación de <i>P. cinnabarinus</i> a deslignificar.	40
Figura 6.31. Evolución del O ₂ disuelto e incremento de biomasa, fermentaciones clave: <i>Fc</i>	41
Figura 6.32. Variación de la biomasa, los carbohidratos reductores totales (CTR), el pH y potencial de óxido reducción (ORP) dentro de los biorreactores, <i>Fc</i>	42
Figura 6.33. Espectro IR: materia prima y sólido recuperado de las fermentaciones, <i>Fc</i>	42
Figura 6.34. Evolución del O ₂ disuelto e incremento de biomasa, fermentaciones clave: <i>Fp</i>	43
Figura 6.35. Variación de la biomasa, los carbohidratos reductores totales (CTR), el pH y potencial de óxido reducción (ORP) dentro de los biorreactores, <i>Fp</i>	44
Figura 6.36. Espectro IR: materia prima y sólido recuperado de las fermentaciones, <i>Fp</i>	44
Figura 6.37. Biorreactores aplicando el diseño de experimentos para <i>P. cinnabarinus</i>	45
Figura 6.38. Porcentajes de deslignificación de <i>O. ficus indica</i>	47
Figura 6.39. Porcentajes de celulosa obtenido con <i>P. cinnabarinus</i>	47
Figura 6.40. Diagrama de Pareto estandarizado para el porcentaje de deslignificación... ..	49
Figura 6.41. Comportamiento del ORP, OD, Biomasa y CRT (promedios biorreacciones F5-F13): pH 4, tamaño de partícula de 0.25 mm y temperatura de 50 °C.	51
Figura 6.42. Comparación de espectros infrarrojos de la celulosa, la materia prima y el sólido recuperado del biorreactor F5.....	52
Figura 6.43. Adaptación de <i>A. niger</i> a despolimerizar celulosa.	53
Figura 6.44. Variación de las concentraciones de biomasa, CRT, Oxígeno disuelto y ácido cítrico dentro de los biorreactores, BR1 (pH=3, 10 g/L de celulosa y 7 g/L de glucosa)... ..	54

Figura 6.45. Variación de las concentraciones de biomasa, CRT, Oxígeno disuelto y ácido cítrico dentro de los biorreactores, BR2 (pH=3, 10 g/L de celulosa y 7 g/L de glucosa). ..	55
Figura 6.46. Variación de las concentraciones de biomasa, CRT, Oxígeno disuelto y ácido cítrico dentro de los biorreactores, BRb (pH= 6.7, 10 g/L de celulosa, sin glucosa).	56
Figura 6.47. Fermentaciones aplicando el diseño de experimentos para <i>A. niger</i>	57
Figura 6.48. Concentraciones de ácido cítrico producidas en cada uno de los experimentos con <i>A. niger</i>	58
Figura 6.49. Diagrama de Pareto estandarizado para la concentración de ácido cítrico. .	59
Figura 6.50. Variación de la biomasa, concentración de carbohidratos reductores, Oxígeno disuelto y ácido cítrico dentro de los biorreactores, promedios: E2-E10.....	62
Figura 6.51. Promedio de los coeficientes $Y_{x/s}$ y $Y_{p/s}$	64
Figura 6.52. Espectro IR del producto obtenido de las biorreacciones clave R1.	66
Figura 6.53. Comparación de la formación de producto (AC, ácido cítrico): ▪ valores experimentales de las biorreacciones clave R1, --- predicción del modelo cinético.....	67
Figura 9.54. Superficies y contornos para el porcentaje de deslignificación en función de las variables independientes (tamaño de partícula, pH y temperatura [<i>pivote</i>]).	I
Figura 9.55. Superficies y contornos para el porcentaje de deslignificación en función de las variables independientes (pH, temperatura y tamaño de partícula [<i>pivote</i>]).	II
Figura 9.56. Superficies y contornos para el porcentaje de deslignificación en función de las variables independientes (tamaño de partícula, temperatura y pH [<i>pivote</i>]).	III
Figura 9.57. Superficie respuesta para la concentración de ácido cítrico en función de las variables independientes (celulosa, pH y medio de cultivo [<i>pivote</i>]).	IV
Figura 9.58. Superficie respuesta para la concentración de ácido cítrico en función de las variables independientes (celulosa, medio de cultivo y pH [<i>pivote</i>]).	V
Figura 9.59. Superficie respuesta para la concentración de ácido cítrico en función de las variables independientes (pH, medio de cultivo y celulosa [<i>pivote</i>]).	VI
Figura 9.60. Gráfica de probabilidad Normal para los residuos del porcentaje de deslignificación.	VII
Figura 9.61. Gráfico de predicho contra residuos para el porcentaje de deslignificación....	VII
Figura 9.62. Gráfico de número de ejecución contra residuos para el porcentaje de deslignificación.	VII
Figura 9.63. Gráfica de probabilidad Normal para los residuos de la concentración de ácido cítrico.	VIII
Figura 9.64. Gráfico de predicho contra residuos para la concentración de ácido cítrico.VIII	VIII
Figura 9.65. Gráfico de número de ejecución contra residuos para la concentración de ácido cítrico.....	IX
Figura 9.66. Comportamiento del ORP, OD, Biomasa y CRT (promedios fermentaciones F1-F12): pH 6, tamaño de partícula de 0.074 mm y temperatura de 30 °C.	XI
Figura 9.67. Comportamiento del ORP, OD, Biomasa y CRT (promedios fermentaciones F2-F10): pH 4, tamaño de partícula de 0.074 mm y temperatura de 30 °C.	XII
Figura 9.68. Comportamiento del ORP, OD, Biomasa y CRT (promedios fermentaciones F3-F9): pH 4, tamaño de partícula de 0.25 mm y temperatura de 30 °C.	XIII
Figura 9.69. Comportamiento del ORP, OD, Biomasa y CRT (promedios fermentaciones F4-F11): pH 6, tamaño de partícula de 0.25 mm y temperatura de 30 °C.	XIV
Figura 9.70. Comportamiento del ORP, OD, Biomasa y CRT (promedios fermentaciones F6-F14): pH 4, tamaño de partícula de 0.074 mm y temperatura de 50 °C.	XV
Figura 9.71. Comportamiento del ORP, OD, Biomasa y CRT (promedios fermentaciones F7-F15): pH 6, tamaño de partícula de 0.25 mm y temperatura de 50 °C.	XVI
Figura 9.72. Comportamiento del ORP, OD, Biomasa y CRT (promedios fermentaciones F8-F16): pH 6, tamaño de partícula de 0.074 mm y temperatura de 50 °C.	XVII
Figura 9.73. Comparación de espectros IR fermentadores clave: F1 y F2.	XVIII

Figura 9.74. Comparación de espectros IR fermentadores clave: F3 y F4.	XIX
Figura 9.75. Comparación de espectros IR fermentadores clave: F6 y F7.	XX
Figura 9.76. Comparación de espectros IR fermentadores clave: F8 y F9.	XXI
Figura 9.77. Comparación de espectros IR fermentadores clave: F10 y F11.	XXII
Figura 9.78. Comparación de espectros IR fermentadores clave: F12 y F13.	XXIII
Figura 9.79. Comparación de espectros IR fermentadores clave: F14 y F15.	XXIV
Figura 9.80. Comparación de espectros IR fermentador clave: F16.	XXV
Figura 9.81. Comportamiento del consumo de celulosa dentro de los biorreactores R1 a R8.	XXV
Figura 9.82. Comportamiento del Oxígeno disuelto dentro de los biorreactores R1 a R8.	XXVI
Figura 9.83. Comportamiento de la Biomasa dentro de los biorreactores R1 a R8.	XXVI
Figura 9.84. Comportamiento del ácido cítrico dentro de los biorreactores R1 a R8. ...	XXVI
Figura 10.85. Representación de un haz de radiación monocromática, polarizada en el plano: (a) campos eléctrico y magnético perpendiculares entre sí y respecto a la dirección de propagación, (b) representación bidimensional del vector eléctrico. [43].	ii
Figura 10.86. Regiones del espectro electromagnético [35].	iii
Figura 10.87. Atenuación de un haz de radiación por una disolución absorbente. [43]	v
Figura 10.88. Arriba modos vibratorios y abajo plegamiento de un grupo de átomos, XY ₂ [44]	ix

Índice de tablas

Tabla 5.1. Preparación de soluciones buffer	27
Tabla 5.2. Niveles reales y codificados para el diseño de experimentación factorial 2 ^k , para <i>P. cinnabarinus</i>	28
Tabla 5.3. Niveles reales y codificados para el diseño de experimentación factorial 2 ^k , para <i>A. niger</i>	28
Tabla 5.4. Combinación del diseño de experimentación 2 ^k , para <i>P. cinnabarinus</i>	31
Tabla 5.5. Combinación del diseño de experimentación 2 ^k , para <i>A. niger</i>	32
Tabla 6.6. Comparación con la literatura, de la cuantificación de lignina, celulosa y pectina.	36
Tabla 6.7. Evaluación de la capacidad de deslignificación de la materia prima por <i>P. cinnabarinus</i>	45
Tabla 6.8. Porcentaje de deslignificación y celulosa, obtenidos con <i>P. cinnabarinus</i>	46
Tabla 6.9. Análisis de varianza para las fermentaciones con <i>P. cinnabarinus</i>	48
Tabla 6.10. Resultados de la exploración de las superficies del porcentaje de deslignificación.	50
Tabla 6.11. Valor observado y predicho para el porcentaje de deslignificación.	50
Tabla 6.12. Comparativo de porcentajes de deslignificación, entre diferentes procesos. .	53
Tabla 6.13. Despolimerización de la materia prima durante la etapa de adaptación de <i>A. niger</i>	56
Tabla 6.14. Concentración de ácido cítrico y variables reales para las fermentaciones con <i>A. niger</i>	57
Tabla 6.15. Análisis de varianza para las fermentaciones con <i>A. niger</i>	59
Tabla 6.16. Resultados de la exploración de las superficies de la concentración de ácido cítrico.	60
Tabla 6.17. Valor observado y predicho para la concentración de ácido cítrico, g/L.	61
Tabla 6.18. Promedio de los coeficientes Y _{x/s} y Y _{p/s}	63
Tabla 6.19. ANOVA para las ocho fermentaciones con su réplica.	64

Tabla 6.20. Método de rango múltiple de Duncan para los experimentos con *A. niger*. ... 65

Tabla 6.21. Valores calculados de las constantes asociadas a la formación de ácido cítrico.
..... 67

Tabla 6.22. Concentraciones promedio de biomasa, concentración de carbohidratos reductores totales y concentración de ácido cítrico, en cada experimento y su réplica. ... 68

Tabla 6.23. Producción de ácido cítrico a partir de diferentes materias primas. 68

Tabla 6.24. Costo por reactivo utilizado para obtención de ácido cítrico. 69

Tabla 10.25. Métodos espectroscópicos generales basados en la radiación electromagnética. [43]. iv

Acrónimos y sinónimos

Símbolo	Descripción
BEOCAC	Bioproceso enfocado a obtener ácido cítrico por fermentación, a partir de un material lignocelulósicos
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
TAPPI	Technical Association of the Pulp and Paper Industry
MSR	Metodología de Superficie de Respuesta
D.F.	Distrito Federal
C_{Xv}	Concentración de células viables (Kg células viables·m ⁻³)
C_s	Concentración de sustrato limitante (Kg sustrato·m ⁻³)
K_s	Constante de saturación (Kg sustrato·m ⁻³)
μ_m	Velocidad específica máxima de crecimiento (h ⁻¹)
K_d	Constante de muerte celular (Kg células no viables·Kg ⁻¹ células viables·h ⁻¹)
C_{O_2}	Concentración de Oxígeno (Kg O ₂ ·m ⁻³)
K_{La}	Coefficiente de transferencia de Oxígeno (Kg O ₂ ·m ⁻³ ·h ⁻¹)
C_{sat}	Concentración de Oxígeno, punto de saturación (Kg O ₂ ·m ⁻³)
$Y_{x/s}$	Coefficiente estequiométrico de rendimiento de sustrato consumido para formar biomasa (Kg biomasa·Kg ⁻¹ sustrato utilizado)
m_s	Coefficiente de consumo de sustrato para mantenimiento celular en estado viable (Kg sustrato·Kg ⁻¹ células viables·h ⁻¹)
C_p	Formación de producto (Kg producto·m ⁻³ ·h ⁻¹)
$Y_{p/s}$	Coefficiente estequiométrico de rendimiento de sustrato consumido para formar producto (Kg producto·Kg ⁻¹ sustrato utilizado)
α	Coefficiente de formación de producto asociado al crecimiento celular (Kg producto·Kg ⁻¹ células)
β	Coefficiente de formación de producto no asociado al crecimiento celular (Kg producto·Kg ⁻¹ células)
ec.	Ecuación
vvm	Volumen de aire por volumen de medio de cultivo por minuto
ORP	Potencial de óxido-reducción
O. f. i.	<i>Opuntia ficus indica</i>
P. c.	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>
A. n.	<i>Aspergillus niger</i>
As	Absorbancia de la materia prima (O. f. i.) antes de la biorreacción
Ab	Absorbancia del sólido recuperado después de la biorreacción
P_{ox}	Peso seco del sólido después de la oxidación química con KMnO ₄ , g
P_{ce}	Peso de la ceniza, g
C_r	Concentración del carbohidrato reductor en el medio de cultivo, g/L
C_{su}	Concentración total de carbohidratos reductores en el sustrato, g/L
C_{bf}	Concentración de biomasa al final de la biorreacción, g/L
C_{bi}	Concentración de biomasa en el inóculo, g/L
C_{pf}	Concentración del producto al final de la biorreacción, g/L
C_{sf}	Concentración del producto al inicio de la biorreacción, g/L
r_p	Velocidad de formación de producto
r_x	Velocidad de formación de biomasa

2. Antecedentes

En la actualidad la aplicación de los biorreactores es amplia y diversa para diferentes disciplinas, un biorreactor es un sistema en el que son tratados los materiales para facilitar las transformaciones bioquímicas por la acción de las células vivas o por componentes celulares, como enzimas, *in vitro*. Los biorreactores son empleados ampliamente en las industrias de alimentación y fermentación, en el tratamiento de residuos y en muchas instalaciones biomédicas. En la industria de fermentaciones se suelen tener las siguientes etapas: *un pretratamiento, una biorreacción y una recuperación*, como se puede apreciar en la Figura 2.1 [1].

Existen dos tipos de biorreactores, los que operan con microorganismos (células vivas) y los que aplican las enzimas (acelulares) para las transformaciones. Dependiendo de los requerimientos del proceso, ya sea en condiciones aerobias o anaerobias, en estado sólido o líquido, con células libres o inmovilizadas, etc., son posibles numerosas subdivisiones de esta clasificación.

En los biorreactores, se mantiene o facilita el crecimiento celular para permitir la formación de los productos, sea un *metabolito* (por ejemplo: antibiótico, glucosa, alcohol, **ácido cítrico**, etc.), o *biomasa* (por ejemplo, *Pleurotus sajor-caju*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Trametes versicolor*, *Aspergillus niger*, *Sacharomyces cerevisiae*, etc.). Es importante resaltar que los sistemas basados en cultivos dispersos de microorganismos (bacterias, levaduras, hongos), que no forman tejidos, son conocidos como reactores microbianos (biorreactores, fermentadores) [1].

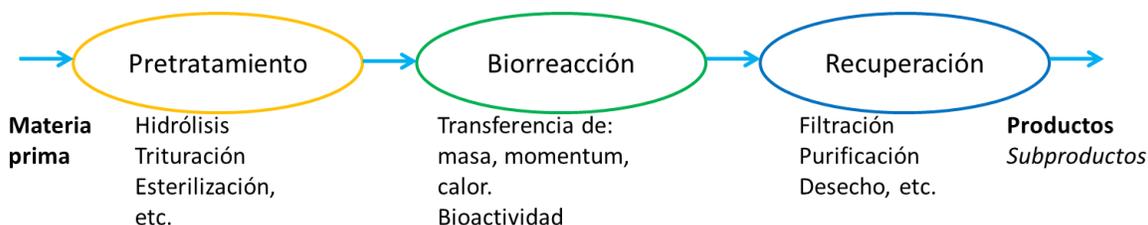


Figura 2.1. Esquema general de los procesos biotecnológicos [1].

2.1 *Pycnoporus cinnabarinus*

La Sociedad Internacional de Protistólogos propuso una clasificación abreviada de los hongos, dentro de esta clasificación se localiza *P. cinnabarinus*, por subclase es *Basidiomycota*, con las siguientes características: la reproducción asexual implica la formación de un basidio (una estructura pequeña en forma de martillo que generalmente forma esporas en los extremos de diminutas proyecciones) en cuyo interior se generan basidiosporas haploides. Generalmente cuatro esporas por basidio, pero pueden oscilar entre una y ocho. La reproducción sexual implica la fusión de tipos opuestos de apareamiento, produciendo un micelio dicariota con núcleos pareados pero que en un principio no se fusionan [2]. *Este microorganismo también es identificado como un hongo de pudrición blanca* [3].

2.1.1 Metabolismo *P. cinnabarinus*

Los hongos de pudrición blanca son los degradadores de lignina más significativos entre los microorganismos que habitan en madera. La lignina se degrada por la actividad de enzimas oxidativas extracelulares, conocidas comúnmente como ligninasas. Las más comúnmente producidas por estos hongos son: lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP), y lacasas (fenol oxidasas). Las enzimas ligninolíticas también oxidan diversos contaminantes ambientales, tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos, clorofenoles, y colorantes aromáticos [4].

La capacidad para disminuir el contenido de lignina en madera se ha estudiado con diferentes cepas en fermentaciones de sustrato sólido, ya sea en monocultivo o cultivos mixtos. Los autores Mester y Tien [4], reportaron que utilizaron tres cepas de hongos (*Pleurotus sajor-caju*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor*), las cuales requirieron un período de tiempo de 6 semanas para que el aserrín de Abeto sea deslignificado del (4 al 14) % empleando monocultivos durante la fermentación. Por el contrario, para cultivos donde se emplean múltiples cepas de hongos, se requiere de un período de tiempo de 3 semanas para que el aserrín de madera sea deslignificado del (8 al 16) %. Además, se observó que estos cultivos mixtos tienen efectos significativos sobre la degradación de la hemicelulosa por acción de las hemicelulasas, cabe mencionar que el uso de un cosustrato (sacarosa) para deslignificar aserrín de madera con hongos de podredumbre blanca da lugar a un proceso con mayor remoción de lignina y hemicelulosa, teniendo como producto un sustrato (celulosa) fácilmente biodegradable por dichas cepas [5].

Algunos estudios relacionados con los hongos de podredumbre blanca ha demostrado que dichos hongos requieren pequeñas cantidades de metales pesados, como Cu, Co, Mn o Zn que son **esenciales** para su crecimiento, sin embargo, son tóxicos cuando se presentan en exceso, por ejemplo, 150 ppm de Cu o Co, 300 ppm de Mn o Zn pueden inhibir el crecimiento, causar cambios morfológicos, fisiológicos y afectar a la reproducción del hongo. Las cepas de hongos de podredumbre blanca difieren en su **sensibilidad** hacia la presencia de iones metálicos, la toxicidad de algunos metales pesados tales como Hg, Cd o Ni se ha usado para el desarrollo de conservantes (antifúngicos) de madera, por ejemplo, el Cd y el Hg son en general los metales más tóxicos para todos los hongos de pudrición blanca, la adición de 0.1 a 0.2 mM de Cd, así como de 0.05 a 0.25 mM de Hg conduce a una severa inhibición de su crecimiento [4-6].

El Cu, Mn y Zn están directamente involucrados en las rutas metabólicas catalizadas por enzimas ligninolíticas, aumentando la actividad de las lacasas, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa, durante la degradación de lignocelulosa por medio de hongos de pudrición blanca, es decir, los iones metálicos favorecen la actividad de las enzimas intra y extracelulares implicadas en el desarrollo del sistema enzimático ligninolítico, por otro lado, la capacidad de estos hongos para absorber y acumular iones metálicos ocurre en el micelio [6].

Es importante señalar que la biomasa lignocelulósica es un sustrato complejo que requiere una variedad de enzimas, actuando en sinergia, para su hidrólisis completa. Estas enzimas suelen actuar juntas y son las siguientes: para la degradar la lignina (lacasas, manganeso peroxidasa, lignina peroxidasa y peroxidasa versátil), para degradar la pectina (pectin esterasa de metilo, pectato liasa, poligalacturonasa y ramnogalacturonano liasa), para degradar la hemicelulosa (endo-xilanasas, acetil xilano esterasa, β -xilosidasa, endo-

mananasa, β -manosidasa, α -L-arabinofuranosidasa, α -glucuronidasa, ácido ferúlico esterasa, α -galactosidasa y *p*-ácido cumárico esterasa), para degradar la celulosa (celobiohidrolasa, endoglucanasa y glucosidasa) [7].

Enzimas lignolíticas y hemicelulolíticas se han identificado en el hongo *Pycnoporus cinnabarinus*, cabe resaltar que este hongo es un excelente productor de lacasas [3-5, 8]. Las enzimas extracelulares producidas por *P. cinnabarinus* fueron identificadas como xilanasas, **lacasa** y celobiosa deshidrogenasa, recientemente dichas enzimas (lignolíticas y hemicelulolíticas) se emplean para el bi blanqueo en la obtención de celulosa, a partir de materiales lignocelulósicos como: pulpa de remolacha de azúcar, salvado de trigo, bagazo de caña, paja de maíz, por mencionar algunos [8].

Sin embargo, el empleo de una enzima o mezclas de enzimas requiere determinadas condiciones óptimas de operación, tales como pH y temperatura. A pH de 5 y 65 °C se tienen las condiciones de operación óptimas para un sistema conformado por tres enzimas (xilanasas, lacasa y celobiosa deshidrogenasa) [3]. No obstante, *P. cinnabarinus* produce el metabolito 3-hidroxiantranilato, el cual sirve como mediador en la oxidación de sustratos no fenólicos por lacasa, de tal forma que dicha enzima podría funcionar para la despolimerización completa de lignina [9].

Durante la oxidación de sustratos lignocelulósicos por acción de la enzima lacasa producida por *P. cinnabarinus*, diversos autores han demostrado que la actividad enzimática de la lacasa se favorece en presencia de mediadores redox naturales o sintéticos, un mediador sintético como el 1-hidroxibenzotriazol (HBT) demostró ser eficaz al oxidar hasta un 86 % de compuestos no fenólicos [10], por otro lado un mediador natural como el ácido 3-hidroxiantranilato demostró un 58 % de eficiencia al oxidar compuesto no fenólicos. Por lo anterior, dicha enzima en presencia de mediadores, principalmente el ácido 3-hidroxiantranilato (3-HAA), el cual es producido de forma natural por *P. cinnabarinus* [9], puede ser utilizada para la despolimerización de la lignina presente en sustratos lignocelulósicos, siendo la oxidación de la lignina la etapa más importante al emplear este tipo de sustratos, debido al potencial de utilizar residuos vegetales para la sacarificación de la celulosa y, así obtener productos de valor agregado como el ácido cítrico [11].

Varios investigadores han observado que la lacasa es capaz de oxidar ciertos fenoles con valores de potencial redox más altos que los suyos, algunos refieren que el centro activo de una lacasa fúngica típica contiene cuatro átomos de cobre (II), que representan tres clases espectroscópicas diferentes, marcadas como tipos 1-3 (T1, T2 y T3, respectivamente) [8, 10-12]. Un esquema del ciclo catalítico del mediador producido por *P. cinnabarinus*, el ácido 3-hidroxiantranilato (3-HAA) actuando con la enzima lacasa producida por dicho hongo, se representa en la Figura 2.2, donde los electrones liberados del sustrato se transfieren secuencialmente al mediador el ácido 3-hidroxiantranilato (3-HAA), posteriormente al cobre T1 y al centro T2/T3 presente en el centro activo de lacasa, y luego al oxígeno molecular, lo que resulta en su reducción a agua [8, 11]. La eficiencia de oxidación de sustratos por lacasa depende de la diferencia de potenciales entre el potencial de cobre T1 de lacasa y el potencial del sustrato [10]. Es relevante resaltar que el pH del medio de reacción tiene un papel importante en la catálisis enzimática, ya que favorece la actividad catalítica de la lacasa y al potencial redox de los sustratos, de tal forma que los sustratos de la lacasa se pueden dividir en dos grupos básicos: donantes de electrones y protones (compuestos orgánicos) y donantes de electrones (compuestos orgánicos y no orgánicos) [9, 11].

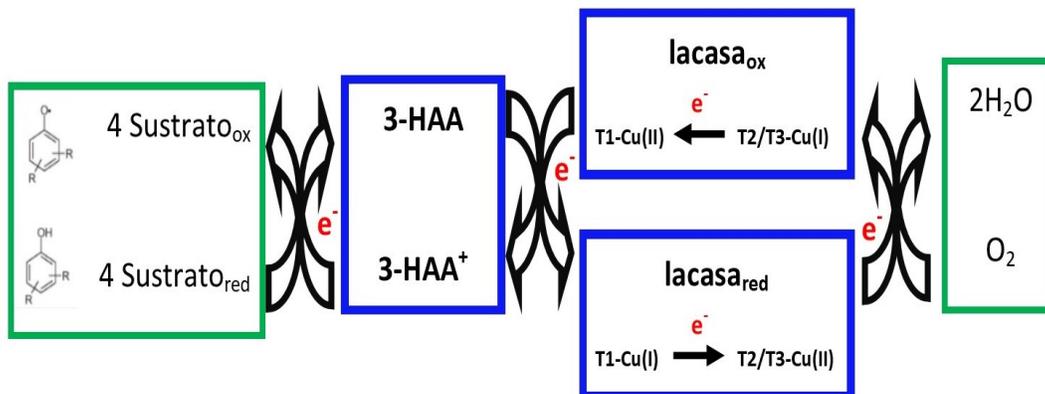


Figura 2.2 Esquema del ciclo catalítico del mediador (3-HAA)/lacasa (Adaptado de Polak [11])

2.2 *Aspergillus niger*

La Sociedad Internacional de Protistólogos propuso una clasificación abreviada de los hongos, dentro de esta clasificación se localiza *A. niger*, por subclase es *Ascomycota*, con las siguientes características: la reproducción sexual implica la meiosis de un núcleo diploide en un asca, originando ascosporas haploides; la mayoría experimentan también reproducción asexual, con la formación de conidiosporas con hifas aéreas especializadas denominadas conidióforos [2]. Este microorganismo es un excelente productor de ácido cítrico [13].

2.2.1 Metabolismo de *A. niger*

La producción de ácidos orgánicos por microorganismos es importante en la microbiología industrial e ilustra los efectos de los niveles de metales traza y los equilibrios en la síntesis y excreción de ácidos orgánicos. Los principales productos son los ácidos: cítrico, acético, láctico, fumárico, y glucónico. Hasta el desarrollo de procesos microbianos, la principal fuente de ácido cítrico era el limón, en la actualidad la mayor parte del ácido cítrico se produce mediante microorganismos; el 70% se usa en las industrias alimentarias y bebidas, el 20% en la industria farmacéutica y nutricional, y el resto en otras aplicaciones industriales como la elaboración de: detergentes y productos de limpieza, cosméticos y productos de tocador, entre otras [13]. La tendencia en la producción mundial de ácido cítrico va en aumento, entre los años 2000 y 2012 fue más de 1.4 a 1.7 millones de toneladas de ácido cítrico por año [14, 15].

La esencia de la fermentación del ácido cítrico implica la limitación de las cantidades de los metales traza como el manganeso y el hierro para detener el crecimiento de *Aspergillus niger* en un punto específico de la fermentación. Generalmente se usan concentraciones elevadas de sacarosa (15-18%), y se ha visto que el cobre compensa la inhibición de la producción de ácido cítrico causada por el hierro por encima de 0.2 ppm. El éxito de esta fermentación depende de la regulación y funcionamiento de la vía glucolítica y el ciclo del ácido tricarbóxico (o ciclo del ácido cítrico). Después de la fase de crecimiento exponencial, cuando el nivel de sustrato es elevado, la actividad de la citrato sintetasa aumenta y la actividad de la aconitasa y la isocitrato deshidrogenasa disminuyen. Esto produce una acumulación y excreción del ácido cítrico por el microorganismo estresado, lo anterior se describe en la Figura 2.3 [2, 16].

La ruta metabólica para producir ácidos orgánicos por *A. niger*, está sujeta al efecto de algunas variables consideradas importantes durante la experimentación, como son: la variación del pH, temperatura, aireación, micronutrientes, macronutrientes, sustrato, inóculo, agitación, concentración traza de iones metálicos (Na^+ , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+}), metanol [13-17], entre otras.

La adición de iones metálicos (51 ppb Mn^{2+} , 5 ppb Fe^{3+} , 75 ppb Zn^{2+}) y metanol (4 % v/v) durante la fermentación por *A. niger* provoca una disminución en la producción de biomasa y un incremento en la excreción celular de ácido cítrico [17].

En la regulación metabólica de la síntesis de ácido cítrico por *A. niger* se pueden apreciar dos grupos de metabolitos: aquellos formados por intermediarios glicolíticos (polioles: glicerol, eritrol, arabitol y manitol); estos intermediarios glicolíticos pueden ser producidos por el catabolismo de la glucosa, siguiendo la vía catabólica de la Hexosa Mono Fosfato (HMP), véase Figura 2.3. El otro grupo de metabolitos que siguen la vía catabólica Embden Meyerhof Parnas (EMP); están relacionados con la operación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ácidos orgánicos), véase Figura 2.3 [18].

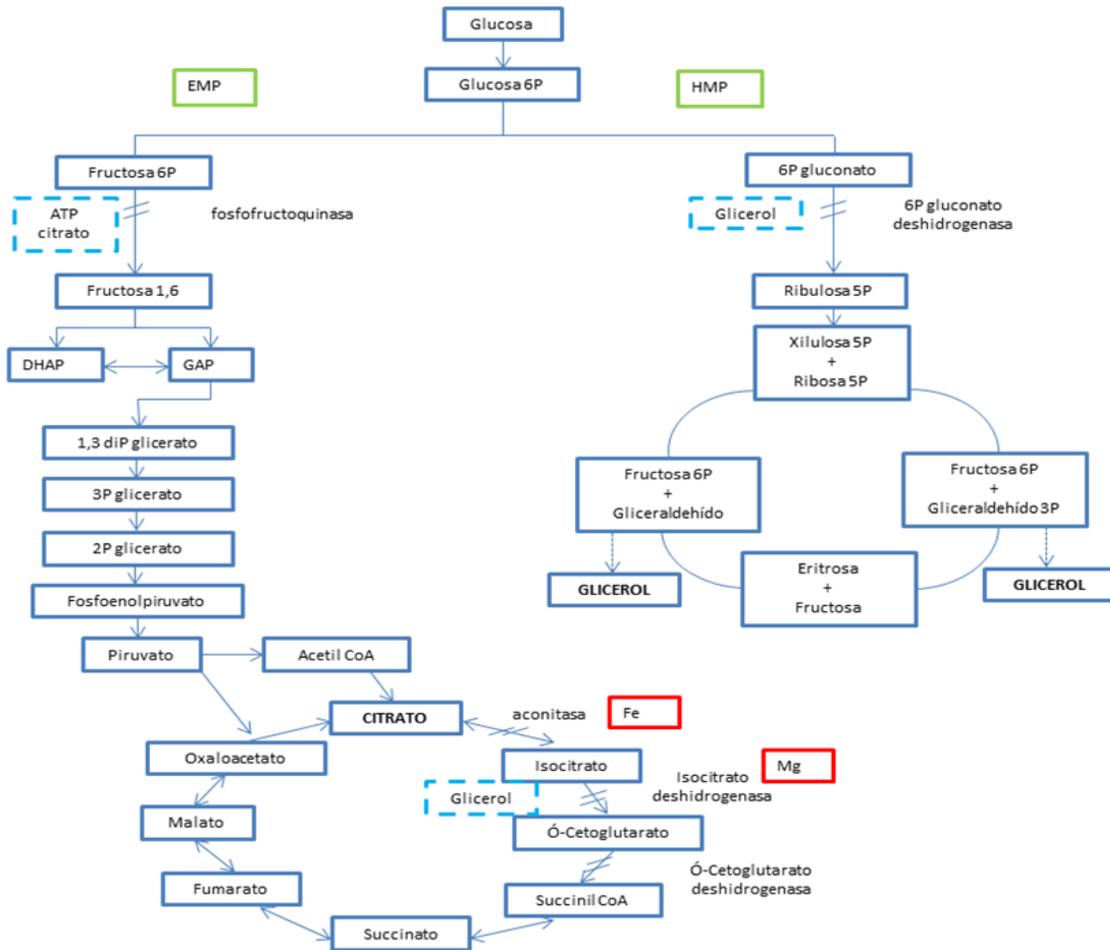


Figura 2.3. Regulación de la producción del ácido cítrico, adaptación de Melzer [18].

// Puntos de regulación — Compuestos que inhiben □ Cofactores

El ciclo del ácido cítrico se realiza en ocho pasos y cada uno es catalizado por una enzima distinta (Figura 2.4) [19], en general los ácidos orgánicos se acumulan por un deficiente

funcionamiento de los ácidos tricarbóxicos (ciclo del ácido cítrico), causado principalmente por inhibición enzimática o por la concentración de cofactores enzimáticos (Figura 2.3) [20].

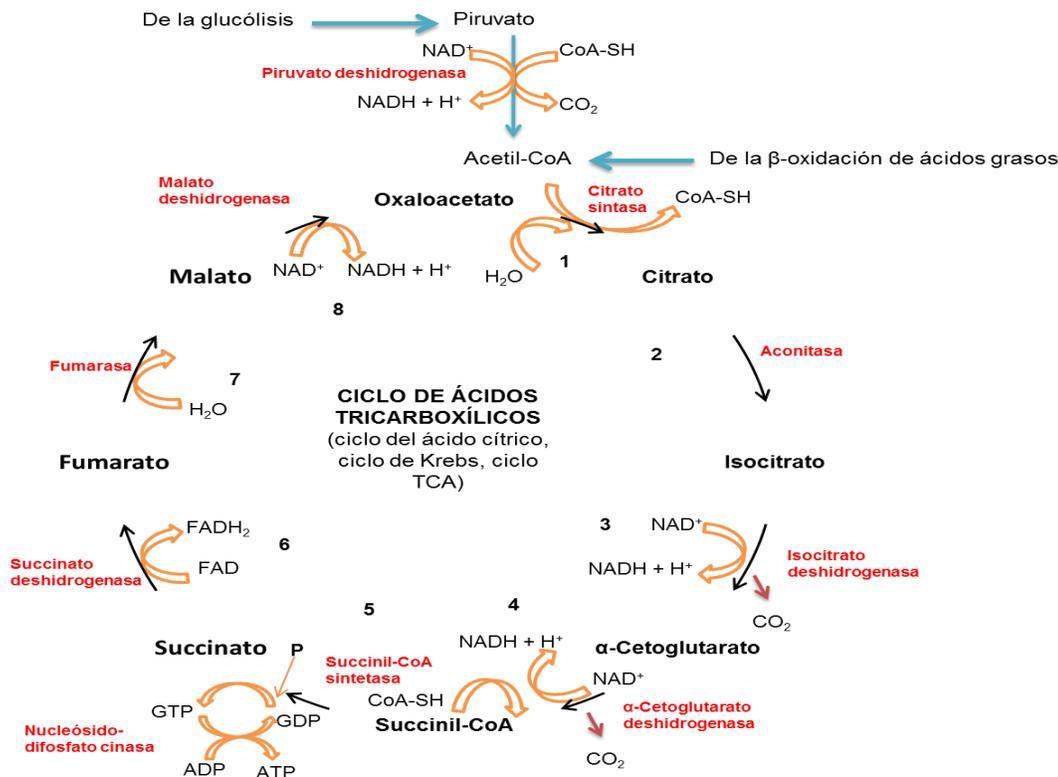


Figura 2.4. Representación esquemática de las enzimas que intervienen en el ciclo de ácidos tricarbóxicos (ácido cítrico) adaptación de Campbell [19].

El efecto de los iones metálicos es de gran relevancia en la actividad enzimática de *A. niger* [16, 17], principalmente en las enzimas clasificadas como conjugadas, las cuales requieren de la participación de por lo menos un compuesto químico no proteico, denominado cofactor enlazado a la cadena polipeptídica. En las enzimas conjugadas se distinguen dos partes; la apoenzima que es la parte proteínica de la enzima, y el cofactor que es la parte no proteica, ésta puede ser una coenzima o iones metálicos (grupo prostético). La combinación de la apoenzima y el cofactor forman la holoenzima [19].

Los tipos de sustratos utilizados para el proceso de obtención de ácido cítrico, contienen una alta cantidad de carbohidratos, en general éstos son variados, por ejemplo, glucosa, melazas de caña y de remolacha, desechos de la industria cervecera, suero de leche, sacarosa, hidrolizados de almidón, jarabes de glucosa, residuos agroindustriales: papa, yuca, bagazo de caña, cáscara de café, cáscara de nuez de karité, salvado de trigo, pulpa de manzana, piña, cáscara de kiwi, pulpa de uva, etc., [13-20].

2.3 *Opuntia ficus-indica*

En la presente investigación se utilizó como sustrato para la obtención de ácido cítrico a *O. ficus-indica*. El nombre científico del nopal según su taxonomía es *O. ficus-indica*, el nopal es una planta carnosa y gruesa de formas diversas, con ramas articuladas; esta planta tiene

una cutícula muy gruesa casi todas con espinas; los nopales poseen una estructura a partir de la cual desarrollan pencas (cladodios), raíces, fruta (tuna) y flores [21, 22].

2.3.1 Producción de nopal en la Ciudad de México.

La superficie destinada al cultivo de nopal en la Ciudad de México es de 2,104.38 hectáreas, obteniendo una producción total de 124,721.78 toneladas de nopal por año, en el año 2007, esto indica que por cada hectárea se producen 59.27 toneladas de nopal. La distribución de la superficie destinada al cultivo del nopal en la CDMX se distribuye de la siguiente manera, por Alcaldía: Milpa Alta (1,616.23 ha), Tláhuac (473.39 ha), Xochimilco (9.92 ha), La Magdalena Contreras (2 ha), Tlalpan (1.81 ha), Cuajimalpa de Morelos (1 ha), Álvaro Obregón (0.03 ha) [22].

De la superficie total destinada al cultivo de nopal en la Ciudad de México, el 0.2 % va a quema controlada, es decir, 249.44 toneladas de nopal por año. Esta quema se realiza durante el manejo del cultivo del nopal, la cual genera residuos, ya sea por poda o sustitución de plantas viejas. La poda se suele hacerse para eliminar pencas en mal estado, y desechar las que se encuentran dañadas por plagas y enfermedades [21].

El caso de la Alcaldía Milpa Alta, Ciudad de México, donde el nopal se distribuye y vende en el “Centro de acopio de nopal-verdura”, ubicado en dicha Alcaldía, se generan de 1.5 a 2 toneladas al día de residuos al retirar espinas del nopal, por lo que anualmente se generan 547.5 toneladas de residuos de nopal (información proporcionada por la administración del “Centro de acopio de nopal-verdura”, marzo de 2016). De acuerdo con la Ley General de Prevención y Gestión Integral de Residuos (LGPGIR, última reforma publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 19 de enero del año 2018) en su artículo 5°, fracción XII, se clasificará a cualquier actividad que genere una cantidad igual o mayor a 10 toneladas en peso bruto total al año de residuos como gran generador. Es por lo anterior, que este residuo (espinas de nopal) es considerado actualmente como de “manejo especial” [23].

2.3.2 Composición de *O. ficus-indica*

Un estudio realizado por Yang [24] reportó que la composición en peso seco de cladodio contiene: lignina en un 12.3 %, celulosa en un 13.1 %, hemicelulosa en un 18.5 %, proteína 7.4 %, ceniza 23.7 %, entre otros. Para el mismo estudio, cuando se analizó el porcentaje de ceniza por medio de Fluorescencia de rayos X por energía dispersiva, se identificaron los siguientes elementos (% de masa atómica): 2 % Na, 18 % Mg, 40 % Ca, 1 % Mn, 1 % Cl, 4 % P, 2 % S, y 34 % K, los cuales como ya se hizo mención, son necesarios en el metabolismo de *A. niger* y *P. cinnabarinus*.

Otra investigación desarrollada por Malainine [25] reportó la siguiente composición en peso seco de cladodio de *O. ficus-indica*: lignina en un 3.6 %, celulosa en un 21.6 %, otros polisacáridos en un 48 %, ceniza en un 19.6 %, entre otros. Así también reportó la siguiente composición en peso seco para espinas de *O. ficus-indica*: lignina en un 1.2 %, celulosa cristalina en un 47.9 %, otros polisacáridos en un 48.4 %, ceniza en un 1.3 %, entre otros. Como se pudo observar, las espinas de nopal tienen menor porcentaje de lignina y mayor porcentaje de celulosa, en comparación a las composiciones reportadas para el bagazo de cladodio [24, 25].

En relación a la hemicelulosa presente en *O. ficus-indica*, una investigación realizada por Mayer [26] reportó la siguiente composición en peso seco de cladodio de *O. ficus-indica*:

8.33 % de hemicelulosa para cladodios cultivados en invernadero y 4.95 % de hemicelulosa para cladodios cultivados en campo. En cuanto a la fibra detergente ácida (FDA) que es usada para determinar el contenido de lignina y celulosa, Mayer [26] encontró que para los cultivos en invernadero se determinó un 9.1 % de FDA y para los cultivos en campo se determinó un 21.1 % de FDA.

Además de las composiciones antes referidas, es importante señalar que *O. ficus-indica* se compone también de pectinas, donde el principal componente de las pectinas es una cadena principal lineal compuesta de unidades de ácido α -D-galacturónico unidas por enlaces glicosídicos (1 \rightarrow 4). Aproximadamente el 5-10 % en peso del ácido galacturónico son azúcares neutros: ramnosa, arabinosa, galactosa, xilosa y glucosa [27]. El estudio desarrollado por Lefsih [27] encontró que el cladodio de *O. ficus-indica* en peso seco contiene 5.14 % de pectina.

Se muestra en la Figura 2.5 una adaptación de la composición de la lignocelulosa de *O. ficus indica* de acuerdo con las investigaciones de Yang y Vignon [24, 28], en dicha imagen se hace una proyección desde un nivel macroscópico hasta uno molecular. En las capas moleculares de la lignocelulosa de nopal se representa su composición química, en un principio está la pectina fácilmente soluble en agua, posteriormente la lignina, seguida la hemicelulosa y la celulosa (de derecha a izquierda: corteza, capa media, capa interior).

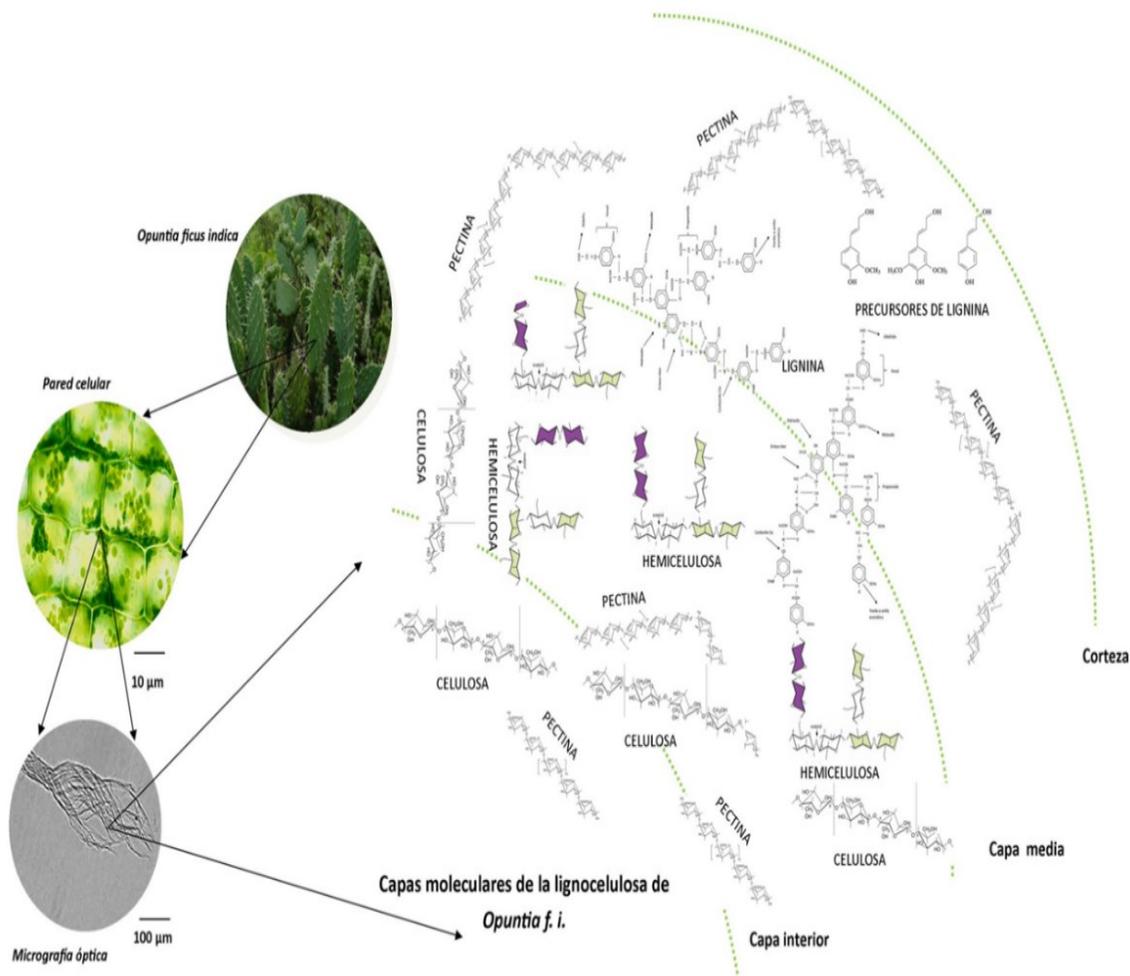


Figura 2.5. Composición de la lignocelulosa de *O. ficus indica* (Adaptación de Yang y Vignon) [24, 28].

2.4 Ruta metabólica de la celulosa

La evolución del metabolismo aeróbico, en el que los nutrientes son oxidados a dióxido de carbono y agua, constituye un paso importante de la historia de la vida sobre la Tierra, por ejemplo, en los suelos bien aireados la celulosa es utilizada como fuente de macro y micronutrientes por microorganismos que tienen la capacidad de hidrolizarla, algunos de estos microorganismos pueden ser aerobios como hongos, mixobacterias y otras eubacterias, o anaerobios como protozoos y bacterias, así como bacterias facultativas [2].

En general, el metabolismo consiste del catabolismo, que es la descomposición oxidativa de nutrientes, y el anabolismo, que es la síntesis reductiva de biomoléculas. El ciclo del ácido cítrico es anfibólico, lo que significa que desempeña un papel tanto en el catabolismo como en el anabolismo, durante el metabolismo aeróbico ocurren tres procesos: el ciclo del ácido cítrico, el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa [19], en la Figura 2.6 se muestra la relación central del ciclo de los ácidos tricarboxílicos con el catabolismo.

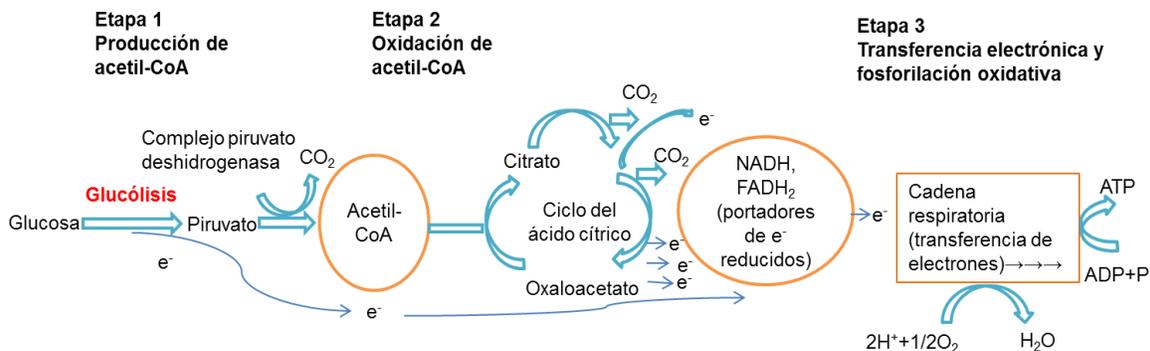


Figura 2.6. Relación central del ciclo del ácido cítrico con el catabolismo, adaptación de Campbell [19].

Como se expuso previamente, la biomasa lignocelulósica se compone principalmente por lignina, celulosa y hemicelulosa, por lo que dicha biomasa al ser un sustrato complejo requiere una variedad de enzimas actuando en sinergia para su hidrólisis completa [7]. En 1950 Reese [29] explicó el mecanismo de la hidrólisis enzimática de la celulosa, donde la celulosa sería activada por un factor de hinchamiento o activador, enzima no hidrolítica C1; en seguida intervendría una enzima hidrolítica Cx; la celobiosa y otros celooligosacáridos producidos, serían hidrolizados hasta glucosa por la enzima β -Glucosidasa, a continuación se ejemplifica el modelo de Reese: $(Celulosa \xrightarrow{C1} Celulosa\ activada \xrightarrow{Cx} Celobiosa \xrightarrow{\beta-Glucosidasa} Glucosa)$ [29].

Generalmente como una simplificación válida del mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa, se acepta el modelo de Montencourt donde la ruta metabólica de la celulosa está catalizada por enzimas conocidas como *celulasas* (*enzimas celulolíticas*) [30]. Investigaciones realizadas en hongos como: *Trichoderma viride*, *Penicillium pinophilum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus niger*, entre otros, coinciden con el modelo de Montencourt, es decir, generalmente el sistema de las *celulasas* para hidrolizar celulosa, está constituido por tres tipos de enzimas: **1.** Las endoglucanasas o 1,4- β -D-glucano-4-glucanohidrolasas (EC.3.2.1.4), las cuales hidrolizan los enlaces β -1,4 en el interior de la macromolécula simultáneamente y determinan la formación de grandes fragmentos de cadena con los extremos libres. **2.** Las exoglucanasas, que incluyen 1,4- β -D-glucano-glucanohidrolasas (celodextrinasas) (EC 3.2.1.74) y 1,4- β -D-glucano-

celobiohidrolasas (celobiohidrolasas) (EC.3.2.1.91) las cuales hidrolizan progresivamente en los extremos reductores y no reductores de las cadenas del polisacárido, liberando glucosa (glucanohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasas). 3. Las β -glucosidasas o β -glucosidasa hidrolasas (EC.3.2.1.21) hidrolizan las celodextrinas solubles y la celobiosa a glucosa [7, 30, 31], véase Figura 2.7 donde se tiene la representación esquemática de los sitios de actuación de las distintas enzimas celulolíticas [31].

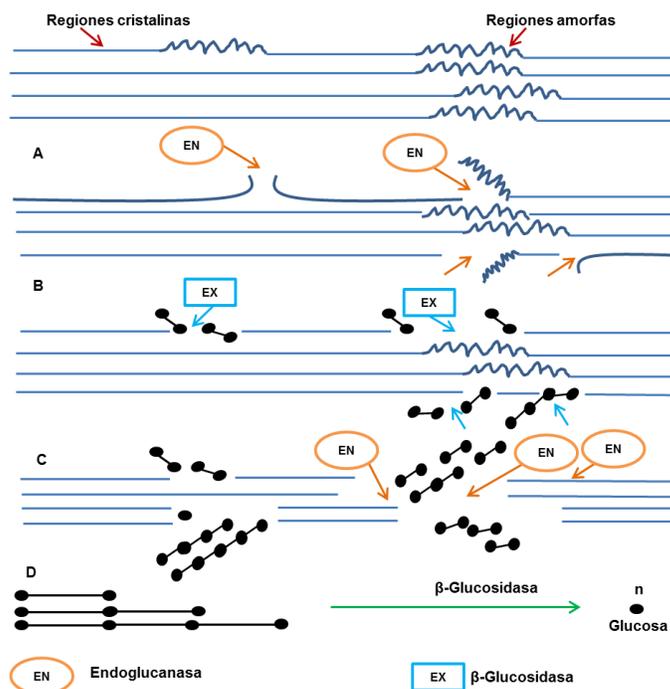


Figura 2.7. Representación esquemática de los sitios de actuación de las distintas enzimas celulolíticas, modelo de Montenecourt. Adaptado de Lucas [31].

2.5 Inmovilización de células

La inmovilización de células es la unión de células o su inclusión en distintas fases sólidas que permiten el intercambio de sustratos, productos, inhibidores, etc., pero que al mismo tiempo separan las células de la fase que las rodea y que contiene los sustratos y productos [19].

A partir de la implementación exitosa de algunos bioprocesos, se ha comenzado a indagar en esta área de la biotecnología. Sin embargo, debido a las diferencias entre las enzimas aisladas y las células, la importancia relativa de estos métodos es también diferente. No existe un método ni un soporte ideal aplicable universalmente: éstos han de seleccionarse en función de las características concretas del biocatalizador, de las necesidades particulares del medio de reacción, de las condiciones requeridas por los sustratos y productos, y del reactor [7, 14].

El método de inmovilización por atrapamiento (entrampamiento) es la estrategia más común en la inmovilización de células enteras, mediante la técnica de atrapamiento se logra inmovilizar enzimas y células en matrices poliméricas altamente **hidrofilicas** como agar-agar, alginato, k-carragenato, **celulosa** y sus derivados, el colágeno, la gelatina, resinas

epoxy, resinas poliacrilamida, poliéster, poliestireno y poliuretano. De igual forma la adsorción natural sobre materiales de soporte porosos e inertes, es un método de inmovilización de células en procesos biotecnológicos, la inmovilización por adsorción se suele analizar mediante los siguientes criterios: carga de biomasa, fuerza de adhesión, estabilidad enzimática, actividad específica del biocatalizador, efectividad, ingeniería de reacción y estabilidad operativa. [32]. Para ambos métodos de inmovilización, los biocatalizadores inmovilizados pueden ser usados de modo repetido y continuo [2].

El atrapamiento se basa en la inclusión de las células en una red rígida para evitar la difusión de las células al medio circundante, en tanto que permite la difusión del resto de los sustratos. Otros métodos de inmovilización como el de adsorción, enlace covalente, entrecruzamiento y encapsulamiento han sido usados para la inmovilización de enzimas principalmente [14, 32].

Por otro lado, es importante resaltar que, si la biomasa se inmoviliza en soportes biodegradables y porosos, daría lugar a una combinación de las propiedades físicas de la matriz sólida con el potencial bioquímico del microorganismo inmovilizado [32].

2.6 Diseño de experimentos con varios factores.

En la mayoría de las áreas de la ingeniería y las ciencias se llevan a cabo experimentos, y éstos componen un recurso fundamental para conocer la forma en que operan los sistemas y los procesos. La validez de las conclusiones que se sacan de un experimento depende en gran medida de la manera en que éste se ejecuta.

El diseño experimental factorial es una técnica que nos facilita la comprensión de un experimento con dos o más factores, en general, en un diseño experimental factorial los ensayos (o corridas) experimentales se realizan para todas las combinaciones de los niveles de los factores (aleatorizados). Una aplicación generalizada de dicha técnica es en el desarrollo de nuevos procesos y en el diseño de nuevos productos [33].

2.6.1 Experimentos de caracterización de un proceso.

Un proceso tendrá quizá muchas variables, las cuales por lo general no tendrán la misma importancia, debido a esta premisa en los experimentos se tienen variables controlables, las cuales se consideran de mayor relevancia en comparación con las variables no controlables. En ocasiones, a los factores que no se pueden controlar se les llama factores de ruido.

Como ejemplo, en la Figura 2.8 se muestra una representación esquemática del proceso de obtención de ácido cítrico.

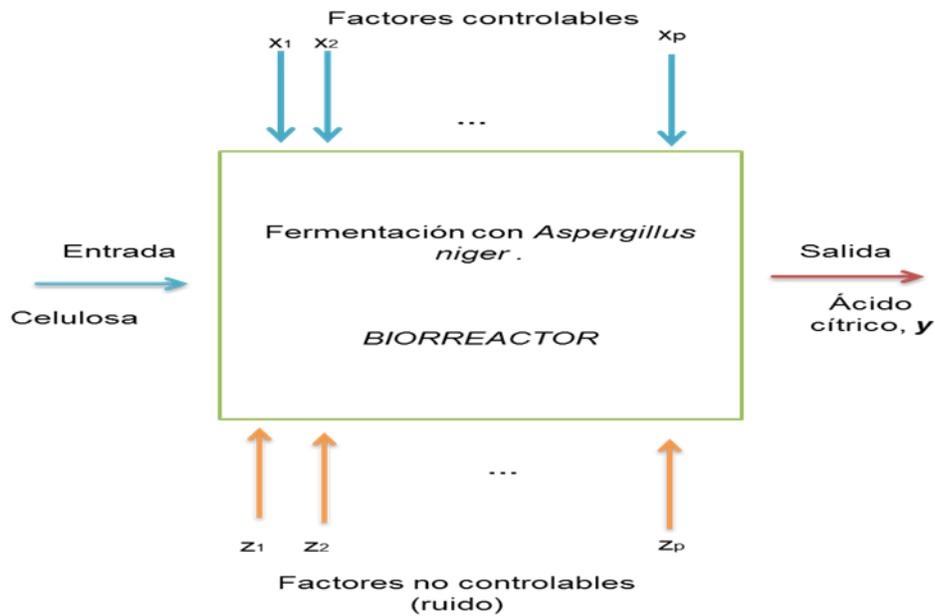


Figura 2.8. Diagrama de experimento para fermentación con *A. niger* (Biorreactor), adaptado de Montgomery [33].

En los experimentos de caracterización de un proceso el interés se centra en determinar qué factores intervienen en la variable respuesta (tanto los controlables como los no controlables). El diseño de experimentos permite estimar la magnitud y dirección de los efectos de los factores.

En ocasiones, a un experimento como éste se le llama experimento tamiz, de selección o exhaustivo. La información de este estudio de caracterización o experimento tamiz puede ayudar a determinar las variables críticas del proceso, así como la dirección del ajuste de estos factores a fin de reducir el número de defectos, y contribuir a determinar que valores del proceso deberán someterse a control estricto durante su operación.

En un experimento de caracterización, el interés se centra en determinar qué factores afectan la respuesta. El siguiente paso lógico es determinar la región de los factores importantes que producen la mejor respuesta [33].

2.6.2 Experimentos factoriales

Cuando en un experimento hay varios factores de interés, deberá usarse un diseño experimental factorial. En estos experimentos los factores se hacen variar en conjunto. Por *experimento factorial* se entiende que en cada ensayo completo o réplica del experimento se investigan una combinación particular de los factores.

Por tanto, si hay 3 factores **A**, **B** y **C** con **a** niveles del factor **A**, **b** niveles del factor **B** y **c** niveles del factor **C**, entonces cada réplica incluye todas las combinaciones de tratamiento **abc**.

El *efecto* de un factor se define como el cambio en la respuesta que produce un cambio en el nivel del factor. A éste se le llama efecto principal porque se refiere a los factores

primarios del estudio. Cabe resaltar que los experimentos factoriales son la única manera de descubrir interacciones entre factores.

El diseño 2^k para $k \geq 3$ factores, 3 factores con dos niveles por factor, 2^3 tiene ocho corridas o combinaciones de tratamiento. Este diseño permite estimar tres factores principales (**A**, **B** y **C**) junto con tres interacciones de dos factores (**AB**, **AC** y **BC**) y una interacción de tres factores (**ABC**). En ocasiones a un diseño 2^k con una sola réplica se le llama diseño factorial 2^k no replicado [33].

2.6.3 Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)

Las superficies de respuesta son un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles en aplicaciones donde una respuesta de interés recibe la influencia de varios factores y el objetivo es optimizar esta respuesta. La superficie de respuesta puede representarse gráficamente para apreciar su forma. En la mayoría de los problemas de MSR, se desconoce la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes. La forma de la superficie de respuesta es importante para elegir el modelo que describa la verdadera relación entre la variable dependiente y las variables independientes [33].

La MSR ha sido aplicada en diferentes estudios para optimizar la producción de ácido cítrico en función de factores controlables durante el proceso, demostrando la viabilidad en la mejora del proceso para obtener dicho ácido orgánico. Algunos de estos factores controlables han sido: concentración de sustrato, tiempo de fermentación, inóculo, pH, temperatura, inductores (etanol y metanol), aireación, entre otras condiciones de operación durante la fermentación [14, 15, 34-37].

2.6.4 Regresión lineal múltiple

A un modelo de regresión que contiene más de una variable de regresión se le llama *modelo de regresión múltiple*. La ecuación 1 $Y = \beta_0 + \beta_A x_A + \beta_B x_B + \beta_C x_C + \epsilon$... *ec.* (1) presenta un modelo de regresión lineal múltiple con tres variables independientes o tres regresores.

$$Y = \beta_0 + \beta_A x_A + \beta_B x_B + \beta_C x_C + \epsilon \quad \dots \text{ec. (1)}$$

Donde Y representa la variable dependiente, x_A , x_B y x_C representan las variables independientes, β_A , β_B y β_C son constantes de los efectos principales y ϵ es un término del error aleatorio. Se usa el término *lineal* porque la ecuación 1 es una función lineal de los parámetros desconocidos β_0 , β_A , β_B , β_C (coeficientes de regresión). El modelo de la ecuación 1 describe un plano en el espacio tridimensional de Y , x_A , x_B y x_C .

Donde se supone que el valor esperado del término del error es cero. En general, la variable de respuesta o dependiente Y , puede relacionarse con k variables regresoras o independientes, véase ecuación 2.

$$Y = \beta_0 + \beta_A x_A + \beta_B x_B + \dots + \beta_k x_k + \epsilon \quad \dots \text{ec. (2)}$$

Los modelos de regresión lineal múltiple se usan con frecuencia como funciones de aproximación, es decir, se desconoce la verdadera relación funcional entre Y , x_A , x_B , ... , x_k , pero en ciertos rangos de las variables independientes el modelo de regresión lineal es una aproximación adecuada.

Los efectos de interacción son comunes en el estudio y análisis de sistemas del mundo real, y los métodos de regresión son una de las técnicas que pueden usarse para describirlos, ver ecuación 3.

$$Y = \beta_0 + \beta_A x_A + \beta_B x_B + \beta_C x_C + \beta_{AB} x_A x_B + \beta_{AC} x_A x_C + \beta_{BC} x_B x_C + \beta_{ABC} x_A x_B x_C + \epsilon \dots \text{ec. (3)}$$

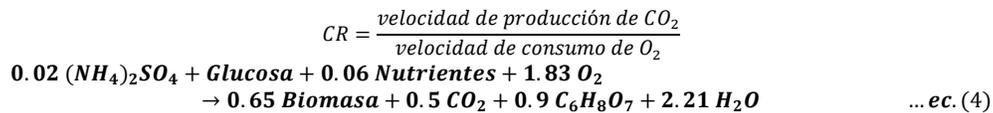
Donde Y es la respuesta calculada o variable dependiente, β_0 es el efecto promedio global, x_A , x_B y x_C son variables independientes (efectos principales), β_A , β_B , β_C , β_{AB} , β_{AC} , β_{BC} y β_{ABC} son constantes de los efectos principales y sus interacciones de la regresión lineal múltiple [34].

2.7 Modelado en procesos de fermentación por lote

Los modelos empleados en la literatura para describir el crecimiento de hongos filamentosos expresan la cantidad de microorganismo presente en el medio de cultivo en términos de biomasa, en el caso de *Aspergillus niger* cuantifican la germinación de las conidiosporas y el crecimiento de las hifas del microorganismo, empleando el modelo cinético de Monod para su descripción [38].

Otros se basan en la ingeniería de las rutas metabólicas, estos van enfocados a predecir la formación de biomasa, consumo de sustrato, formación de producto, entre otros metabolitos [18], en el caso de los esquemas metabólicos, estos son complicados, ya que es casi imposible poder medir simultáneamente a todas las especies o conocer a detalle el funcionamiento regulatorio de las diversas enzimas, por ejemplo, la red metabólica para *A. niger*, está constituida por 1190 reacciones y 1045 metabolitos distribuidos en tres compartimentos: extracelular, citoplasmático y mitocondrial [39].

La presente investigación se basa en modelos cinéticos para fermentadores por lote, la ecuación estequiométrica para producir ácido cítrico por *A. niger* es la que se presenta en la ec. 4, con un coeficiente de respiración (CR) para el crecimiento del microorganismo de $CR = 0.27$ [1], donde:



A continuación, se presentan las ecuaciones que describen el modelado en procesos de fermentación por lote [1, 20].

- Para el crecimiento de la Biomasa:

$$\frac{d(C_{Xv})}{dt} = \mu_m \left(\frac{C_S}{K_s + C_S} \right) C_{Xv} - K_d C_{Xv} \dots \text{ec (5)}$$

Donde:

C_{Xv} es la concentración de células viables (Kg células viables $\cdot m^{-3}$)

C_S es la concentración de sustrato limitante (Kg sustrato $\cdot m^{-3}$)

μ_m es la velocidad específica máxima de crecimiento (h^{-1})

K_s es la constante de saturación (Kg sustrato $\cdot m^{-3}$)

K_d es la constante de muerte celular (Kg células no viables $\cdot Kg^{-1}$ células viables $\cdot h^{-1}$)

- Para el consumo de Oxígeno Disuelto (O.D.):

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = K_{La}(C_{sat} - C_{O_2}) - \left[\left(\frac{\mu_m C_S C_{Xv}}{K_S + C_S} \right) - K_d C_{Xv} \right] \left(\frac{1}{Y_{x/s}} \right) - m_s C_{Xv} \quad \dots ec (6)$$

Donde:

C_{O_2} es la concentración de Oxígeno (Kg O₂ · m⁻³)

K_{La} es el coeficiente de transferencia de Oxígeno (Kg O₂ · m⁻³ · h⁻¹)

C_{sat} es la concentración de Oxígeno, punto de saturación (Kg O₂ · m⁻³)

$Y_{x/s}$ es el coeficiente estequiométrico de rendimiento de sustrato consumido para formar biomasa (Kg biomasa · Kg⁻¹ sustrato utilizado)

m_s es el coeficiente de consumo de sustrato para mantenimiento celular en estado viable (Kg sustrato · Kg⁻¹ células viables · h⁻¹)

- Para el consumo de Sustrato:

$$\frac{dC_S}{dt} = - \left[\left(\frac{\mu_m C_S C_{Xv}}{K_S + C_S} \right) - K_d C_{Xv} \right] \left(\frac{1}{Y_{x/s}} \right) - m_s C_{Xv} - \frac{C_P}{Y_{p/s}} \quad \dots ec (7)$$

Donde:

C_P es la formación de producto (Kg producto · m⁻³ · h⁻¹)

$Y_{p/s}$ es el coeficiente estequiométrico de rendimiento de sustrato consumido para formar producto (Kg producto · Kg⁻¹ sustrato utilizado)

- Para la formación de Producto:

$$\frac{dC_P}{dt} = \alpha \left(\frac{\mu_m C_S C_{Xv}}{K_S + C_S} - K_d C_{Xv} \right) + \beta C_{Xv} \quad \dots ec (8)$$

Donde:

α es el coeficiente de formación de producto asociado al crecimiento celular (Kg producto · Kg⁻¹ células)

β es el coeficiente de formación de producto no asociado al crecimiento celular (Kg producto · Kg⁻¹ células)

El anterior sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias puede resolverse utilizando software como Matlab® o Mathematica®, por mencionar algunos. Dicho sistema requiere de valores numéricos en los parámetros biocinéticos (μ_m , K_d , K_s , m_s , α , β), los cuales pueden ser estimados con optimización computacional a partir de datos experimentales, por métodos experimentales o basándose en la literatura.

Es evidente que el campo de estudio en la obtención de ácido cítrico no es algo nuevo, sin embargo, en la actualidad se investiga sobre alternativas para su obtención, como se pudo apreciar anteriormente unas de las propuestas más prometedoras son a partir de residuos de distintos procesos donde los carbohidratos están en estado sólido y/o disuelto.

De acuerdo con todo lo discurrido hasta el momento, se mostró suficiente evidencia para inferir que las espinas de *Opuntia ficus-indica* pueden ser biotransformadas a ácido cítrico, por lo que, en la presente investigación se experimentó con residuos del cultivo del nopal provenientes de la Ciudad de México, en una primera etapa del proyecto se trabajó con *Pycnoporus cinnabarinus*; su metabolismo contribuyó a la deslignificación de la materia prima para obtener celulosa; en una segunda etapa del proyecto se usó una cepa de *Aspergillus niger*; capaz de sacarificar la celulosa para producir dicho ácido orgánico.

3. Justificación

México, como otros países, se enfrenta a problemas ambientales que alteran el equilibrio de los ecosistemas, destruyendo la biodiversidad y en muchos de los casos provocando daños a la salud de los humanos.

La implementación de procesos biotecnológicos para una producción limpia a partir de materias primas provenientes de residuos agroindustriales, representa una alternativa para el aprovechamiento integral de dichos residuos y además lo hace un proceso amigable con el medio ambiente. En estos procesos, la biomasa empleada está dentro del ciclo biogeoquímico del Carbono, lo cual indica que estos procesos son parte, a su vez, de los que se llevan a cabo en la naturaleza.

En la Ciudad de México la “quema controlada” de la biomasa residual en el cultivo de *O. ficus-indica*, representa un problema de contaminación, es decir, las 249.44 toneladas de residuos generados anualmente en esta actividad agroindustrial podrían ser destinadas para obtener productos de valor agregado, como el ácido cítrico, la importancia en la obtención de ácido cítrico es debido a sus múltiples aplicaciones en la industria del alimento, farmacéutica, cervecera, ambiental, entre otras.

La diversidad de enzimas que poseen los basidiomicetos para degradar el contenido de lignina presente en biomasa lignocelulósica es una característica prometedora para la industria de la pulpa de papel, ya que podría permitir una reducción sustancial en el uso de cloro, disminuyendo así su impacto medioambiental, en particular el hongo *P. cinnabarinus* puede deslignificar las espinas del nopal con el fin de obtener celulosa. Posteriormente se puede hacer uso de la diversidad enzimática que poseen los ascomicetos y sacarificar la celulosa producida por *P. cinnabarinus*, en específico el hongo *A. niger* puede hidrolizar enzimáticamente la celulosa y obtener ácido cítrico. De esta manera se generaría el acoplamiento de un bioproceso que reciclaría y disminuiría la liberación de Carbono al medio ambiente. Esto a su vez tendría un beneficio en el sector industrial de la pulpa de papel, así como el dedicado a la producción de ácido cítrico, y en el sector agroindustrial que cultiva el nopal.

El bioproceso estudiado en la presente investigación representa una alternativa sustentable para utilizar residuos agroindustriales, generados en la Ciudad de México, de esta manera se obtiene un producto con valor agregado, toda vez que, se evita la disposición mediante la “quema controlada”, en dicho bioproceso se utilizó al microorganismo *P. cinnabarinus* en biorreactores (por lote) de tanque agitado, para despolimerizar la lignocelulosa de *O. ficus-indica* y obtener celulosa. Posteriormente dicha celulosa fue biotransformada a ácido cítrico, empleando para ello a *A. niger*, ambos bioprocesos operaron en condiciones reportadas en la literatura.

4. Planteamiento del Problema

Las emisiones de Carbono hacia la atmósfera en la Ciudad de México pueden ser reducidas, disminuyendo la incineración de los residuos agroindustriales, como los generados durante la cosecha de *O. ficus-indica* (249.44 toneladas anuales). Una alternativa es la implementación de bioprocesos que utilicen este residuo agroindustrial.

4.1 Hipótesis

- La designificación de los residuos del nopal por acción del metabolismo extracelular de *P. cinnabarinus* podrá generar celulosa, la cual será biotransformada a ácido cítrico por *A. niger*.

4.1.1 Objetivos

Objetivo general

Desarrollar un proceso biotecnológico para obtener ácido cítrico con *A. niger*, utilizando como materia residuos de *O. ficus-indica*.

Objetivos específicos

1. Evaluar a *P. cinnabarinus* durante la designificación de la lignocelulosa de *Opuntia ficus-indica* para biotransformarla a celulosa.
2. Evaluar a *A. niger* para sacarificar la celulosa de *Opuntia ficus-indica* y posteriormente biotransformarla a ácido cítrico.
3. Optimizar la producción de celulosa por *P. cinnabarinus*, variando el tamaño de partícula, el pH y la temperatura.
4. Optimizar la producción de ácido cítrico de *A. niger*, variando la composición del medio de cultivo, pH y concentración de celulosa.
5. Modelar y simular el proceso de obtención de ácido cítrico.

5. Metodología

La experimentación se llevó a cabo en el Laboratorio de Procesos catalíticos, edificio W, tercer piso, UAM-Azcapotzalco; el Laboratorio de Análisis de Procesos de la UAM-A, proporcionó las cepas puras de los microorganismos: *P. cinnabarinus* y *A. niger*.

La materia prima (espinas de nopal) se obtuvo de los contenedores destinados a recolectar los residuos generados en el Centro de acopio de nopal-verdura, ubicado en la Alcaldía Milpa Alta, Ciudad de México (véase Figura 5.9 y Figura 5.10).



Figura 5.9. Ubicación del Centro de acopio de nopal-verdura, Alcaldía Milpa Alta, Ciudad de México.



Figura 5.10. Contenedores de residuos generados en el Centro de acopio de nopal-verdura, Alcaldía Milpa Alta, Ciudad de México.

5.1 Pretratamiento de los residuos de *O. ficus indica*.

Para poder utilizar las espinas del nopal en este proceso fue necesario retirar humedad de la materia prima, lo cual se llevó a cabo utilizando un horno a 60 °C. Las espinas de nopal secas se trituraron y se tamizaron, a dos tamaños de partícula (0.25 y 0.074 mm); con el fin de observar el efecto de esta variable sobre la obtención de celulosa, véase Figura 5.11.



Figura 5.11. Espinas de nopal

5.2 Resiembra y propagación de hongos

5.2.1 Cepa de *P. cinnabarinus*

Para contar con la biomasa necesaria de *P. cinnabarinus* para llevar a cabo los experimentos se llevó a cabo la resiembra de *P. cinnabarinus* en tubos de agar inclinado y botellas Roux, como se describe a continuación:

- Para la resiembra en tubos de agar inclinado se preparó el siguiente medio de cultivo: 10 g/L de glucosa, 3 g/L de extracto de levadura, 3 g/L de extracto de malta, 5 g/L de Bacto triptona, 20 g/L de agar, se inoculó utilizando el tubo que contenía la cepa pura del hongo, con ayuda de un asa bacteriológica estéril, se tomó suavemente esporas del microorganismo, y se depositó en el medio de cultivo sin inocular, desde el fondo del tubo hasta la boca del mismo, trazando un zigzag en toda la superficie.
- Para la propagación (*crecimiento del microorganismo con una abundante esporulación*) del hongo en botellas Roux, se usó el mismo medio de cultivo colocado en los tubos de agar inclinado, con la única diferencia que para la propagación se adiciona 1 mL/L de oligoelementos, durante la inoculación en botella Roux se utilizó un asa bacteriológica estéril y la técnica de punto.

La solución de oligoelementos que se utilizó tenía la siguiente composición: 0.5 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.2 g/L de H_3BO_3 , 0.16 g/L de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.16 g/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.2 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Los medios de cultivo se esterilizaron a 121 °C y 15 psi, durante 15 minutos, en una autoclave de la marca Tomy y modelo SX 700.

La incubación se llevó a cabo a 25 °C durante 12 horas, luego se incrementó la temperatura a 30 °C, al tercer día se observó la esporulación del microorganismo, al día 5 se detuvo la incubación, posteriormente se refrigeraron los tubos y botellas Roux a 5 °C para usar la biomasa como inóculo en los biorreactores.

5.2.2 Cepa de *A. niger*

Para contar con los microorganismos necesarios para llevar a cabo los experimentos se llevó a cabo la resiembra de *A. niger* en tubos de agar inclinado y botellas Roux, como se describe a continuación:

- Para la resiembra en tubos de agar inclinado se preparó el siguiente medio de cultivo: 30 g/L de glucosa, 2.47 g/L de KH_2PO_4 , 6.6 g/L de NH_4NO_3 , 0.38 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.32 g/L de NaCl, 0.124 g/L de FeSO_4 , 0.48 g/L de CaCl_2 , 39 g/L de agar papa dextrosa.
- Resiembra en botella Roux para la propagación, en este caso se preparó el medio de cultivo como se describe para el tubo de agar inclinado y se adiciona 1 mL/L de oligoelementos.

Los medios de cultivo se inocularon y esterilizaron como se describió previamente.

La incubación de *A. niger* se llevó a cabo a 30 °C, al tercer día se observó la esporulación del microorganismo, al día 5 se detuvo la incubación, posteriormente se conservan los tubos y botellas Roux en refrigeración a 5 °C, para usar la biomasa como inóculo en los biorreactores.

Es importante señalar que, el propósito de la resiembra para ambas cepas fúngicas: *P. cinnabarinus* y *A. niger*, fue para renovar los medios de cultivo utilizados para su conservación, mientras fueron usados en las etapas experimentales de la presente investigación.

5.2.3 Extracción de esporas de botella Roux

5.2.3.1 Basidios de *P. cinnabarinus*

Con la finalidad de tener homogeneidad en el inóculo para la inmovilización, se extrajeron las esporas sexuales (basidios) de *P. cinnabarinus* de una botella Roux con 250 mL de una solución estéril que contenía: KH_2PO_4 2.47 g/L, NH_4NO_3 6.6 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.38 g/L, NaCl 0.32 g/L, FeSO_4 0.124 g/L, CaCl_2 0.48 g/L, 1 mL/L de oligoelementos, luego se almacenó en un matraz Erlenmeyer cubierto para evitar contaminación, y refrigeró a una temperatura de 4 °C, todo se realizó en condiciones estériles.

5.2.3.2 Conidiosporas de *A. niger*

Con la finalidad de tener homogeneidad en el inóculo para la inmovilización, se extrajeron las esporas sexuales (conidiosporas) de *A. niger* de una botella Roux con 250 mL de una solución estéril que contenía: KH_2PO_4 2.47 g/L, NH_4NO_3 6.6 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.38 g/L, NaCl 0.32 g/L, FeSO_4 0.124 g/L, CaCl_2 0.48 g/L, 1 mL/L de oligoelementos, luego se almacenó en un matraz Erlenmeyer cubierto para evitar contaminación, y refrigeró a una temperatura de 4 °C, todo se realizó en condiciones estériles.

5.3 Implementación de técnicas analíticas

- Se realizaron curvas de calibración en un espectrofotómetro de UV-Vis, marca: PerkinElmer, modelo: lambda 45, para cuantificar:
 - Glucosa, usando el método del ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) [25].
 - Biomasa, usando el método descrito por Bradford [40].
 - Ácido cítrico, usando el método de la piridina-anhídrido acético [15, 41].

5.3.1 Cuantificación de D-glucosa

Para la determinación de la glucosa se usó el método del ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS). Dicho ensayo consiste en una determinación espectrofotométrica con un espectrómetro de UV-Vis, tras la conversión del carbohidrato en un derivado coloreado, el cual se basa en la reducción del DNS (color amarillo) por la D-Glucosa al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (color rojo ladrillo) y ácido D-glucónico [35].

La finalidad de seleccionar este método cuantitativo es debido a que, se puede utilizar como un ensayo indirecto para la determinación de la actividad de cualquier enzima extracelular, que como producto de la hidrólisis de un sustrato genere algún carbohidrato, por ejemplo: la glucosa o la fructosa [3, 8, 9].

5.3.1.1 Preparación del ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS)

Se disolvieron 30 g de tartrato de sodio en agua destilada, después se agregaron 1.6 g de NaOH (previamente disuelto en agua destilada) y 1 g de DNS (disuelto en agua destilada), esta solución se aforó a 100 mL con agua destilada, se protegió de los rayos de luz almacenando en un frasco color ámbar.

5.3.1.2 Espectro UV-vis del ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS)

Para la cuantificación de la glucosa se elaboró una curva de calibración, utilizando D-Glucosa (Sigma-Aldrich) y el reactivo ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS). Se determinó primero el espectro UV del punto cero, con la finalidad de conocer la longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{máx.}}$), ver Figura 5.12, a esa longitud de onda se analizaron las diluciones que conforman los puntos de la curva de calibración.

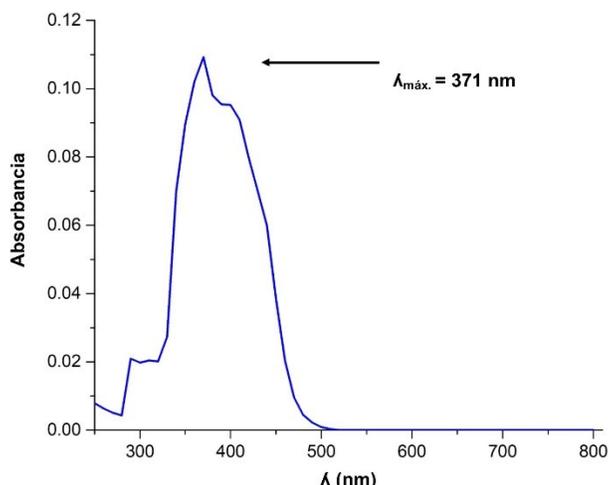


Figura 5.12. Espectro UV-vis del ácido 3,5-Dinitrosalicílico

5.3.1.3 Determinación de la concentración de carbohidratos

Se colocaron 0.5 mL del reactivo de DNS y 0.5 mL de muestra en un tubo de ensayo con rosca de 10 mL, después se homogenizó la solución mediante agitación, se sometió a calentamiento en un baño de agua a ebullición durante 5 minutos. Inmediatamente de que se cumplieron los 5 minutos se colocó el tubo de ensayo en un baño de agua fría durante 10 minutos, posteriormente se añadieron 5 mL de agua destilada y se homogenizó.

Se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro de UV-vis a una longitud de onda $\lambda=371$ nm. El blanco se preparó agregando 0.5 mL del reactivo de DNS y 0.5 mL de agua destilada (el cual se sometió al tratamiento descrito anteriormente).

5.3.1.4 Curva de calibración para cuantificar glucosa

Con 100 mL de una solución de glucosa de 100 ppm se prepararon los puntos de la curva de calibración (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 y 40) ppm de glucosa, y se trataron según la técnica para determinar carbohidratos con el reactivo DNS.

La curva de calibración para la cuantificación de glucosa se muestra en la Figura 5.13, se puede observar que los puntos se aproximan a una recta, con un coeficiente de correlación de 0.9815 y $y= 387.3x + 3.4165$ (y : Glucosa (ppm) y x : Absorbancia).

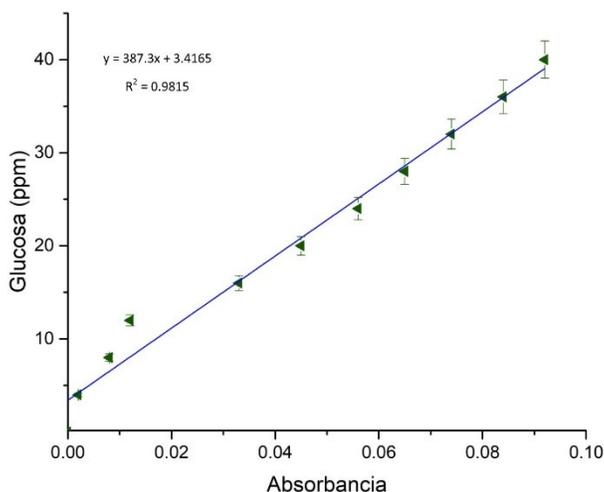


Figura 5.13. Curva de calibración para cuantificar glucosa, $\lambda=371$ nm.

5.3.2 Cuantificación de biomasa

Para la biomasa se usó el método descrito por Bradford [40]. Todas las muestras dispuestas para cuantificar biomasa recibieron el siguiente tratamiento: una hidrólisis ácida con ácido fosfórico 0.75 M para disolver las membranas de la célula, con la finalidad de tener las biomoléculas en suspensión, posteriormente mediante el uso del reactivo Bradford, por efecto del colorante azul de Coomassie G250, el cual se liga a los enlaces peptídicos de la proteína del microorganismo, se tiene que la intensidad del color disminuye por efecto de esta unión, de tal forma que se puede cuantificar esa disminución utilizando un espectrofotómetro de UV-Vis.

5.3.2.1 Preparación de reactivo Bradford

Se pesaron 100 mg de azul de Coomassie G250 (Sigma-Aldrich) y se disolvieron en 50 mL de etanol absoluto. La solución después se mezcló con 100 mL de H_3PO_4 (grado reactivo), se aforó a 1 L con agua destilada, se filtró a través del papel de filtro de Whatman N°1 y después se almacenó en una botella color ámbar.

5.3.2.2 Espectro UV reactivo Bradford

En la cuantificación de biomasa se utilizó el reactivo Bradford. Para la curva de calibración se determinó el espectro UV del punto cero, con la finalidad de conocer la longitud de onda máxima ($\lambda_{m\acute{a}x.}$) ver Figura 5.14, a esa longitud de onda se analizaron todos los puntos de la curva de calibración.

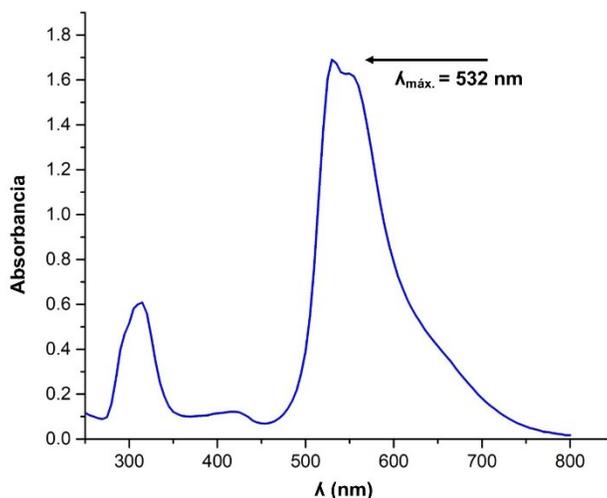


Figura 5.14. Espectro UV del reactivo Bradford

5.3.2.3 Metodología para elaborar curva estándar para determinar biomasa

Se preparó una solución patrón de caseinato de calcio con una concentración de 1000 ppm (grado reactivo, con una composición del 90 % de proteína), de la cual se realizaron diluciones para construir la curva de calibración (0, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800) ppm de caseinato de calcio, y cada dilución se trató como sigue: se colocó 1 mL en un tubo de ensayo con rosca, posteriormente se agregaron 5 mL de reactivo Bradford, se homogenizó para poder leer la absorbancia a $\lambda = 532$ nm. El punto cero en la curva de calibración se realizó con 1 mL de H_3PO_4 0.75 M y 5 mL de reactivo Bradford.

5.3.2.4 Curva de calibración para la biomasa

La curva de calibración para la biomasa se muestra en la Figura 5.15, se puede observar que los puntos se aproximan a una recta con un coeficiente de correlación de 0.9639 y $y = 3090x + 80.991$ (y: Biomasa (ppm) y x: Absorbancia).

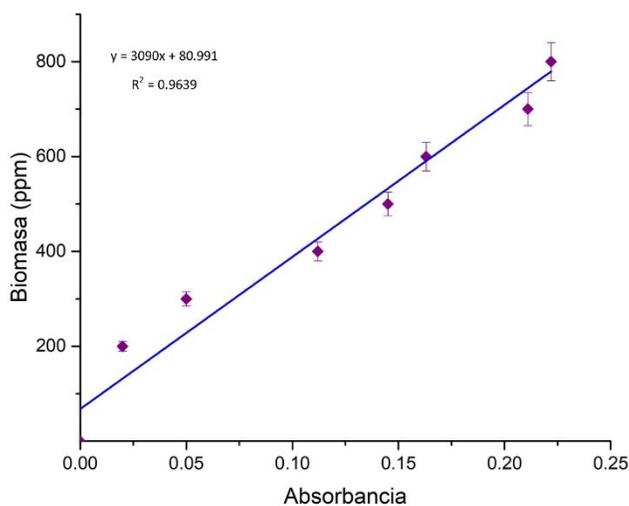


Figura 5.15. Curva de calibración para cuantificar biomasa, $\lambda = 532$ nm.

5.3.2.5 Metodología para cuantificar biomasa de *P. cinnabarinus* y *A. niger* en los biorreactores

Cada muestra obtenida en los biorreactores se filtró en papel filtro con tamaño de poro de 11 μm , el sólido con el papel se colocó sobre una charola de aluminio y se llevó a secar en una estufa a 39 °C durante 24 horas. Una vez secos el papel filtro y la muestra, se colocó la muestra en un matraz Erlenmeyer de 125 mL y se le adicionaron 20 mL de H_3PO_4 0.75 M, para luego con agitación magnética y calentamiento en un baño de agua en ebullición, durante 8 minutos, llevar a cabo la digestión ligeramente ácida de la muestra, posteriormente se filtró la solución. El líquido recuperado (de la digestión ácida) se sometió al tratamiento descrito anteriormente para cuantificar biomasa (1 mL de muestra y 5 mL de reactivo Bradford) y se determinó la absorbancia a $\lambda = 532$ nm.

5.3.3 Cuantificación del ácido cítrico

Para la cuantificación del ácido cítrico se utilizó el método de la piridina-anhídrido acético. Esta determinación espectrofotométrica de UV-Vis consiste en la formación de un compuesto colorido por efecto de la reacción del ácido cítrico con anhídrido acético y posteriormente con piridina a 60 °C, produciendo un compuesto de color rojo oscuro (del color del ladrillo) [15, 41].

5.3.3.1 Método espectrofotométrico de la piridina-anhídrido acético para determinar la concentración de Ácido Cítrico

A partir de una solución patrón de 4000 ppm de ácido cítrico de alta pureza (Sigma-Aldrich), se prepararon soluciones (0, 76, 100, 152, 200, 252, 300, 352 y 400) ppm de ácido cítrico, para construir la curva de calibración. A cada solución de la curva de calibración se le dio el siguiente tratamiento: en un tubo de ensayo con rosca se agregaron 1 mL de solución y 8 mL de anhídrido acético, se tapó el tubo y se sometió a calentamiento en un baño de agua a una temperatura de 60 °C durante 10 minutos; lo anterior con el propósito de poder cuantificar la concentración de ácido cítrico durante el muestreo en la operación de los biorreactores.

Después de ese tiempo se agregó 1 mL de piridina al tubo de ensayo (rápidamente) y se sometió a calentamiento en un baño de agua a temperatura de 60 °C durante 40 minutos. Finalmente se retiró el tubo del baño de agua y se colocó en un baño de agua con hielo (para enfriar súbitamente). Se realizó un punto cero con 1 mL de agua ultrapura el cual recibió el tratamiento descrito anteriormente.

5.3.3.2 Espectro UV de ácido cítrico con piridina y anhídrido acético

En la cuantificación de ácido cítrico con piridina y anhídrido acético se determinó el espectro UV de la solución que contenía 400 ppm de ácido cítrico (debido a que es la reacción con mayor formación de color), con la finalidad de conocer la longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{máx.}}$), ver Figura 5.16, a esa longitud de onda se analizaron todos los puntos de la curva de calibración.

A una longitud de onda de $\lambda = 347$ nm se determinó la absorbancia de cada punto de la curva de calibración, además de las muestras obtenidas durante la operación de los biorreactores, las cuales recibieron el tratamiento del método de la piridina anhídrido acético.

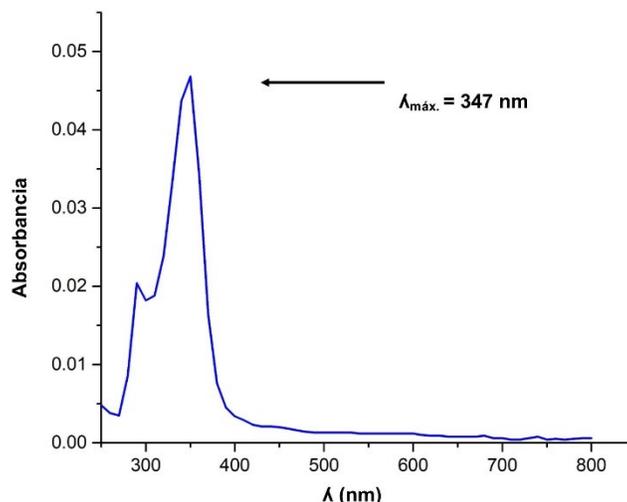


Figura 5.16. Espectro UV de ácido cítrico con piridina y anhídrido acético

5.3.3.3 Curva de calibración para determinar ácido cítrico

La curva de calibración para determinar ácido cítrico se muestra en la Figura 5.17, se puede observar que los puntos se aproximan a una recta con un coeficiente de correlación de 0.95 y $y = 8909.1x + 25.374$ (y : Ácido cítrico (ppm) y x : Absorbancia).

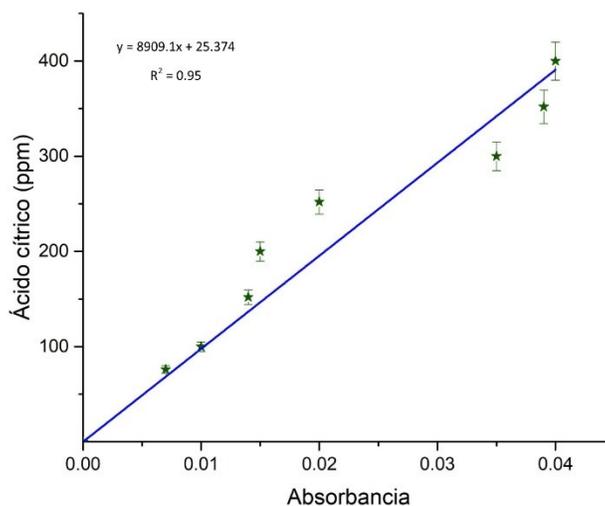


Figura 5.17. Curva de calibración para cuantificar ácido cítrico, $\lambda = 347$ nm.

5.4 Determinación de la composición de las espinas de *O. ficus indica* y el licor post-fermentativo (durante la obtención de ácido cítrico).

5.4.1 Composición de las espinas de *O. ficus indica*

Se realizó una caracterización de la materia prima, conforme a las normas TAPPI T 12 os-75 y TAPPI T 15 os-58 para determinar el porcentaje de fibra detergente ácida (FDA), de lignina, celulosa y cenizas [25]. Las normas antes mencionadas describen tres métodos, se basan en la cuantificación de la fibra detergente ácida (FDA); esta cuantificación se puede llevar a cabo como un análisis separado, sin embargo, el residuo de FDA se requiere para

determinar la lignina, este método consta de una oxidación con permanganato de potasio (KMnO_4). Cabe señalar que, cualquier tanino (como el ácido 3, 4, 5-trihidroxibenzoico, conocido como ácido gálico) también sería eliminado por el KMnO_4 . El residuo de dicha etapa de oxidación contiene principalmente celulosa (además de cutina, que aparece como manchas oscuras en la celulosa blanca) y ceniza mineral. El contenido de celulosa se determina como la pérdida de peso al determinar la ceniza a $500\text{ }^\circ\text{C}$.

La cuantificación del porcentaje de pectina se realizó conforme a los métodos de extracción en medio ácido de pectinas totales descritos por Lefsih [27].

Además, se utilizó un espectrofotómetro infrarrojo marca Bruker, con óptica FT-IR, modelo: Alpha, para monitorear la evolución en la deslignificación.

5.4.2 Caracterización del licor post-fermentativo (ácido cítrico)

La caracterización consistió en someter el licor post-fermentativo obtenido de las biorreacciones con el microorganismo *A. niger*, al proceso cal-sulfúrico para recuperar el ácido cítrico.

En principio, para separar el ácido cítrico del licor post-fermentativo, se realizó una reacción de precipitación utilizando una solución al 33 % m/v de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, en dicha reacción se obtuvo un precipitado conocido como citrato de calcio $\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_{2(s)}$, el cual fue recuperado mediante filtración.

Luego, para recuperar el ácido cítrico del citrato de calcio, se realizó una reacción de precipitación, mezclando el $\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ con una solución de ácido sulfúrico al 15 % v/v, por último, mediante filtración se separó el $\text{CaSO}_{4(s)}$ (yeso) del líquido que contiene el ácido cítrico, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7(l)$.

Finalmente, en un roto-evaporador de la marca: Sev-Prendo, modelo: 410, se concentró el $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$.

Posteriormente se comprobó el punto de fusión de los cristales obtenidos, utilizando un determinador de punto de fusión marca: Fisher-Johns, modelo: IA-9100.

Asimismo, se determinó el espectro IR de los cristales obtenidos del proceso cal-sulfúrico, utilizando un espectrofotómetro infrarrojo marca Bruker, con óptica FT-IR, modelo: Alpha.

5.4.3 Determinación de espectros IR

Como ya se mencionó líneas antes, para esta fase experimental se utilizó un espectrofotómetro infrarrojo marca Bruker, así como el software OPUS 7.5 Bruker optics.

Dicho equipo IR se utilizó con el propósito de monitorear la deslignificación de *O. ficus indica*, así como de la identificación del producto obtenido con la cepa *A. niger*; el espectrofotómetro IR se operó con apoyo del software OPUS 7.5, como a continuación se describe:

1. Antes de utilizar el equipo IR se debe desarrollar un diagnóstico para verificar que la señal y energía sean adecuados para su correcto funcionamiento, con el objetivo de

verificar de esta manera el interferograma, y corroborar que la interferencia sea constructiva y no destructiva.

2. Previamente a las mediciones se ejecutó un test de limpieza del equipo, para confirmar que se encontraba en un estado adecuado y evitar de esa manera interferencias en los espectros IR a determinar.

3. El número de onda se ajustó de 350 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} con una resolución comprendida entre $1.5\text{ cm}^{-1}/1000\text{ cm}^{-1}$, el número de escaneos fue de 64 para la deslignificación y 24 para el producto obtenido con la cepa *A. niger*, las unidades en la que se obtienen los espectros fue en Absorbancia, posteriormente si es requerido y con apoyo del software OPUS 7.5 se cambian las unidades a Transmitancia.

4. Se ejecutó un espectro IR de referencia (antes de cada muestra), esto implicó realizar una medición sin muestra, de esta manera se compensó la humedad y CO_2 del ambiente e impurezas en el mismo, que pueden causar interferencia en la determinación de cada espectro IR.

5. Para determinar los espectros IR, previamente las muestras sólidas fueron prensadas en una Pelletizadora marca Specac, modelo GS15011, aplicando una presión de 5 toneladas, posteriormente se realizaron las mediciones en el espectrofotómetro infrarrojo.

6. Con el software OPUS 7.5 se ajustó cada espectro a la línea base y se identificaron los números de onda en los que aparecen las señales donde absorbió energía la muestra.

5.5 Preparación de soluciones buffer

Se preparó una solución de 0.2 M de NaOH y una *solución A* con la siguiente composición: 0.04 M de ácido acético, 0.04 M de ácido fosfórico y 0.04 M de ácido bórico, en la Tabla 5.1 se muestran las cantidades requeridas para diferentes pH [42].

Tabla 5.1. Preparación de soluciones buffer

pH	Solución 0.2 M de NaOH (mL)	Solución A (mL)
3	17.5	100
4	25	100
5	35	100
6	42.5	100

5.6 Diseños de experimentación factorial 2^k

Para evaluar la deslignificación de *O. ficus indica*, así como la capacidad de *A. niger* para sacarificar la celulosa obtenida de *O. ficus indica* y producir ácido cítrico, se eligieron 3 factores con 2 niveles por cada factor, véanse Tabla 5.2 y Tabla 5.3, respectivamente, donde se observan los factores, niveles reales y codificados (-1, 1) para los diseños de experimentación factorial 2^k . Para generar los diseños experimentales factoriales 2^k de estos estudios se utilizó el software Statgraphics Centurion XVII®.

En la Tabla 5.2 se muestran las variables independientes y sus niveles, las cuales fueron elegidas para evaluar la producción de celulosa, siendo estas X_A : tamaño de partícula, X_B : pH y X_C : temperatura, resultando en 16 corridas aleatorizadas (8 experimentos con una réplica por cada uno).

Tabla 5.2. Niveles reales y codificados para el diseño de experimentación factorial 2^k , para *P. cinnabarinus*

Variables independientes	Símbolo	Código y niveles reales	
		-1	1
A: Tamaño de partícula (mm)	X_A	0.074	0.25
B: pH (UpH)	X_B	4	6
C: Temperatura (°C)	X_C	30	50

En relación con la producción de ácido cítrico las variables independientes y sus niveles, fueron, X_A : pH, X_B : Celulosa y X_C : medio de cultivo (véase Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Niveles reales y codificados para el diseño de experimentación factorial 2^k , para *A. niger*

Variables independientes	Símbolo	Código y niveles reales	
		-1	1
A: pH (UpH)	X_A	2	4
B: Celulosa (gL⁻¹)	X_B	20	30
C: Medio de cultivo	X_C	A	B

Medio de cultivo A: Concentración de metales (70 Cu, 75 Zn, 56 Mn) ppb.

Medio de cultivo B: Concentración de metales (20 Cu, 50 Zn, 40 Mn) ppb.

5.7 Evaluación de la deslignificación de *O. ficus indica*, e hidrolisis de celulosa.

En general los medios de cultivo de los biorreactores tuvieron la siguiente composición: 0.32 g/L de NaCl, 2.47 g/L de KH_2PO_4 , 6.6 g/L de NH_4NO_3 , 0.48 g/L de $CaCl_2$, 0.38 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05 g/L de $FeSO_4$, dicha mezcla es denominada medio de cultivo Vogel's [18], más otros compuestos que más adelante se describen; el agua con la que se trabajó en los experimentos fue ultrapura (conductividad: 0.055 $\mu S/cm$), dicha agua se obtuvo con un equipo Milli-Q® Direct, así también, para controlar la temperatura de los experimentos se utilizó un baño con recirculación, marca: Prendo, modelo: FC-06.

Por otro lado se tiene que, durante la preparación de los inóculos la agitación fue mecánica, para esto se utilizó un motor digital marca Cole-Parmer, modelo AO-50006-03, el cual cuenta con un eje y un agitador tipo paleta, además, se utilizó una interface marca Vernier, modelo LabQuest para la medición con sensores de parámetros durante la toma de muestras, como: pH, temperatura, ion amonio (NH_4^+), entre otros, enseguida se detalla para cada caso.

Durante la operación de los biorreactores para ambas cepas, se tomaron muestras de 10 mL a intervalos de tiempo de 24 horas durante 7 días, cada muestra se filtró en una malla de acero inoxidable con tamaño de poro de 11 μm ; la reacción de las enzimas extracelulares se detuvo agregando 0.2 mL de HCl puro a cada muestra, cabe señalar que, las muestras líquidas se congelaron y las muestras sólidas se colocaron en charolas de aluminio y se secaron a 35 °C durante 24 horas, posteriormente fueron analizadas, en las siguientes secciones se particulariza el tipo de análisis.

En relación con la aireación en los biorreactores se tiene que, el aire fue suministrado por un compresor, el tratamiento fue el siguiente: el aire pasó por un filtro para retirar partículas, después por una lámpara de luz UV para asegurar esterilidad, luego por dos filtros, uno cumple la función de remover humedad y el otro remueve partículas (hasta de 0.2 μm), y antes de entrar a los biorreactores pasó por un matraz Erlenmeyer de 5 L que contenía agua destilada estéril (para humedecer el aire y evitar pérdidas de volumen en el biorreactor).

Por último, durante la inmovilización de cada cepa en sus respectivos soportes/sustratos, se desarrolló bajo las siguientes condiciones: agitación mecánica de 500 rpm durante 5 horas, temperatura de 25° C, la aireación fue de 0.3 vvm; después de las primeras 5 horas solo la agitación se disminuyó a 100 rpm; luego de 12 horas la agitación incrementó a 200 rpm, la aireación incrementó a 1 vvm y la temperatura incrementó (se detalla más adelante para cada caso).

5.7.1 Preparación de inóculos.

5.7.1.1 Para deslignificar biomasa de *O. ficus indica* con *P. cinnabarinus*.

En esta etapa se realizaron dos experimentos con una réplica cada uno, en biorreactores de 1.5 L. Cada biorreactor se inoculó con 10 mL de basidios de *P. cinnabarinus*, también se colocaron 10 g de materia prima (espinas de *Opuntia f. i.* con tamaño de partícula de 0.25 mm y 0.074 mm), 1 difusor (para entrada de aire), glucosa 3 g/L, lo anterior para 1 L de medio de cultivo, además de buffers de pH 4 para el tamaño de partícula de 0.25 mm, y de pH 6 para el tamaño de partícula de 0.074 mm (véase Figura 5.18). También se realizó un experimento con una réplica, donde la materia prima no fue tamizada, no se controló la temperatura y no se controló el pH del medio de cultivo.

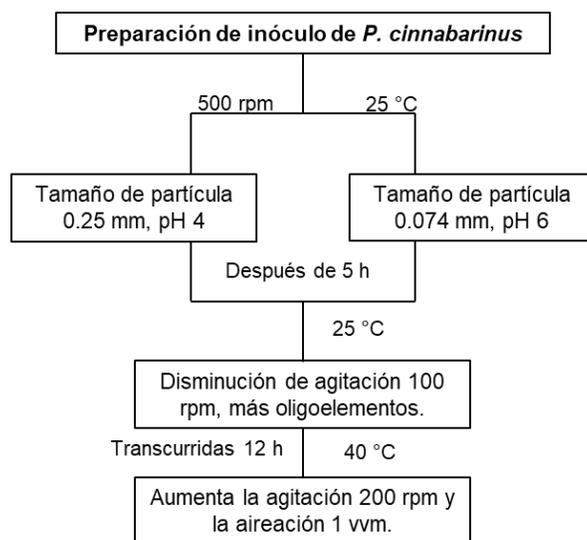


Figura 5.18. Proceso de preparación de inóculo de basidios de *P. cinnabarinus*.

Cuando se cumplen 12 horas se procedió a elevar la temperatura de los biorreactores a 40 °C, los parámetros que se midieron al tomar la muestra fueron: ion amonio (NH_4^+), pH, temperatura, ORP y Oxígeno Disuelto (OD). Para las muestras líquidas que se congelaron se determinaron los Carbohidratos Reductores, y para las muestras sólidas se cuantificó la biomasa.

Al finalizar la preparación de inóculo de *P. cinnabarinus*, el licor post fermentativo de cada biorreactor se filtró por separado y se analizó la degradación de la lignina. La celulosa recuperada que cuenta con los basidios inmovilizados de *P. cinnabarinus*, se resuspendió en 250 mL de agua estéril de tipo ultrapura, y se mantuvo en refrigeración a 4 °C, para posteriormente usarla como inóculo en los experimentos propuestos en el diseño de experimentación factorial 2^k (Tabla 5.4).

La resuspensión de la celulosa recuperada de los experimentos con pH 4 se usó para inocular los experimentos que operarán a ese pH, lo mismo ocurrió con la resuspensión de la celulosa recuperada de los experimentos con pH 6, está resuspensión se realizó bajo condiciones estériles y en una zona aséptica para evitar contaminación.

5.7.1.2 Para hidrolizar celulosa con *A. niger*

En esta etapa se realizaron dos experimentos con una réplica cada uno, en biorreactores de 1.5 L. Cada biorreactor se inoculó con 10 mL de conidiosporas de *A. niger*, también se colocaron 10 g de celulosa (producida por *P. cinnabarinus*), glucosa 7 g/L, 1 difusor (para entrada de aire), además de buffer de pH 3, lo anterior para 1 L de medio de cultivo (véase Figura 5.19). Cabe resaltar que, se desarrolló un experimento con una réplica, al cual no se le agregó glucosa, el pH fue el del medio de cultivo y no se adicionaron metales traza al medio de cultivo.

Cuando se cumplieron 12 horas se procedió a elevar la temperatura de los biorreactores a 30 °C, una vez transcurridas 24 horas se agregó a cada biorreactor el volumen necesario de metales traza: medio de cultivo A (70 Cu, 75 Zn, 56 Mn) ppb y medio de cultivo B (20 Cu, 50 Zn, 40 Mn) ppb, los parámetros que se midieron al tomar la muestra fueron: pH, temperatura y Oxígeno disuelto (OD). Para las muestras líquidas que se congelaron se determinaron los Carbohidratos Reductores, y para las muestras sólidas se cuantificó la biomasa.

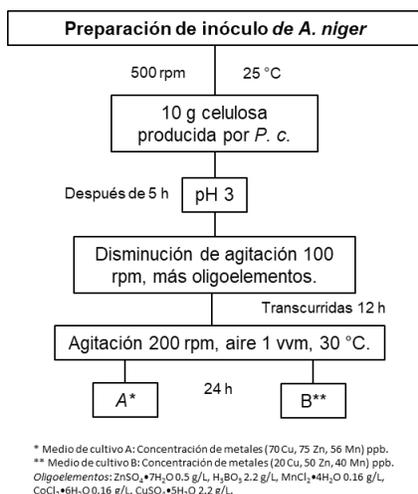


Figura 5.19. Proceso de preparación de inóculo de conidiosporas de *A. niger*.

Al finalizar la preparación de inóculo de *A. niger*, el licor post fermentativo de cada biorreactor se filtró por separado y se cuantificó el ácido cítrico con el método de la piridina-anhídrido acético.

La celulosa que no se sacarificó totalmente fue recuperada, dicha celulosa cuenta con las conidiosporas inmovilizadas de *A. niger*, la cual se resuspendieron en 250 mL de agua ultrapura estéril y se almacenaron en refrigeración para posteriormente ser usadas como inóculo para los biorreactores en el diseño de experimentación factorial 2^k (Tabla 5.3). La resuspensión de los experimentos con medio de cultivo A se usó para inocular los experimentos que operarán a esa concentración de metales traza, lo mismo ocurrió con la resuspensión de los experimentos con medio de cultivo B; ambas resuspensiones se realizaron bajo condiciones estériles y en una zona aséptica para evitar contaminación. Para las concentraciones de metales (Cu, Zn y Mn) se utilizaron estándares Titrisol.

5.7.2 Operación de los biorreactores

5.7.2.1 *P. cinnabarinus*

Se usaron para esta etapa biorreactores de 1.5 L, en cada biorreactor se colocaron 20 g de espinas de nopal, 1 L de medio de cultivo, se inoculó cada biorreactor con 10 mL de la resuspensión de celulosa que cuenta con los basidios acondicionados a deslignificar. Cada biorreactor contó con agitación mecánica, una toma de muestra y un difusor por donde entra aire estéril, se llevaron a cabo 8 experimentos con una réplica por cada uno, a diferentes condiciones como se muestra en la Tabla 5.4, los parámetros que se determinaron al tomar la muestra fueron: pH, temperatura, ORP y Oxígeno Disuelto (OD). Para las muestras líquidas que se congelaron se determinaron los Carbohidratos Reductores y evaluó la deslignificación de la materia prima, y para las muestras sólidas se cuantificó la biomasa.

Al finalizar las fermentaciones, se separó el licor post fermentativo de la celulosa obtenida con *P. cinnabarinus*, toda la celulosa recuperada se esterilizó a 121 °C y 15 psi, durante 15 minutos. Posteriormente se secó a 35 °C durante 24 horas, para su posterior análisis de espectroscopía IR.

Tabla 5.4. Combinación del diseño de experimentación 2^k , para *P. cinnabarinus*

Experimento	Temperatura, tamaño de partícula y pH.
Experimento 1	50 °C, 0.25 mm, pH 4
Experimento 2	50 °C, 0.25 mm, pH 6
Experimento 3	50 °C, 0.074 mm, pH 4
Experimento 4	50 °C, 0.074 mm, pH 6
Experimento 5	30 °C, 0.25 mm, pH 4
Experimento 6	30 °C, 0.25 mm, pH 6
Experimento 7	30 °C, 0.074 mm, pH 4
Experimento 8	30 °C, 0.074 mm, pH 6

5.7.2.2 *A. niger*

Fueron usados para esta etapa biorreactores de 1.5 L, en cada biorreactor se colocaron 20 g o 30 g de materia prima (según Tabla 5.5), 1 difusor y 1 L de medio de cultivo, se inoculó

cada biorreactor con 10 mL de la resuspensión de celulosa que cuenta con los conidiosporas inmovilizadas de *A. niger* acondicionados a hidrolizar celulosa. Cada biorreactor contó con agitación mecánica, una toma de muestra y un difusor por donde ingresó aire, todos los experimentos se desarrollaron como se describe en la Tabla 5.5. Para las muestras líquidas que se congelaron se determinó la concentración de ácido cítrico y Carbohidratos Reductores, y para las muestras sólidas se cuantificó la biomasa.

Tabla 5.5. Combinación del diseño de experimentación 2^k, para *A. niger*

Experimento	pH (UpH)	Celulosa (gL ⁻¹)	Medio de cultivo
1	4	30	B**
2	4	20	A*
3	2	20	B
4	2	30	A
5	2	30	B
6	2	20	A
7	4	30	A
8	4	20	B

* Medio de cultivo A: Concentración de metales (70 Cu, 75 Zn, 56 Mn) ppb.

** Medio de cultivo B: Concentración de metales (20 Cu, 50 Zn, 40 Mn) ppb.

5.7.2.2.1 Simulación de la cinética de formación de ácido cítrico.

Se usó la herramienta de regresión no-lineal del software Polymath con el fin de determinar los parámetros biocinéticos asociados a la formación de producto del modelo cinético de la ecuación 8 [1, 20], el cual incorporó a la solución los valores obtenidos de la mejor fermentación con *A. niger*, asociados a la concentración experimental del producto (ácido cítrico), el consumo de sustrato y el incremento en la biomasa.

5.8 Metodología de superficie de respuesta

Los resultados obtenidos se modelaron y optimizaron estadísticamente mediante el software Statgraphics Centurion XVII[®], con la finalidad de conocer la combinación de factores óptimo en la reducción de lignina (deslignificación) usando la cepa de *P. cinnabarinus*, y en la producción de ácido cítrico usando la cepa *A. niger*.

Para lograr lo anterior, se realizó una regresión múltiple y se usó la metodología de superficie de respuesta, con el propósito de poder estudiar los efectos principales y combinados (interacciones), en relación con, la deslignificación, las variables controlables son el tamaño de partícula, pH y concentración de metales, en cuanto a, la obtención de ácido cítrico, las variables controlables son pH, los gramos de celulosa y la concentración de metales, lo anterior, durante la operación de los biorreactores.

Se usó la representación gráfica de superficie de respuesta tridimensional para visualizar los efectos en la degradación de la lignina y en la obtención de ácido cítrico, en función de los factores elegidos (variables controlables o independientes). Para estimar la respuesta

de la variable dependiente y predecir el punto óptimo en la deslignificación y en la producción de ácido cítrico, se obtuvo en principio la representación gráfica de superficie de respuesta tridimensional, para posteriormente elegir el grado del polinomio en la regresión múltiple. Para esto se utilizó el software Statgraphics Centurion XVII®.

Al conocer el punto óptimo en la deslignificación, se realizaron fermentaciones para obtener suficiente celulosa, la cual fue la materia prima en los fermentadores donde se utilizó a *Aspergillus niger* para producir ácido cítrico.

6. Resultados

Se presenta en la Figura 6.20 el esquema general del bioproceso planteado en el presente estudio, donde pueden distinguirse tres etapas: 1) un pretratamiento de la materia prima, 2) una biorreacción en dos etapas (en principio una para obtener celulosa, seguida de la obtención del ácido cítrico, en fermentaciones por separado) y 3) recuperación de celulosa obtenida con *P. cinnabarinus* y ácido cítrico obtenido con *A. niger*.

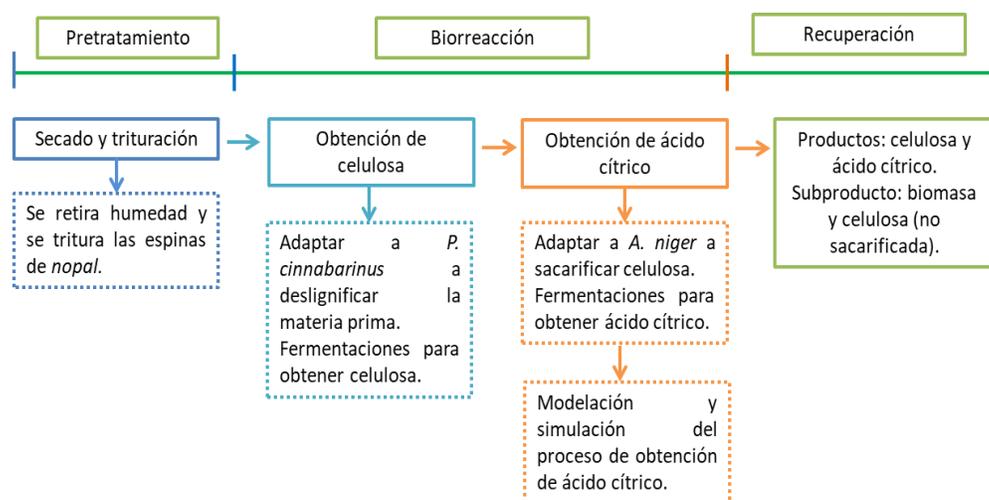


Figura 6.20. Esquema general del bioproceso para obtener ácido cítrico por fermentación, a partir de un material lignocelulósico.

6.1 Resiembra y propagación de *P. cinnabarinus*

El microorganismo (*P. cinnabarinus*) requirió durante la etapa de incubación de exposiciones a la luz del sol, por intervalos de tiempo de 1 hora, esto es necesario para el crecimiento del micelio nutritivo y aéreo, seguido del desarrollo de las basidiosporas. Al día 5 (se apreció la aparición de un color rosa sobre el micelio aéreo, posteriormente de un color anaranjado), véase Figura 6.21; durante las incubaciones se observó que, en ausencia de la exposición a la luz del sol, el hongo *P. cinnabarinus* no esporulaba o tardaba de dos a tres meses para que ocurriera la esporulación.

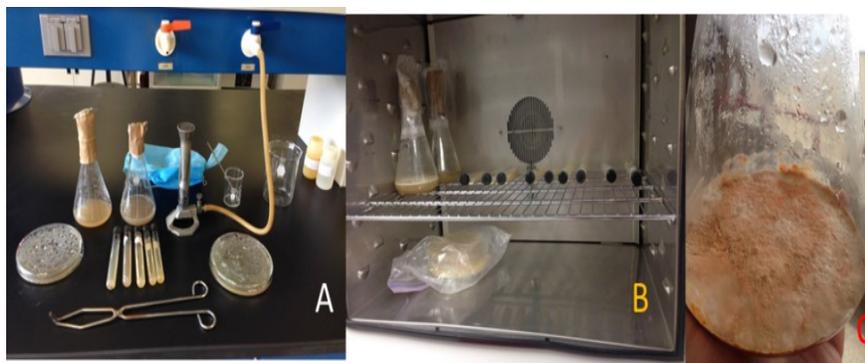


Figura 6.21. (A) Resiembra y propagación, (B) incubación y (C) desarrollo de basidiosporas de *P. cinnabarinus*.

6.2 Resiembra y propagación de *A. niger*

En esta etapa se observó que la cepa de *A. niger* desarrolló el micelio nutritivo y aéreo a las 24 horas, inició una esporulación parcial a las 24 horas (aparición de un color negro sobre el micelio aéreo), al cabo de 3 días se apreció una esporulación completa, véase Figura 6.22. En comparación con el hongo *P. cinnabarinus*, se observó que el hongo *A. niger* se desarrolló más rápido, es decir, tiene tiempos de generación más cortos.



Figura 6.22. (A) Resiembra y propagación, (B) incubación y (C) desarrollo de conidiosporas de *A. niger*.

6.2.1 Espectros infrarrojos (materia prima)

Con la finalidad de monitorear la deslignificación de la materia prima, se planteó en la metodología el análisis instrumental usando un espectrofotómetro de infrarrojo (IR). La lignina es un polímero aromático formado principalmente por tres alcoholes fenil-propánicos: Alcohol p-cumarílico (unidad p-hidroxifenilo), Alcohol coniferílico (unidad guayacilo) y Alcohol sinapílico (unidad siringilo) [24, 25, 43, 44], ver Figura 6.23, donde se presenta la estructura química de los alcoholes anteriormente mencionados.

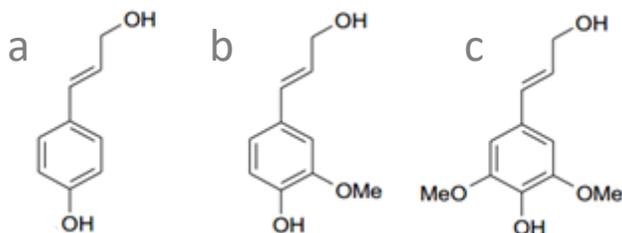


Figura 6.23. (a) Alcohol p-cumarílico, (b) Alcohol coniferílico y (c) Alcohol sinapílico.

En la Figura 6.24 podemos apreciar los espectros IR de la materia prima, se resalta la banda característica del anillo aromático aproximadamente por el número de onda 1300 cm^{-1} , en el espectro IR del bagazo de nopal la intensidad de la banda es mayor en comparación con la del espectro IR de las espinas del nopal, esto es de esperarse, ya que según Malainine y Lucas [25, 31] el bagazo de nopal contiene un mayor porcentaje de lignina (12.3 %) y las espinas de nopal contienen 1.2 % de lignina, cabe mencionar que la señal del anillo aromático en el caso de las espinas del nopal se desplaza al número de onda de 1250 cm^{-1} (desplazamiento provocado por la presencia de la cutina y clorofila en *O. ficus-indica*).

Se presenta también el espectro IR del fenol y de la celulosa, ambos grado reactivo Sigma-Aldrich, el espectro IR del fenol facilitó la comparación entre espectros de la materia prima, verificando de esta manera la presencia de la banda del anillo aromático del fenol, el espectro IR de la celulosa nos marcó una meta a alcanzar en el proceso de deslignificación de la materia prima usando a *P. cinnabarinus*.

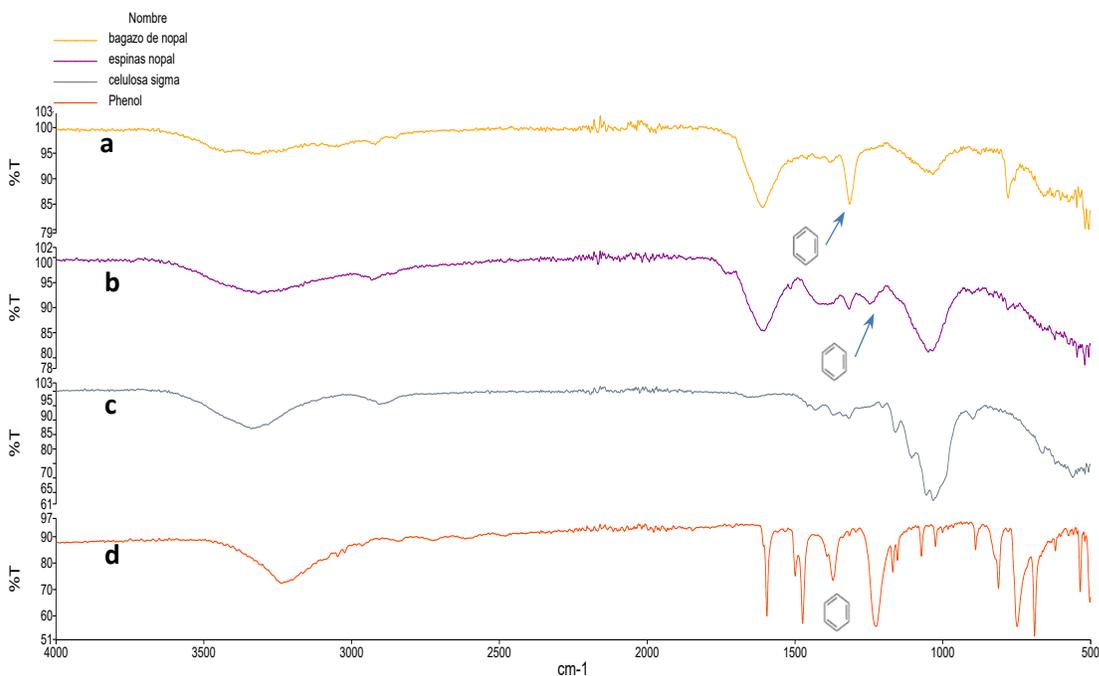


Figura 6.24. Espectro IR: (a) bagazo de nopal, (b) espinas de nopal, (c) celulosa y (d) fenol.

6.3 Composición de la materia prima.

En la siguiente Tabla 6.6 se comparan los resultados obtenidos en el presente estudio con algunos otros de la literatura. Se determinó que la materia prima contiene un 3.91 % de lignina, 37.9 % de celulosa y 17.08 % de pectina, valores cercanos a los reportados por Malainine y Yang [24, 25], cabe resaltar que el porcentaje de humedad es de 92.7 %.

La variación entre los valores encontrados en este trabajo y los reportados por Malainine y Yang [24, 25] (Tabla 6.6), se debe a la diferencia entre los métodos de cultivo utilizados para *O. ficus indica*, y a que en la literatura analizaron el bagazo de nopal y espinas de nopal, en el presente estudio se analizó el residuo generado al desespinar el nopal verdura (el cual está conformado por espinas y por trozos del nopal que son desechado al desespinar).

Tabla 6.6. Comparación con la literatura, de la cuantificación de lignina, celulosa y pectina.

	Bagazo de nopal ^[24] %	Espinas de nopal ^[25] %	Presente estudio %
Lignina	1.2	12.3	3.91 ± 0.8
Celulosa	47.9	13.1	37.90 ± 0.5
Hemicelulosa	nr**	18.5	11.66 ± 0.1
Pectina	nr	25	17.08 ± 0.9
Cenizas	1.3	23.7	13.41 ± 0.1
FDA*	nr	nr	16.04 ± 0.1

*FDA: Fibra Detergente Ácida = Fibras de hemicelulosa y cutina (pigmentos). ** no reportado.

De la Tabla 6.6 se puede resaltar que la celulosa se encuentra en mayor proporción en la composición química de las espinas de *O. ficus-indica*, seguido de la pectina y la fibra detergente ácida, respectivamente. De acuerdo con la investigación de Lefsih [27] los carbohidratos presentes en el residuo, en particular los que componen a la fracción de la pectina, principalmente el ácido D-galacturónico que es extraído indirectamente en el medio de cultivo de los biorreactores, es de vital importancia en el bioproceso de deslignificación, debido a que según Asiegbu [5] es un cosustrato, el cual al ser despolimerizado por la actividad catalítica de las pectinasas, se liberan monómeros al medio de cultivo que son utilizados por el microorganismo como fuente de Carbono y energía; para generar biomasa y sintetizar las enzimas que despolimerizan la lignina [3, 4].

6.4 Evaluación de la capacidad de *P. cinnabarinus* para deslignificar

Durante esta etapa experimental (Figura 6.25) se llevó a cabo un experimento con una réplica, de cada réplica se tomaron muestras cada 24 horas con la finalidad de monitorear la capacidad de *P. cinnabarinus* para deslignificar, sin la influencia de las variables a controlar que se describen en el diseño de experimentos para dicho microorganismo (clave de fermentaciones: **Fb**). En la fase líquida se midieron: pH, temperatura, ion amonio (NH₄⁺), Potencial de óxido reducción (ORP) y Oxígeno Disuelto (OD), para dichas mediciones se utilizó un equipo LabQuest Vernier, también se determinaron los carbohidratos reductores totales (CTR). En la fase sólida se determinaron la biomasa y se evaluó el porcentaje de deslignificación, mediante espectroscopía IR.



Figura 6.25. Biorreactor sin influencia de variables a controlar, *P. cinnabarinus*.

Durante las primeras 7 horas de operación se midió el CO_2 producido dentro de los biorreactores, la producción de dióxido de carbono está asociada al microorganismo, principalmente en la germinación de los basidios, esto se logró observar mediante el monitoreo del CO_2 en la fase gaseosa de los biorreactores. En la Figura 6.26 se puede ver que a las 4 horas comenzó un incremento en la concentración de dicho gas, producto del crecimiento sin absorción de sustrato (glucosa y/o pectina de *O. ficus indica*, presentes en el medio de cultivo) [38].

Durante esta fase (germinación de los basidios) se debe tener cuidado en la agitación para evitar daños en el micelio, ya que los daños morfológicos afectarían el desarrollo del microorganismo disminuyendo la viabilidad de las células.

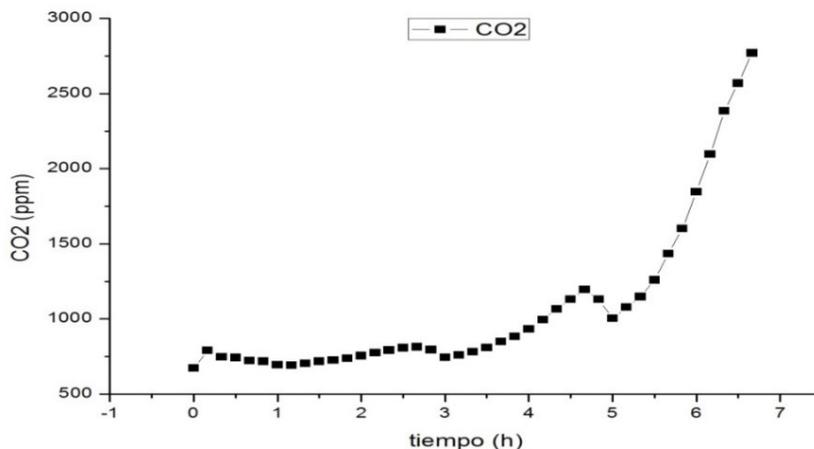


Figura 6.26. Monitoreo del CO_2 producido por *P. cinnabarinus*, biorreactor Fb.

En la Figura 6.27 se muestra la variación del O_2 disuelto y el incremento de biomasa dentro de los biorreactores, la disminución del OD es debido al consumo del Oxígeno por la respiración celular, así también según Eggert [9] el Oxígeno es usado por las enzimas ligninolíticas para la hidrólisis de la lignina para los tres tipos de reacciones catalizadas por la lacasa, donde las vías metabólicas que pueden estar implícitas en la oxidación de la lignocelulosa, son la oxidación directa de los derivados fenólicos simples, la oxidación mediada de sustratos fenólicos y no fenólicos en presencia de mediadores, y el acoplamiento de radicales reactivos formados por la acción de la lacasa, cabe resaltar que el incremento de biomasa se debe principalmente a la metabolización del cosustrato

(glucosa), a partir del día 2 el microorganismo comenzó a metabolizar la materia prima (Figura 6.28).

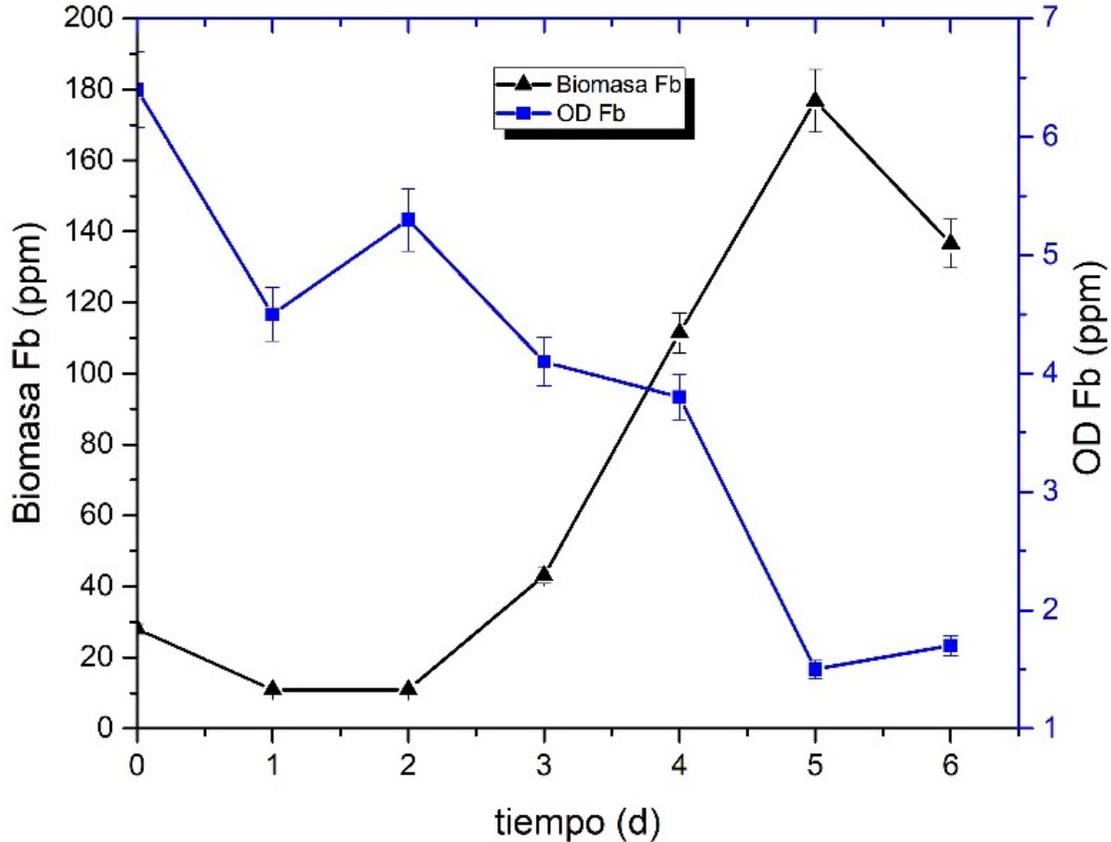


Figura 6.27. Evolución del O₂ disuelto e incremento de biomasa dentro del biorreactor, Fb en la fermentación con *P. cinnabarinus*.

En la Figura 6.28 se muestra la variación del ion amonio, carbohidratos reductores totales (CTR), pH y potencial de óxido reducción (ORP) dentro de los biorreactores. La disminución en la concentración del ion amonio y de los CTR es debido al metabolismo del microorganismo que consume la fuente de Nitrógeno y Carbono añadidos al medio de cultivo, para ser incorporados a la célula, el incremento de los CRT inicia al día 2 de la fermentación debido a la metabolización de la pectina fácilmente soluble en agua, favoreciendo la deslignificación de la materia prima.

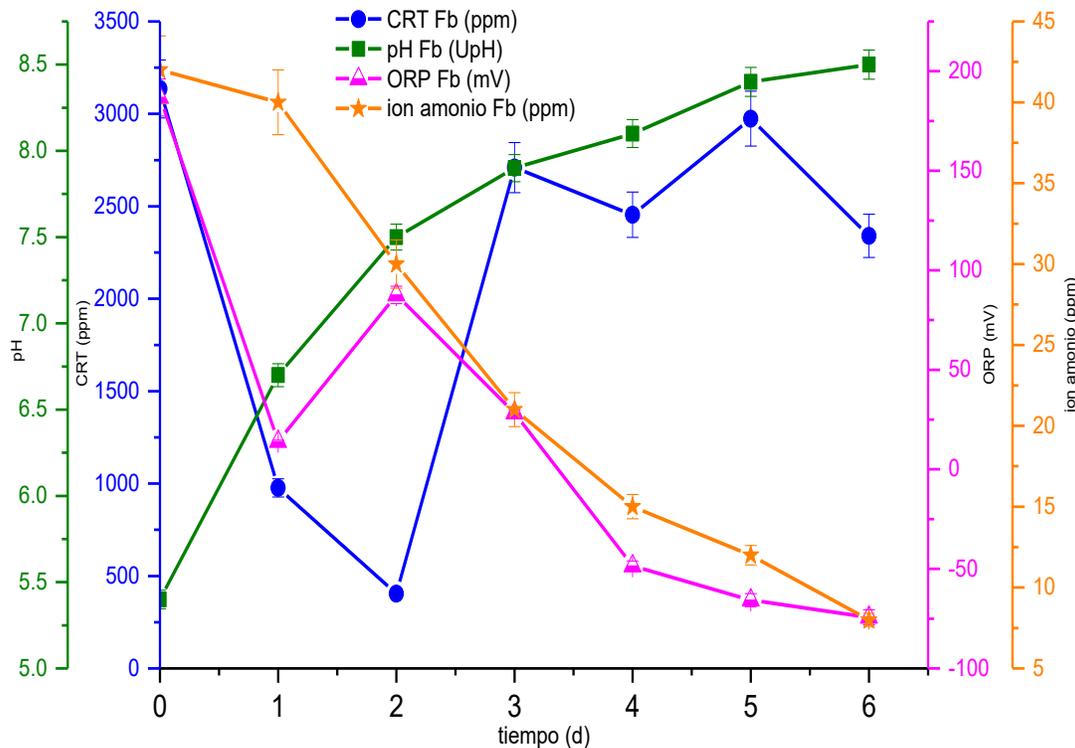


Figura 6.28. Variación del ion amonio, carbohidratos reductores totales (CTR), pH y potencial de óxido reducción (ORP) dentro del biorreactor Fb, en la fermentación con *P. cinnabarinus*.

A pesar de que, los potenciales redox de las lacasas conocidas son demasiado bajos para oxidar directamente los componentes no fenólicos de la lignina, *P. cinnabarinus* es un ejemplo de un hongo productor de lacasa que degrada lignina de manera muy eficiente. Para superar la barrera del potencial redox, *P. cinnabarinus* produce un metabolito, 3-hidroxiantranilato que puede mediar en la oxidación de sustratos no fenólicos por lacasa. En el año 1997 Eggert [12] realizó la primera descripción de cómo la lacasa podría funcionar en un sistema biológico para la despolimerización completa de lignina. Por lo que, la medición del Potencial de Oxido Reducción durante la fermentación nos indica la actividad enzimática del microorganismo. El aumento en el ORP muestra que el medio de cultivo es oxidante, la disminución en el ORP indica que el medio de cultivo es reductor, por lo que se infiere que *P. cinnabarinus* produjo enzimas extracelulares capaces de oxidar a la materia prima.

Para esta fase experimental la actividad de las pectinasas y lacasas se observó a partir del día 2, en relación con el potencial de Hidrógeno se tiene que inicialmente el medio de cultivo tuvo un pH de 5.35 (ligeramente ácido), durante el primer y segundo día de la fermentación se incrementó el pH hacia la zona neutra, a partir del día tres y hasta el sexto día el pH se mantuvo en la región alcalina aproximadamente en 8.5 (Figura 6.28), lo anterior se puede atribuir a la despolimerización de la lignocelulosa, ya que la lignina en fase soluble alcanza potenciales de Hidrógeno alcalinos [9, 12]. Es importante mencionar que el ion amonio como fuente de Nitrógeno fue fácilmente metabolizado por el microorganismo.

En la Figura 6.29 se muestran los espectros IR de la materia prima y del sólido recuperado al sexto día de la fermentación con *P. cinnabarinus*, la finalidad de este análisis es observar la disminución en la intensidad de la banda del anillo aromático que conforma a la lignina,

el cual según Zhao [45] forma parte de las siguientes moléculas: Alcohol p-cumarílico, Alcohol coniferílico y Alcohol sinapílico.

En la comparación entre la materia prima y el sólido recuperado del biorreactor al sexto día, se aprecia una disminución en la intensidad de la banda del anillo aromático de los alcoholes fenil-propa-nólicos que conforman a la lignina en 1243 cm^{-1} .

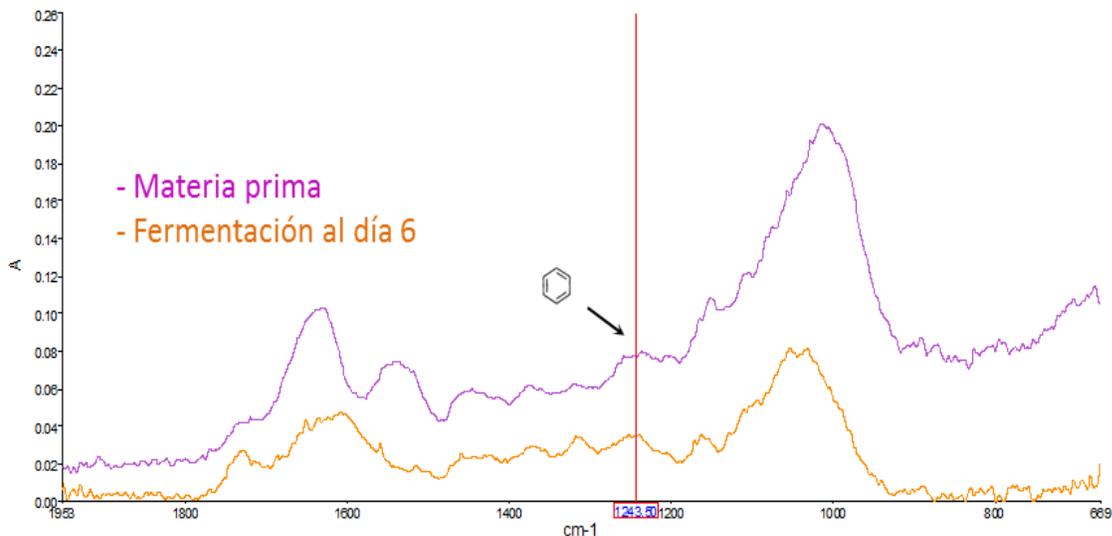


Figura 6.29. Espectro IR: materia prima y sólido recuperado de la fermentación Fb, con *P. cinnabarinus*.

Por otro lado, en la fase experimental en la que se preparó el inóculo de *P. cinnabarinus* (Figura 6.30) se tiene que, se tomaron muestras cada 24 horas con la finalidad de monitorear la evolución de *P. cinnabarinus* para deslignificar a *O. ficus-indica*, bajo la influencia de las variables a controlar que se describen en el diseño de experimentos para dicho microorganismo (Figura 5.18), los parámetros que se determinaron durante la operación de los biorreactores se describieron en la sección anterior.



Figura 6.30. Adaptación de *P. cinnabarinus* a deslignificar.

En la Figura 6.31 se muestra la variación del Oxígeno Disuelto (OD) y el incremento de biomasa dentro de los biorreactores que iniciaron su operación a un pH igual a 4 (clave: **Fc**), la disminución del OD es debida al consumo por la respiración celular y a la intervención en las reacciones de oxidación de la lignina. El incremento de biomasa está influenciado principalmente por el consumo del cosustrato (glucosa); a partir del día dos el microorganismo comenzó a metabolizar la materia prima, generando un incremento en la concentración de los CRT, principalmente por la sacarificación de la pectina por acción de las pectinasas, en consecuencia, se infiere que se favoreció la degradación de la lignina (Figura 6.32).

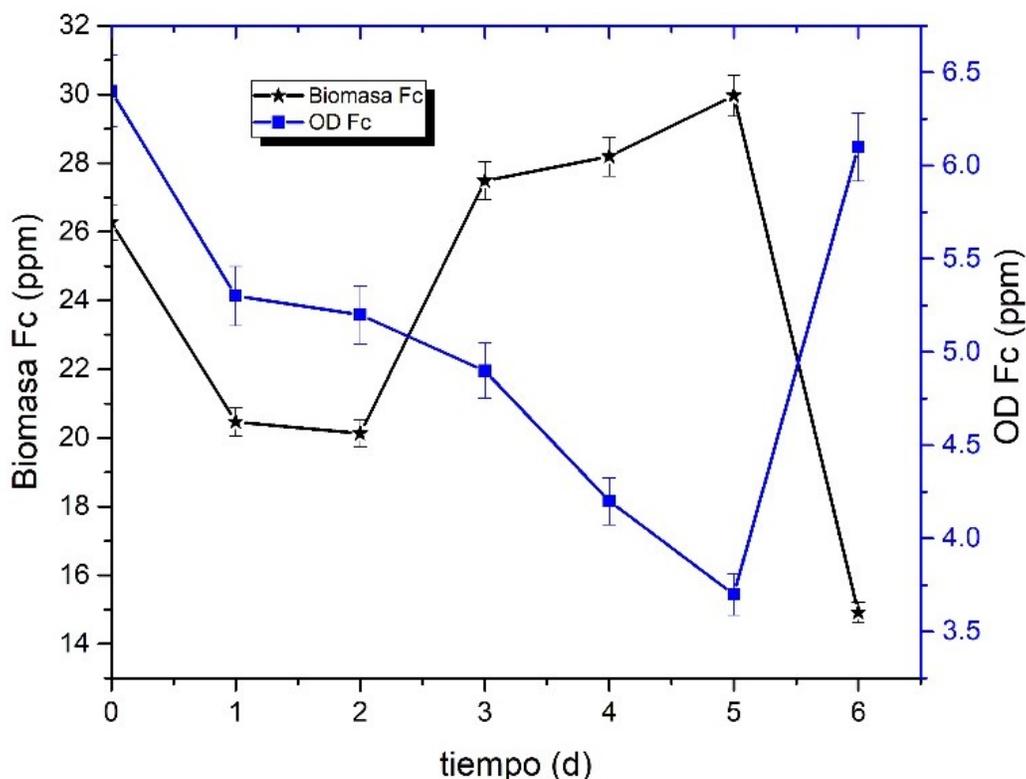


Figura 6.31. Evolución del O₂ disuelto e incremento de biomasa, fermentaciones clave: **Fc**.

En la Figura 6.32 se muestra la variación de los carbohidratos reductores totales (CTR), pH y potencial de óxido reducción (ORP) dentro de los biorreactores (clave: **Fc**). El incremento en los CRT se debe a la actividad de las enzimas extracelulares de *P. cinnabarinus*, enzimas que inician la sacarificación de la pectina y la deslignificación de la materia prima al día dos. Para este caso el medio de cultivo tiene un ORP reductor durante toda la fermentación (Figura 6.32) y el pH se desplazó hacia la zona alcalina.

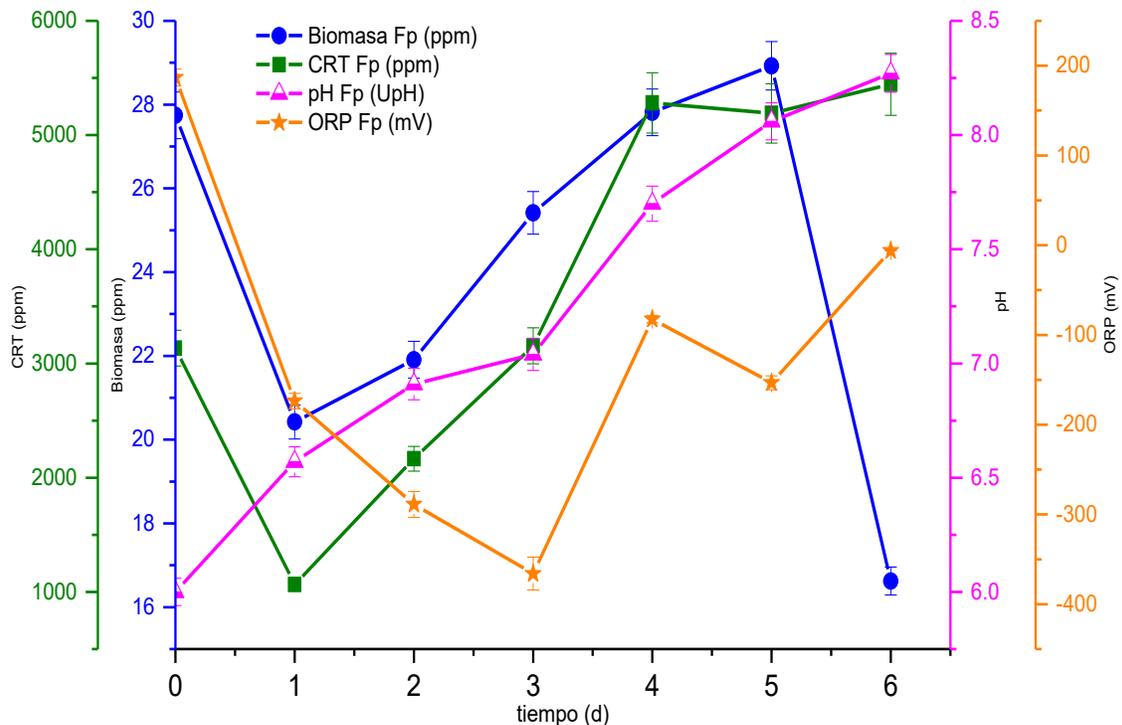


Figura 6.32. Variación de la biomasa, los carbohidratos reductores totales (CTR), el pH y potencial de óxido reducción (ORP) dentro de los biorreactores, *Fc*.

En la Figura 6.33 se muestran los espectros IR de la materia prima y del sólido recuperado al sexto día de las fermentaciones (*Fc*) con *P. cinnabarinus*, se aprecia una disminución en la intensidad de la banda del anillo aromático de los alcoholes fenil-propa-nólicos que conforman a la lignina en el número de onda: 1243 cm^{-1} .

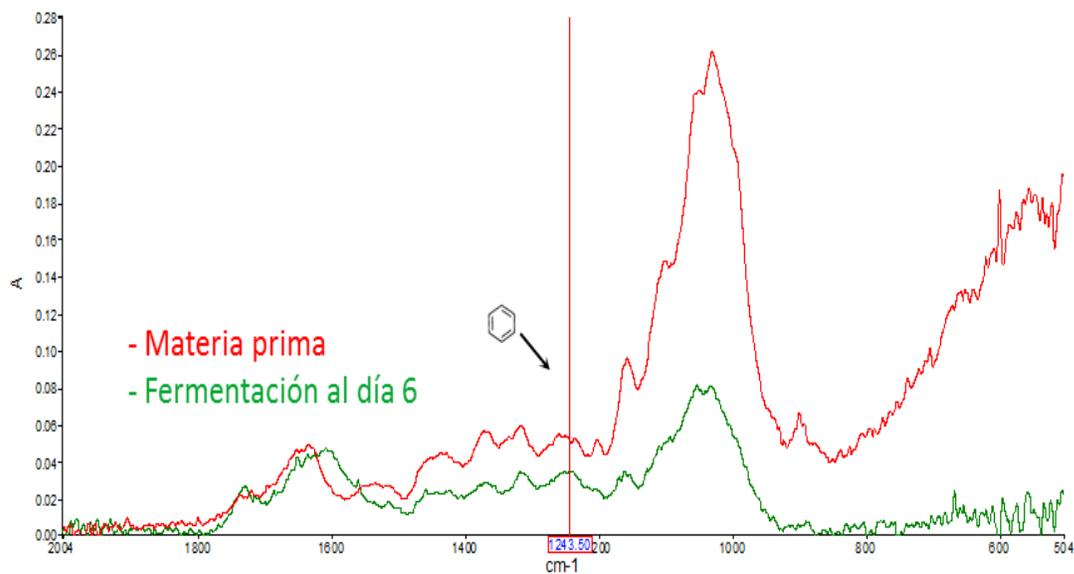


Figura 6.33. Espectro IR: materia prima y sólido recuperado de las fermentaciones, *Fc*.

En la Figura 6.34 se muestra la variación de la concentración del O₂ disuelto en función del tiempo, al igual que la concentración de biomasa dentro de los biorreactores que operaron a pH 6 (clave: **Fp**), el incremento en la biomasa es propiciado por el consumo de la glucosa (cosustrato), la variación del Oxígeno disuelto es debido a que interviene en las reacciones de oxidación de la lignina, además es consumido en la respiración celular.

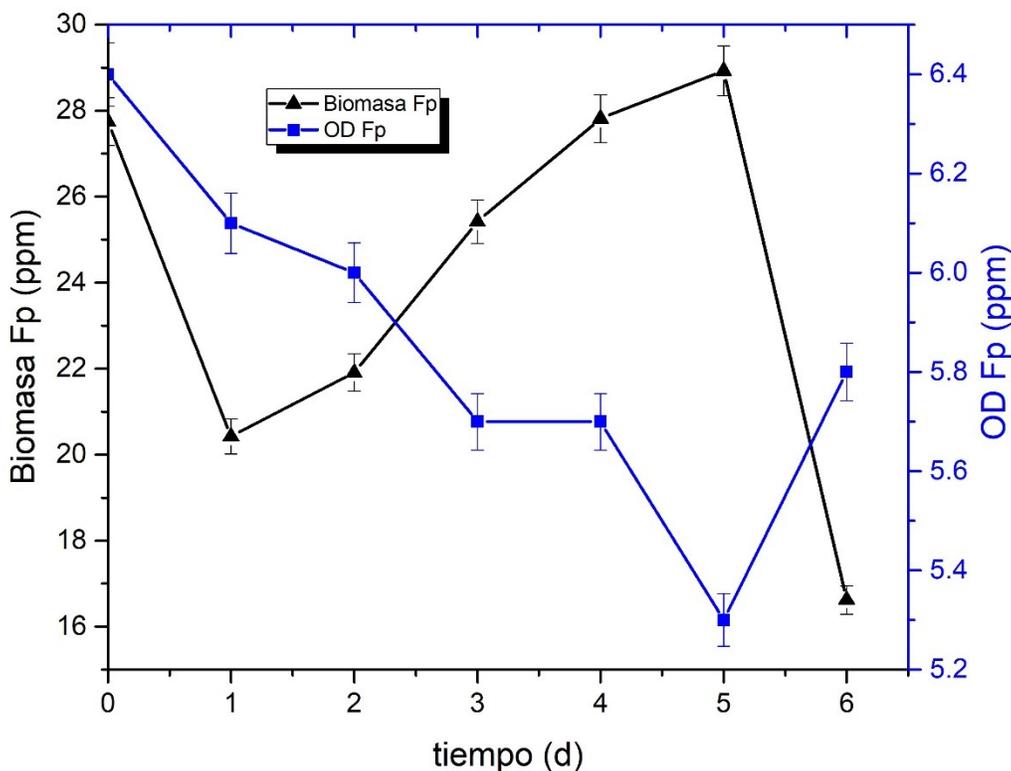


Figura 6.34. Evolución del O₂ disuelto e incremento de biomasa, fermentaciones clave: **Fp**.

En la Figura 6.35 se muestra el comportamiento de los carbohidratos reductores totales (CTR), pH y potencial de óxido reducción (ORP) dentro de los biorreactores (clave: **Fp**). El incremento en la actividad de las enzimas extracelulares de *P. cinnabarinus*, inicia la deslignificación de la materia prima, esto se aprecia en el aumento en la concentración de CRT a partir del día uno de la fermentación. En cuanto al comportamiento del ORP, se tiene que hasta el tercer día el medio de cultivo tuvo un ORP reductor, luego fue oxidante, lo cual sugiere la oxidación de la glucosa adicionada como cosustrato, y después del tercer día ocurre la despolimerización de la lignocelulosa, en consecuencia, el pH se desplaza hacia la zona alcalina, efecto provocado por la presencia de los precursores de la lignina en el medio de cultivo.

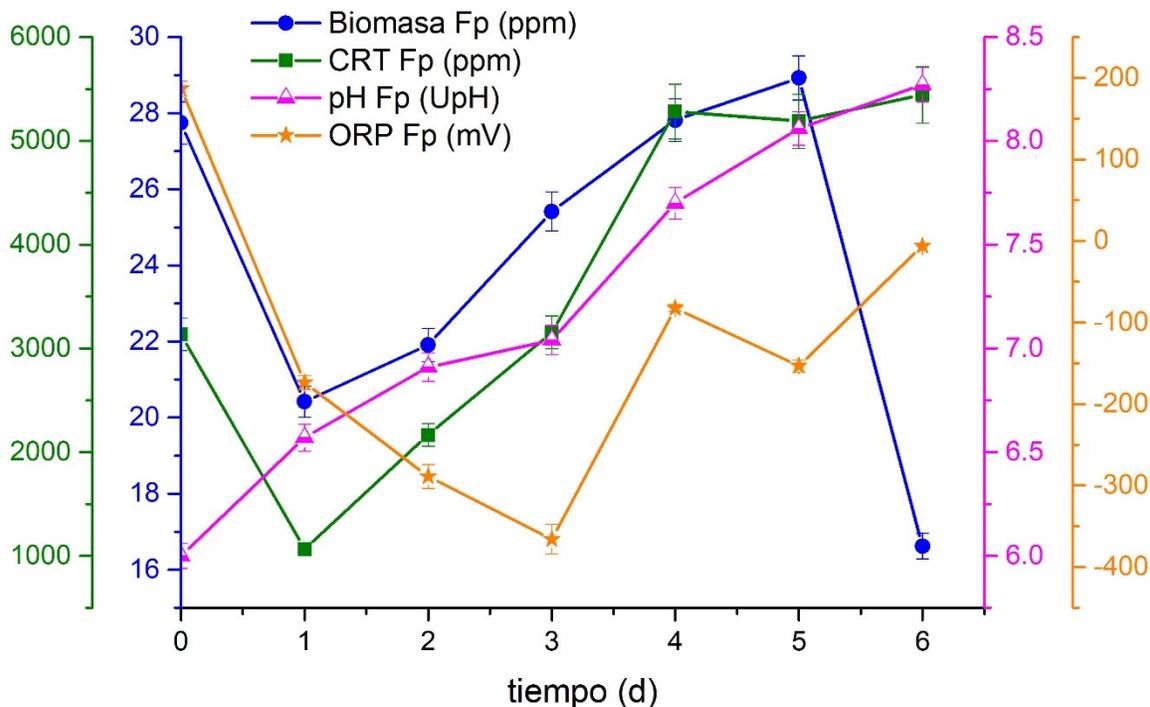


Figura 6.35. Variación de la biomasa, los carbohidratos reductores totales (CTR), el pH y potencial de óxido reducción (ORP) dentro de los biorreactores, *Fp*.

En la Figura 6.36 se muestran los espectros IR de la materia prima y del sólido recuperado al sexto día de la fermentación (*Fp*) con *P. cinnabarinus*, se aprecia una disminución en la intensidad de la banda del anillo aromático de los alcoholes fenil-propa-nólicos que conforman a la lignina a 1243 cm^{-1} .

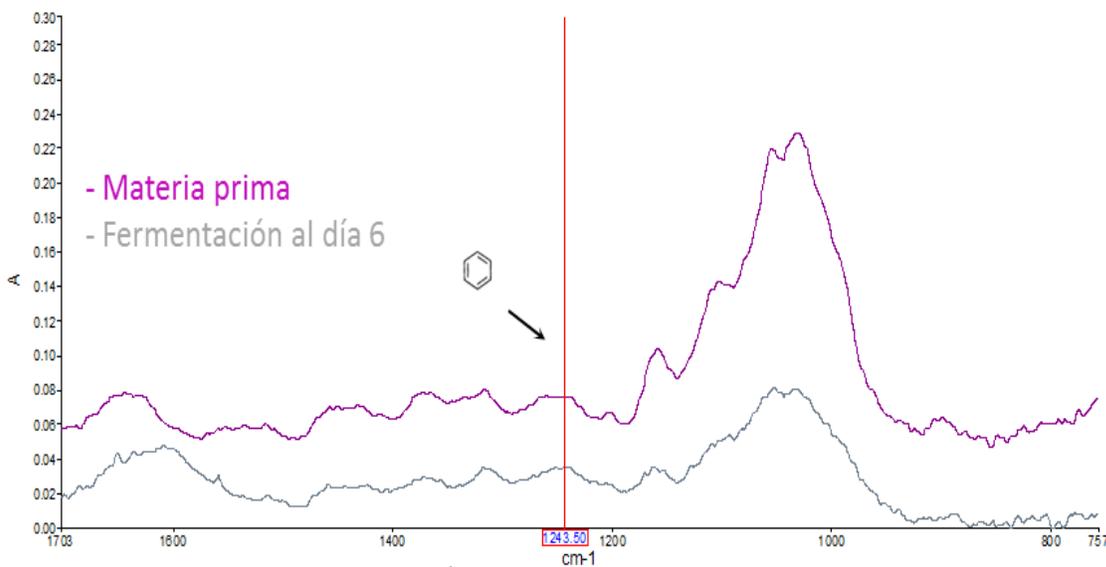


Figura 6.36. Espectro IR: materia prima y sólido recuperado de las fermentaciones, *Fp*.

Al comparar los experimentos durante la fase de adaptación de *P. cinnabarinus* a deslignificar la materia prima, se observa que la fermentación con clave: *Fb* tuvo un porcentaje de deslignificación despreciable en comparación a los experimentos donde se

controlan algunas variables relacionadas al diseño experimental propuesto para este microorganismo (Tabla 6.7). El porcentaje de deslignificación presentado en la Tabla 6.7 se obtuvo con base a la absorbancia determinada por espectroscopía IR, dicha absorbancia según Zhao [45] pertenecen a la banda del anillo aromático de los alcoholes fenil-propánicos que conforman a la lignina a un número de onda de 1243 cm^{-1} , lo anterior para la materia prima antes y después de las biorreacciones, % Deslignificación = $100\% * \left(\frac{A_s - A_b}{A_s}\right)$, donde: A_s es la absorbancia de la materia prima antes de la biorreacción y A_b es la absorbancia del sólido recuperado después de la biorreacción, ambos para un número de onda de 1243 cm^{-1} .

Tabla 6.7. Evaluación de la capacidad de deslignificación de la materia prima por *P. cinnabarinus*.

Variables controladas	Clave	% Deslignificación
pH 4, *tp 0.25 mm, 40 °C	Fc	54.44
pH 6, tp 0.074 mm, 40 °C	Fp	33.12
Blanco*	Fb	1.95

*tp: tamaño de partícula.

*Blanco: pH del medio de cultivo 5.3, tp: sin tamizar, temperatura ambiente.

Como se apreció anteriormente, el control del pH no se logró con el ajuste de pH inicial al medio de cultivo (adicionando ácido o base), de tal forma que se elaboraron las soluciones buffer descritas en la Tabla 5.1, con la finalidad de mantener fija dicha variable propuesta en el diseño experimental para *P. cinnabarinus*.

6.5 Análisis de la operación de los biorreactores con *P. cinnabarinus*.

En la Figura 6.37 se muestran los biorreactores durante la etapa experimental en la que se llevaron a cabo las biorreacciones siguiendo el diseño de experimentos propuesto para *P. cinnabarinus*. El monitoreo de los biorreactores durante su operación es parecido al descrito en secciones previas.

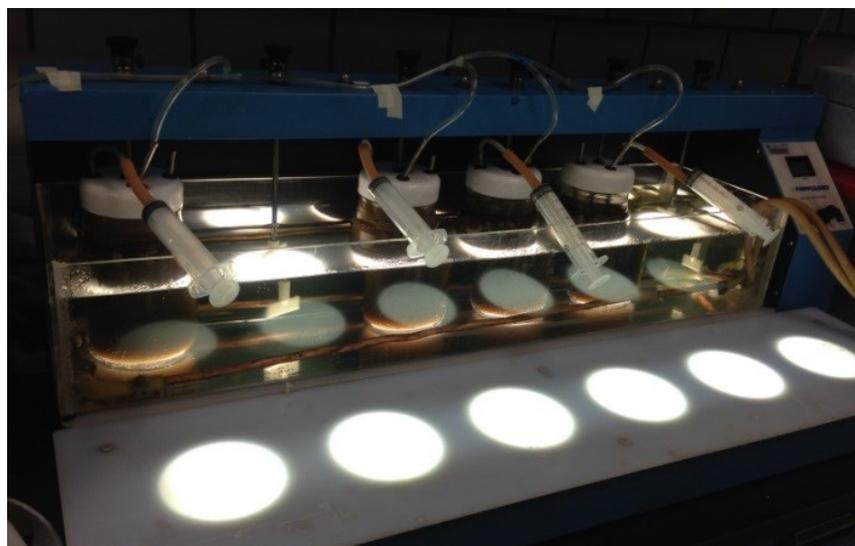


Figura 6.37. Biorreactores aplicando el diseño de experimentos para *P. cinnabarinus*.

6.5.1 Análisis del porcentaje de despolimerización de la lignina

Al ejecutar el diseño experimental propuesto para *P. cinnabarinus* se determinó por espectroscopía IR el porcentaje de deslignificación del sólido recuperado al finalizar cada biorreacción. Los resultados se presentan en la Tabla 6.8, en dicha tabla se describen las variables experimentales para cada fermentación, así como la clave que se asignó a cada experimento (de F1 a F16). Además, se muestran los valores de celulosa expresados en porcentaje, para obtener dicho porcentaje se sometió un peso conocido del sólido recuperado de la biorreacción a una oxidación con permanganato de potasio (KMnO₄), el sólido resultante de la oxidación con KMnO₄ contiene principalmente celulosa, por lo que una vez que se tiene a peso constante, se calcinó la muestra a 500 °C, el porcentaje de celulosa se determinó como la pérdida de peso al determinar la ceniza, % Celulosa = $100 \% * (\frac{P_{ox}-P_{ce}}{P_{ox}})$, donde P_{ox} es el peso seco del sólido después de la oxidación química con KMnO₄, y P_{ce} es el peso de la ceniza, sección 5.4.1.

Tabla 6.8. Porcentaje de deslignificación y celulosa, obtenidos con *P. cinnabarinus*

Fermentación (clave)	Tamaño de partícula (X _A)	pH (X _B)	Temperatura (X _C)	% Deslignificación	% Celulosa
F1	0.074 mm	6	30° C	58.7166 ± 2.93583	17.85309 ± 0.53559
F2	0.074 mm	4	30° C	64.5793 ± 3.22896	20.72774 ± 0.62183
F3	0.25 mm	4	30° C	48.3147 ± 2.41574	6.35449 ± 0.19063
F4	0.25 mm	6	30° C	58.2303 ± 2.91151	17.7018 ± 0.53105
F5	0.25 mm	4	50° C	67.2448 ± 3.36224	11.27166 ± 0.33815
F6	0.074 mm	4	50° C	17.8235 ± 0.89117	14.7515 ± 0.44254
F7	0.25 mm	6	50° C	34.6912 ± 1.73456	9.98563 ± 0.29957
F8	0.074 mm	6	50° C	17.8235 ± 0.89117	14.07066 ± 0.42212
F9	0.25 mm	4	30° C	49.9300 ± 2.4965	5.06846 ± 0.15205
F10	0.074 mm	4	30° C	65.1300 ± 3.2565	17.09661 ± 0.5129
F11	0.25 mm	6	30° C	53.4700 ± 2.6735	22.39202 ± 0.67176
F12	0.074 mm	6	30° C	59.1100 ± 2.9555	13.38982 ± 0.40169
F13	0.25 mm	4	50° C	64.7300 ± 3.2365	7.11098 ± 0.21333
F14	0.074 mm	4	50° C	16.7200 ± 0.836	16.64271 ± 0.49928
F15	0.25 mm	6	50° C	37.9864 ± 1.89932	6.0519 ± 0.18156
F16	0.074 mm	6	50° C	16.1100 ± 0.8055	14.67585 ± 0.44028

De la Tabla 6.8 podemos resaltar que el porcentaje de deslignificación más alta fue de 67.24 % con un porcentaje de obtención de celulosa del 11.27 %, para el experimento con clave F5. Es decir, el 11.27 % de celulosa obtenida indica que esa fracción se encuentra deslignificada en un 67.24 %, por consiguiente, la deslignificación indica la pureza de la

celulosa obtenida. Todos los porcentajes de desdesignación y celulosa alcanzados al finalizar las fermentaciones se representan gráficamente en la Figura 6.38 y Figura 6.39, además en los gráficos se mencionan las variables controladas y las claves de los experimentos.

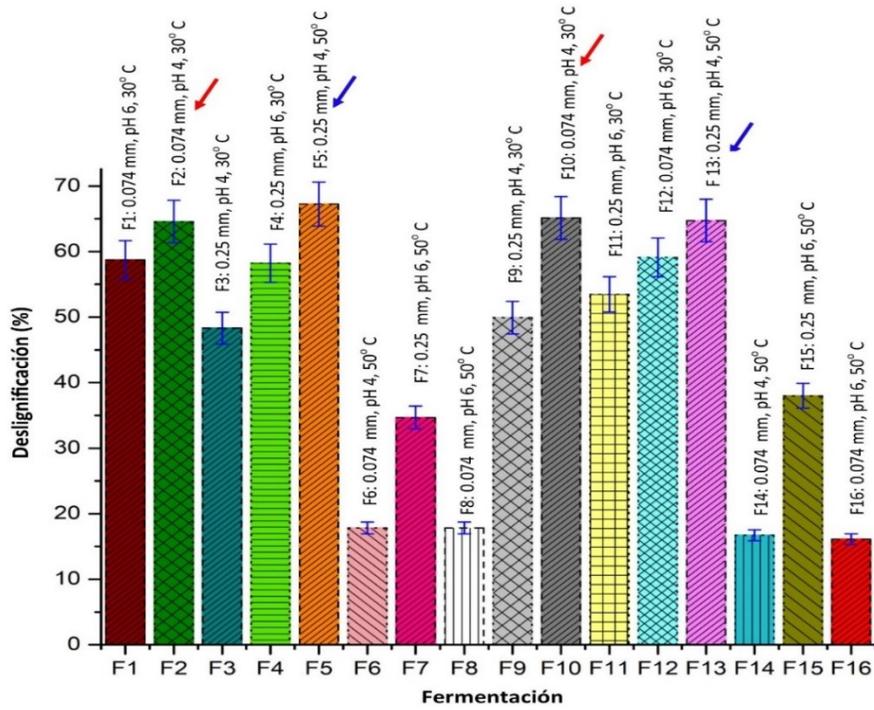


Figura 6.38. Porcentajes de desdesignación de *O. ficus indica*.

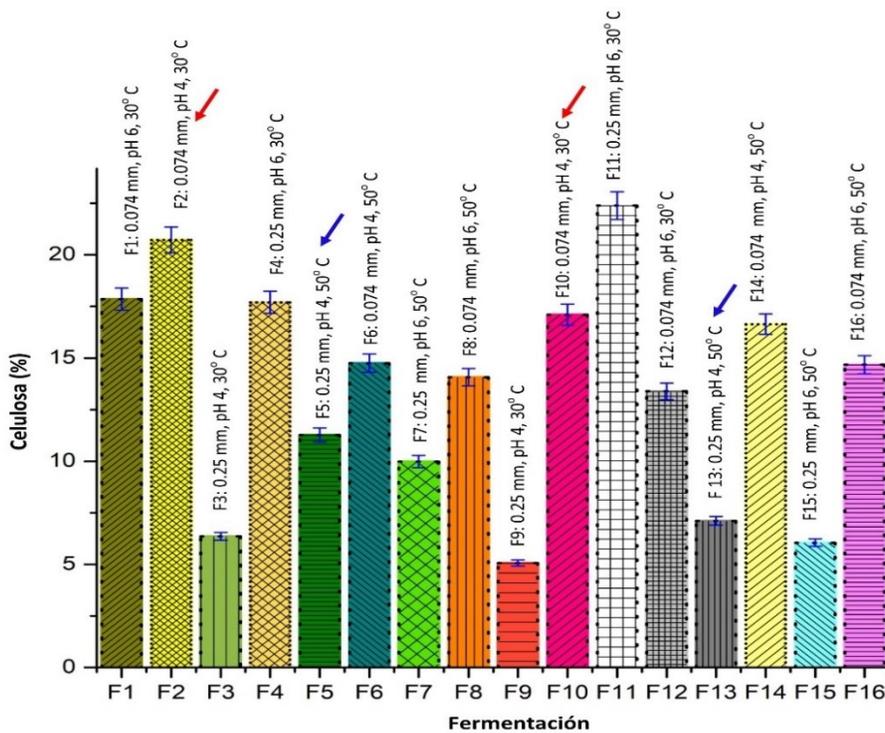


Figura 6.39. Porcentajes de celulosa obtenido con *P. cinnabarinus*.

Se puede apreciar en la Figura 6.38 y Figura 6.39 que, los porcentajes de celulosa y despolimerización de la lignina representados gráficamente son un tanto parecidos para algunas fermentaciones, esto es debido que la temperatura y el pH son cercanos a los óptimos de actividad catalítica para las lignocelulasas; esto ya ha sido descrito en la literatura por algunos autores como Eggert [9, 12] y Sigoillot [10]. Eggert [12] demostró que la temperatura y el pH óptimos para la actividad catalítica de la lacasa producida por *P. cinnabarinus* es de 45 °C y un pH de 4, respectivamente. Sigoillot [10] observó que para el mismo microorganismo los perfiles de temperatura de la celobiosa deshidrogenasa y xilanasas fueron muy similares a los de lacasa, con un pH óptimo de aproximadamente 5 y una estabilidad térmica de hasta 55 °C [9, 10, 12]. No obstante, los efectos de los factores y sus interacciones sobre la variable de respuesta que, en este caso, es el porcentaje de deslignificación, se pueden comprender mejor con un análisis de varianza (ANOVA), para esto se utilizó el software Statgraphics Centurion XVII®. En la Tabla 6.9 se presenta el análisis de varianza que surge a partir de la variable de respuesta alcanzada en las fermentaciones descritas en la Tabla 6.8, las cuales provienen del diseño de experimentos propuesto para *P. cinnabarinus*.

Tabla 6.9. Análisis de varianza para las fermentaciones con *P. cinnabarinus*.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
X _A : Tamaño de partícula	607.376	1	607.376	326.23	0.0000
X _B : pH	212.576	1	212.576	114.18	0.0000
X _C : Temperatura	2124.29	1	2124.29	1140.97	0.0000
X _A X _B	69.4722	1	69.4722	37.31	0.0005
X _A X _C	1887.47	1	1887.47	1013.77	0.0000
X _B X _C	236.237	1	236.237	126.88	0.0000
X _A X _B X _C	441.21	1	441.21	236.98	0.0000
Error total	13.0328	7	1.86183		
Total (corr.)	5602.16	15			

El ANOVA particiona la variabilidad del porcentaje de deslignificación en piezas separadas para apreciar cada uno de los *efectos principales e importantes* durante las fermentaciones, tanto los factores como sus combinaciones tienen un valor-P menor a 0.05, esto indica con un 95 % de confianza que son significantes en el proceso de deslignificación de *O. ficus indica*. El valor que se observa en la razón-F muestra el grado de relevancia de los factores y de sus combinaciones en el bioproceso, es decir, la temperatura tiene un efecto principal con una razón-F de 1140.97, seguido de la combinación de los factores temperatura con tamaño de partícula que tienen un efecto importante con una razón-F de 1013.77, lo mismo se puede deducir del cuadrado medio. No obstante, es de suma importancia resaltar el nivel de factor o combinación de factores favorece a la variable respuesta, esto se puede apreciar en la Figura 6.40.

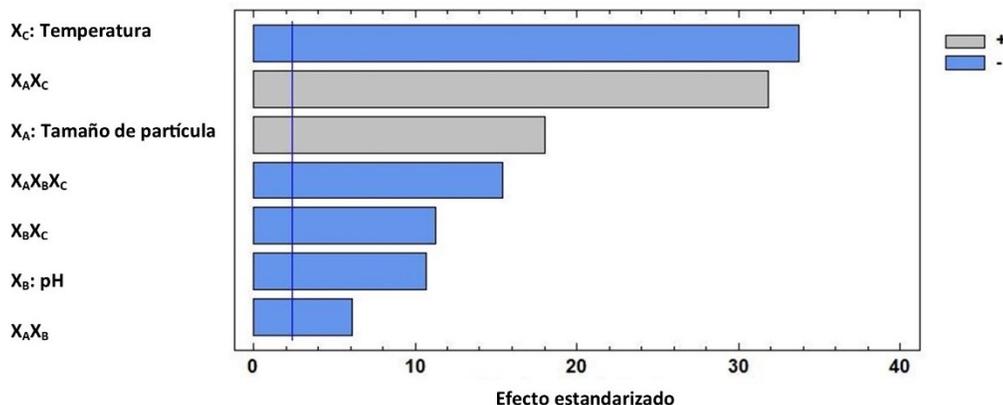


Figura 6.40. Diagrama de Pareto estandarizado para el porcentaje de deslignificación.

De la Figura 6.40 se puede apreciar que la variable (o factor) temperatura en su nivel bajo (30 °C) tiene el mayor efecto principal, la combinación de variables AC en su nivel alto tienen un efecto importante, es decir, a tamaño de partícula de 0.25 mm y temperatura de 50 °C. El pH como una de las variables en el proceso se aprecia que tiene un efecto principal bajo, esto para pH de 4. Sin embargo, debe prestarse mucha atención en la interacción del pH con las otras dos variables, ya que demuestra un efecto relevante para el proceso. Como ya se discutió anteriormente, las ligninasas tienen un pH y una temperatura óptima que favorecen su actividad enzimática, de tal forma que, tanto experimentalmente como basándonos en la literatura se puede inferir la relevancia del control del pH y la temperatura en 4 UpH y 50 °C, respectivamente, al menos para el bioproceso planteado con *P. cinnabarinus*, usando como sustrato a *O. ficus indica*. El tamaño de partícula es una de las variables con un efecto principal alto en su nivel (+1) de 0.25 mm, es decir, cuando las partículas del residuo de *O. ficus indica* son grandes, proporcionan al microorganismo un soporte que permite la germinación de las basidiosporas y el crecimiento de los fragmentos de las hifas, reduciendo los daños morfológicos durante la reproducción sexual y asexual del microorganismo, lo cual es provocado principalmente por la agitación mecánica [25, 46].

6.5.2 Evaluación de las condiciones de operación durante la deslignificación de *O. ficus indica*.

Se exploró de una forma detallada la región experimental propuesta en el diseño experimental para deslignificar las espinas de *O. ficus-indica* usando el hongo *P. cinnabarinus*, para ello se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR). La MSR es una estrategia experimental y de análisis que permite resolver el problema de encontrar las condiciones de operación óptimas de un proceso, es decir, aquellas que dan por resultado “valores óptimos” de una o varias características de un proceso, o características de calidad de un producto [33]. Las Superficies y Contornos asociados a la respuesta estimada (**% de deslignificación**) se presentan en el anexo 9.1, no obstante, en la Tabla 6.10, se muestran los porcentajes de deslignificación obtenidos gráficamente de los contornos de las superficies relacionadas con la variable respuesta, de dicha tabla se puede inferir que se tienen dos óptimos durante la deslignificación de las espinas de *O. ficus indica*, de 64 % de deslignificación, el primero para la siguiente combinación de variables: pH de 4, tamaño de partícula de 0.25 mm y temperatura de 50 °C; y el segundo a pH de 4, tamaño de partícula de 0.074 mm y temperatura de 30 °C.

Tabla 6.10. Resultados de la exploración de las superficies del porcentaje de deslignificación.

Pivote	Variables fijas		% deslignificación
	Temperatura (°C)	Tamaño de partícula (mm)	
sin considerar el efecto	0.25	4	56
50	0.25	4	64
30	0.074	4	64
Tamaño de partícula (mm)	Temperatura (°C)	pH	
sin considerar el efecto	30	6	56
0.25	50	4	64
0.074	30	4	64
pH	Temperatura (°C)	Tamaño de partícula (mm)	
sin considerar el efecto	30	0.074	56
6	30	0.074	56
4	50	0.25	64
4	30	0.074	64

La exploración de la región experimental propuesta en el diseño experimental de *P. cinnabarinus*, sugiere que el modelo que describe el porcentaje de deslignificación es de primer orden, dicho modelo se presenta en la ecuación 9, donde **Y** representa el porcentaje de deslignificación, **X_A**, **X_B** y **X_C** fueron descritos previamente en la Tabla 5.2.

$$Y = 45.6625 + 6.16125X_A - 3.645X_B - 11.5225X_C - 2.08375X_AX_B + 10.8613X_AX_C - 3.8425X_BX_C - 5.25125X_AX_BX_C \dots \text{ ec. (9)}$$

En la Tabla 6.11 se muestra el predicho encontrado con la ecuación 9, la cual asegura con un 99.7674 % de confianza la validez de la predicción, también se muestra el intervalo de confianza.

Tabla 6.11. Valor observado y predicho para el porcentaje de deslignificación.

Fermentación (clave)	Observados	Predicho	Intervalo de confianza	
			Inferior 95.0%	Superior 95.0%
F3	48.31	48.31	45.8901	50.7299
F16	16.11	16.155	13.7351	18.5749
F7	34.69	35.53	33.1101	37.9499
F11	53.47	55.04	52.6201	57.4599
F2	64.58	64.045	61.6251	66.4649
F12	59.11	58.105	55.6851	60.5249
F6	17.82	16.46	14.0401	18.8799
F13	64.73	65.175	62.7551	67.5949
F4	58.23	56.66	54.2401	59.0799
F5	67.24	66.795	64.3751	69.2149
F1	58.72	59.725	57.3051	62.1449
F9	49.93	49.93	47.5101	52.3499
F8	17.82	17.775	15.3551	20.1949
F15	37.99	37.15	34.7301	39.5699
F14	16.72	18.08	15.6601	20.4999
F10	65.13	65.665	63.2451	68.0849

El modelo de la ecuación 9 se obtuvo a través de una regresión lineal múltiple, la cual se realizó con ayuda del software Statgraphics Centurion XVII®. La validez de los resultados que se presentaron en el análisis de varianza, quedan supeditados a que los supuestos del modelo se cumplan, estos supuestos son: *normalidad, varianza constante e independencia*, es decir, la respuesta **Y (% de deslignificación)** debe tener una distribución normal, con la misma varianza en cada tratamiento y las mediciones deben ser independientes [33] (para la validación de supuestos véase anexo 9.3.1).

Uno de los últimos tratamientos que se realizó a los datos experimentales obtenidos de las fermentaciones con *P. cinnabarinus*; durante la etapa de deslignificación, es la optimización del predicho, bajo el supuesto de un modelo de primer orden, el método del ascenso más pronunciado es utilizado para moverse en la dirección del incremento máximo en la respuesta. Para este caso y considerando los valores predichos, es la media de las fermentaciones con clave F5-F13, y F2-F10 dando como resultado 65.9774 ± 3.2994 , y 64.85465 ± 3.24273 % de deslignificación, lo anterior para el tamaño de partícula de 0.25 mm, un pH de 4 y una temperatura de 50 °C; y tamaño de partícula de 0.074 mm, un pH de 4 y una temperatura de 30 °C, respectivamente.

La Figura 6.41 describe el promedio del comportamiento del ORP, OD, biomasa y CRT para las fermentaciones F5 y F13. El ORP indica que en los dos primeros días se tuvo un medio de cultivo reductor, por lo que las reacciones predominantes en el biorreactor fueron de oxidación, posiblemente de las enzimas lignocelulolíticas actuando sobre el sustrato, es decir, se estaba llevando a cabo la hidrólisis de la lignina, además la despolimerización de pectina, hemicelulosa o celulosa, esto se sustenta al observarse un incremento de los CRT en el medio de cultivo, alcanzando una concentración de 2200 ppm al tercer día de haber iniciado las biorreacciones, dichos carbohidratos son liberados en forma de monómeros, posiblemente precursores de la pectina, la hemicelulosa o la celulosa [9, 10, 12, 27]. Por otro lado, la biomasa presenta una alta concentración al cuarto día, alcanzando las 2500 ppm, el consumo de OD, que alcanza un mínimo en este mismo punto, se puede atribuir al oxígeno usado por las enzimas ligninolíticas para la hidrólisis de la lignina y al metabolismo intracelular del microorganismo. Para más detalles sobre la operación de los fermentadores véase el anexo 9.5.1.

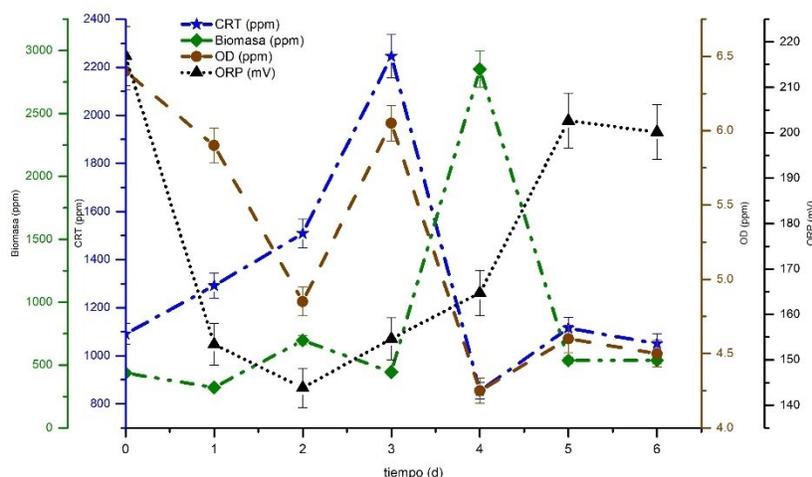


Figura 6.41. Comportamiento del ORP, OD, Biomasa y CRT (promedios biorreacciones F5-F13): pH 4, tamaño de partícula de 0.25 mm y temperatura de 50 °C.

En la Figura 6.42 se muestra la comparación de los espectros IR de la celulosa (Sigma Aldrich®), la materia prima y del sólido recuperado de la fermentación F5, de lo anterior se resalta lo siguiente: en el espectro IR de la materia prima se identificó la banda característica del grupo funcional C-O del anillo aromático del alcohol sinapílico y el alcohol coniferílico, los cuales son precursores de la lignina, en el intervalo de número de onda de (1270 a 1220) cm^{-1} con un tipo de vibración de tensión y una intensidad intermedia [45]; en relación al espectro IR del sólido recuperado al final de la fermentación se tiene que, disminuye el porcentaje de transmitancia de la banda característica del grupo funcional C-O referido previamente, indicando esto que reduce la concentración de la lignina en dicho sólido, demostrando así la actividad enzimática de las enzimas lignocelulolíticas actuando sobre el sustrato, en particular la lacasa que degrada lignina de manera eficiente actuando en sinergia con el metabolito 3-hidroxiantranilato [12], dicho espectro IR presenta bandas características del espectro IR de la celulosa grado reactivo, aunque aún con bandas de la lignocelulosa, ya que el porcentaje de deslignificación alcanzado para esa fermentación fue de 67 %, (véase anexo 9.5.2 donde se presentan los espectros IR de todos los fermentadores).

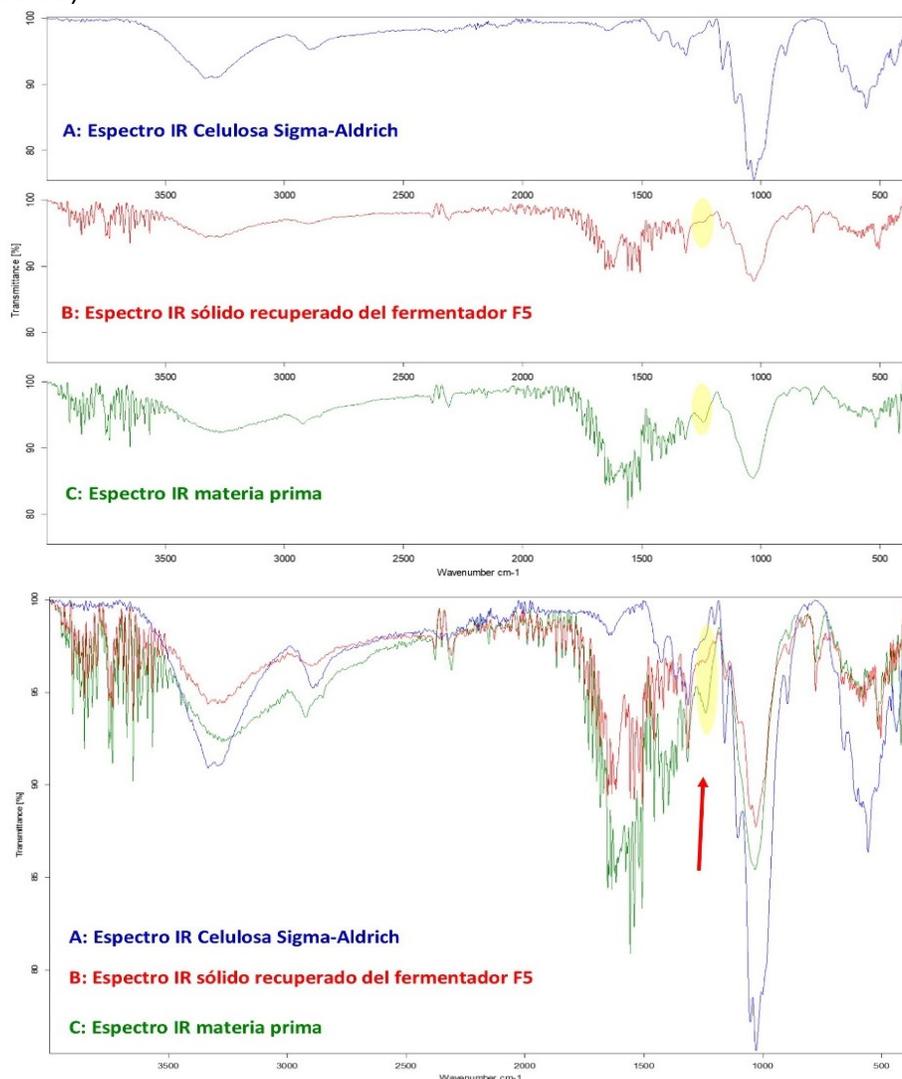


Figura 6.42. Comparación de espectros infrarrojos de la celulosa, la materia prima y el sólido recuperado del biorreactor F5.

Para realizar el análisis y procesamiento de los espectros IR se utilizó el software Opus versión 7.5 (Bruker).

En la Tabla 6.12 se muestra una comparación entre diferentes procesos enfocados a deslignificar distintos materiales lignocelulósicos, algunos de ellos combinan el proceso biológico con procesos químicos, en donde se utiliza peróxido de hidrógeno o algún álcali, además emplean ultrasonido para incrementar los fenómenos difusivos durante la despolimerización de la lignina, logrando porcentajes de deslignificación variados, esto debido a la composición de la materia prima de la cual parten; en el proceso planteado en el presente estudio se alcanzan rendimientos que compiten dichos procesos, demostrando así la viabilidad técnica del proceso biotecnológico para obtener celulosa de *O. ficus indica*, utilizando la actividad enzimática de *P. cinnabarinus* [47-52].

Tabla 6.12. Comparativo de porcentajes de deslignificación, entre diferentes procesos.

Proceso	Factor deslignificante	Materia Prima	Tiempo de biorreacción	%D	Referencia
Biológico	Consortio de Basidiomicetos	Tallos de bambú	12 semanas	50	[49]
	<i>Punctularia sp.</i>	Tallos de bambú	12 semanas	53.3	
	<i>Irpex lacteus</i>	Rastrojo de maíz	6 semanas	43.8	[50]
Biológico-ultrasonido-H ₂ O ₂	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Cascara de arroz	3 semanas	49.6	[51]
Biológico-álcali-ultrasonido	<i>Panus (Lentinus) tigrinus</i>	Abedul/Pino	4 a 12 días	45	[52]
Biológico	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Espinas de nopal	7 días	67	Presente estudio

%D: porcentaje de despolimerización (deslignificación)

6.6 Evaluación de la capacidad de *Aspergillus niger* para hidrolizar celulosa.

En esta fase experimental (Figura 6.43) se tomaron muestras cada 24 horas con la finalidad de monitorear la adaptación de *A. niger* para despolimerizar la celulosa recuperada de las fermentaciones con *P. cinnabarinus*. El proceso de preparación de inóculo de *A. niger* se resumen en la Figura 5.19, los parámetros que se determinan durante la operación de los biorreactores se describieron en la sección 5.7.2.2.

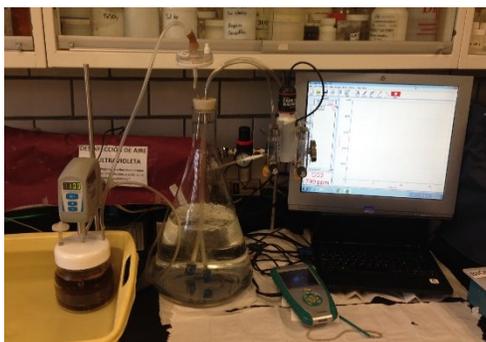


Figura 6.43. Adaptación de *A. niger* a despolimerizar celulosa.

En la Figura 6.44 se muestran el promedio de la variación del Oxígeno disuelto (OD), la Biomasa, los carbohidratos reductores totales (CTR) y la concentración del ácido cítrico dentro de los biorreactores que operaron a la siguiente concentración de metales traza: (70 Cu, 75 Zn, 56 Mn) ppb (clave: **BR1**); se puede apreciar que la disminución del Oxígeno disuelto se debe a la respiración celular, así como la disminución en la concentración del cosustrato es debido al metabolismo de *A. niger*, provocando un incremento en la biomasa a partir del primer día. Dicho aumento de biomasa está influenciado principalmente por el consumo del cosustrato (glucosa), representado en el gráfico como gramos por litro de carbohidratos reductores totales (CRT). Por otro lado, es importante mencionar que a partir del primer día el microorganismo comenzó a producir ácido cítrico, además se observa una disminución en la fuente de Carbono (glucosa) para el mismo día, debido a que es un carbohidrato que se absorbe fácilmente por difusión en el micelio de *A. niger* para ser metabolizado [20].

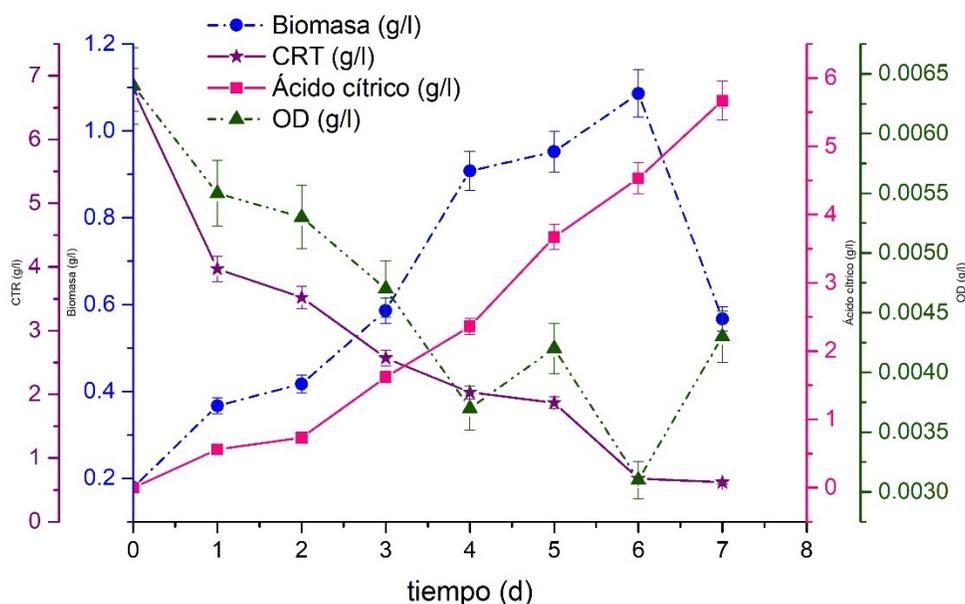


Figura 6.44. Variación de las concentraciones de biomasa, CRT, Oxígeno disuelto y ácido cítrico dentro de los biorreactores, BR1 (pH=3, 10 g/L de celulosa y 7 g/L de glucosa).

A continuación, en la Figura 6.45 se muestran los promedios de la variación del Oxígeno disuelto (OD), la Biomasa, los carbohidratos reductores totales (CTR) y la concentración del ácido cítrico dentro de los biorreactores que operaron a la siguiente concentración de metales traza: (20 Cu, 50 Zn, 40 Mn) ppb (clave: **BR2**), tanto el consumo de la fuente de Carbono, así como la disminución del Oxígeno disuelto al primero día se deben al metabolismo del microorganismo, de igual manera que en el caso presentado en el gráfico previo (Figura 6.44), al primer día se observa un incremento en las concentraciones de biomasa y ácido cítrico.

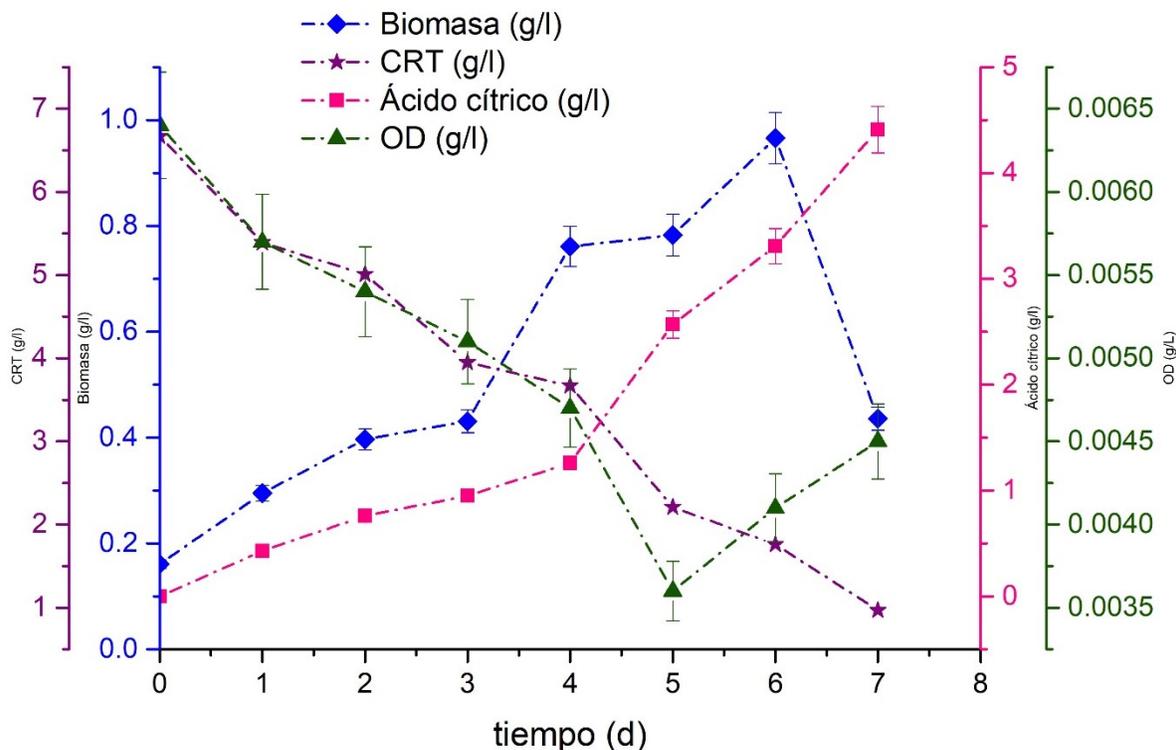


Figura 6.45. Variación de las concentraciones de biomasa, CRT, Oxígeno disuelto y ácido cítrico dentro de los biorreactores, BR2 (pH=3, 10 g/L de celulosa y 7 g/L de glucosa).

En cuanto al pH, tanto los experimentos descritos en la Figura 6.44 y Figura 6.45, no presentaron variaciones significantes, debido al uso de buffer de pH 3 (preparación descrita en la sección 5.5).

Por otro lado, en cuanto a la operación de los biorreactores (clave: BRb) a los que no se les adicionó buffer de pH 3, sin cosustrato (glucosa) y sin adición de metales traza, se tiene que la variación del Oxígeno disuelto (OD), la Biomasa, los carbohidratos reductores totales (CTR) y la concentración del ácido cítrico, representados en la Figura 6.46, donde se muestran promedios, el máximo alcanzado en la concentración de carbohidratos reductores totales que se determinó en el medio de cultivo es de 0.18 gramos por litro, por lo que se infiere que la celulosa comienza a despolimerizarse debido a las enzimas extracelulares (enzimas celulolíticas) excretadas al medio de cultivo por *A. niger*, sin embargo, tanto la concentración de biomasa como de ácido cítrico no son significantes al séptimo día, provocando una fermentación con una baja producción de ácido cítrico.

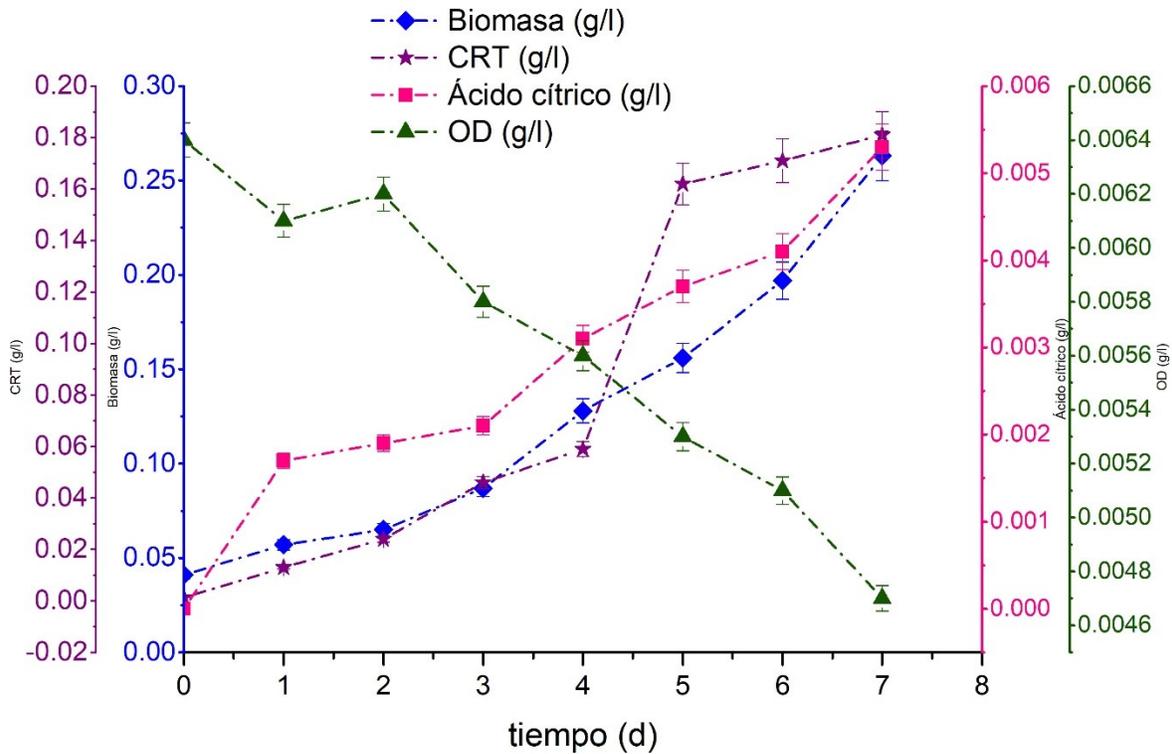


Figura 6.46. Variación de las concentraciones de biomasa, CRT, Oxígeno disuelto y ácido cítrico dentro de los biorreactores, BRb (pH= 6.7, 10 g/L de celulosa, sin glucosa).

De la fase de adaptación de *A. niger* para sacarificar el sustrato (celulosa) utilizando un cosustrato (glucosa), se determinó el rendimiento de la hidrólisis del sustrato por acción de las exoenzimas (celulasas) excretadas al medio de cultivo por *A. niger* para usar como fuente de Carbono a la celulosa, el experimento con clave BR2 tuvo un mayor rendimiento de hidrólisis, seguido del experimento BR1 (Tabla 6.13). El % de hidrólisis = $\left(\frac{Cr \cdot 0.9 \cdot 100}{C_{su}}\right)$, donde: C_r es la concentración del carbohidrato reductor en el medio de cultivo y C_{su} es la concentración total de carbohidratos reductores en el sustrato.

Tabla 6.13. Despolimerización de la materia prima durante la etapa de adaptación de *A. niger*.

VARIABLES CONTROLADAS	Clave fermentación	% hidrólisis
pH 3, (70 Cu, 75 Zn, 56 Mn) ppb, 30 °C	BR1	7.8
pH 3, (20 Cu, 50 Zn, 40 Mn) ppb, 30 °C	BR2	12.5
Blanco*	BRb	3.3

*Blanco: pH del medio de cultivo 6.7, sin metales traza, temperatura ambiente.

6.7 Análisis de la operación de las fermentaciones con *A. niger*

Durante el desarrollo de esta fase experimental en la que se ejecutó el diseño de experimentos propuesto para obtener ácido cítrico con la cepa fúngica *A. niger*, se llevaron a cabo fermentaciones (Figura 6.47) durante las cuales se monitorearon los biorreactores como se describió en secciones previas. En cuanto a la agitación, el volumen de aire por volumen de medio de cultivo por minuto (vvm) y la temperatura, a la que operaron todas las fermentaciones fueron los siguientes: agitación 200 rpm, aire 1 vvm y 30 °C (condiciones de operación típicas reportadas en la literatura, para obtener ácido cítrico con *A. niger*).



Figura 6.47. Fermentaciones aplicando el diseño de experimentos para *A. niger*.

6.7.1 Análisis de la hidrólisis de la celulosa para la obtención del ácido cítrico

Durante la ejecución del diseño experimental propuesto para *A. niger* se determinó por espectroscopía UV-vis la concentración de ácido cítrico en los medios de cultivo, en la Tabla 6.14 se muestran los resultados al séptimo día, en dicha tabla se indican las variables reales para cada fermentación, así como la clave que se asignó a cada experimento (de E1 a E16).

Tabla 6.14. Concentración de ácido cítrico y variables reales para las fermentaciones con *A. niger*.

Experimento	pH	Celulosa (g/L)	Medio de cultivo	Ácido cítrico (g/L)
E1	4	30	B	5.3309 ± 0.26654
E2	4	20	*A	6.32914 ± 0.31646
E3	2	20	B	3.6368 ± 0.18184
E4	2	30	A	2.85248 ± 0.14262
E5	2	30	**B	2.9456 ± 0.14728
E6	2	20	A	1.7583 ± 0.08791
E7	4	30	A	1.0078 ± 0.05039
E8	4	20	B	3.01452 ± 0.15073
E9	4	30	B	5.1485 ± 0.25743
E10	4	20	A	6.1038 ± 0.30519
E11	2	20	B	3.6934 ± 0.18467

E12	2	30	A	2.7483 ± 0.13742
E13	2	30	B	2.9076 ± 0.14538
E14	2	20	A	1.6062 ± 0.08031
E15	4	30	A	1.0554 ± 0.05277
E16	4	20	B	3.0372 ± 0.15186

* Medio de cultivo A: Concentración de metales (70 Cu, 75 Zn, 56 Mn) ppb.
 ** Medio de cultivo B: Concentración de metales (20 Cu, 50 Zn, 40 Mn) ppb.

De la Tabla 6.14 podemos resaltar que la mayor concentración de ácido cítrico 6.3 g/L se obtuvo en el experimento con clave E2, que, junto con su réplica, el experimento con clave E10, el cual alcanzó producción de ácido cítrico de 6.1 g/L, fueron los más altos. No obstante, el experimento E1 y su réplica, el experimento E9, alcanzaron en promedio 5.3 g/L de dicho ácido orgánico. Todas las concentraciones de ácido cítrico presentadas en la Tabla 6.14, se representan gráficamente en la Figura 6.48, además en el gráfico se menciona la clave del experimento y las variables controladas durante el mismo.

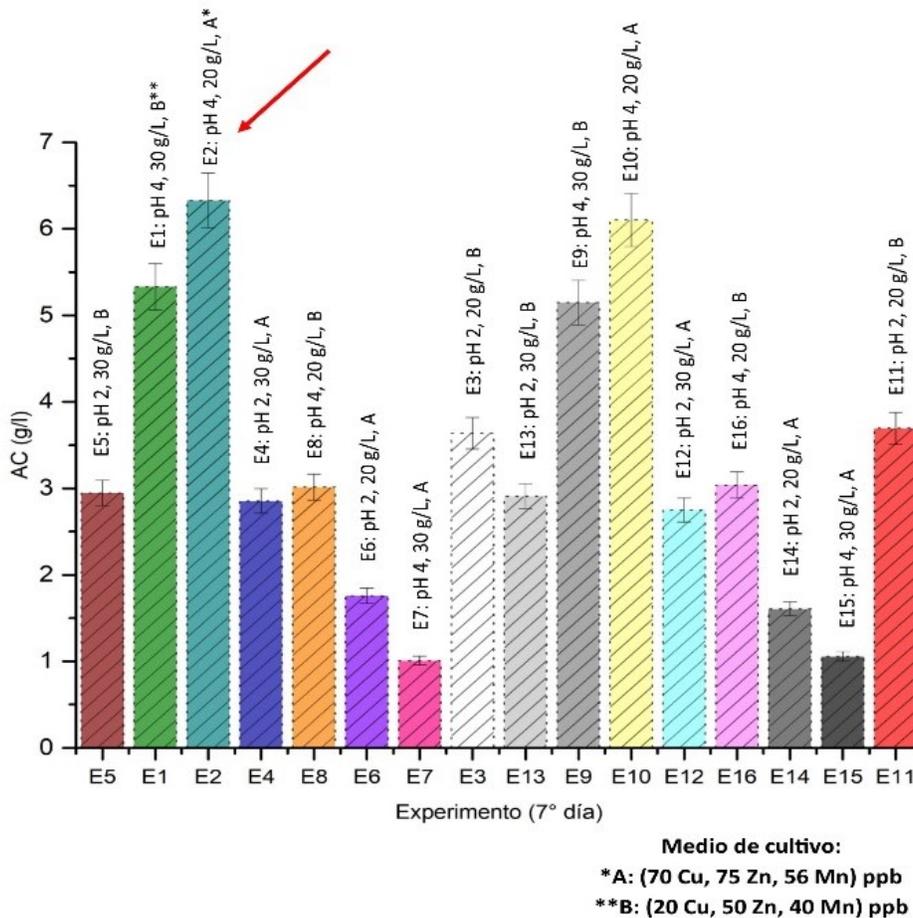


Figura 6.48. Concentraciones de ácido cítrico producidas en cada uno de los experimentos con *A. niger*.

Mediante un análisis de varianza (ANOVA) se puede tener una visión resumida de los factores y sus interacciones sobre la variable de respuesta que, en este caso, es la concentración de ácido cítrico. En la Tabla 6.15 se presenta el análisis de varianza de la concentración de ácido cítrico alcanzada en las fermentaciones descritas en la Tabla 6.14, el ANOVA se generó con el software Statgraphics Centurion XVII®.

Tabla 6.15. Análisis de varianza para las fermentaciones con *A. niger*

Variable	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Error estándar	Razón-F	Valor-P
X_A : pH	4.9267	1	4.9267	1.570	628.36	0.0000
X_B : Celulosa	1.6788	1	1.6788	0.916	214.11	0.0000
X_C : Medio de cultivo	2.4438	1	2.4438	1.105	311.69	0.0000
$X_A X_B$	2.8067	1	2.8067	1.185	357.97	0.0000
$X_A X_C$	0.2979	1	0.2979	0.386	37.99	0.0003
$X_B X_C$	7.6786	1	7.6786	1.959	979.33	0.0000
$X_A X_B X_C$	21.4154	1	21.4154	3.272	2731.32	0.0000
Error total	0.06273	8	0.00784	0.177		
Total (corr.)	41.3106	15				

Como ya se discutió previamente el ANOVA particiona la variabilidad en este caso de la concentración del ácido cítrico, en piezas separadas para apreciar cada uno de los *efectos principales e importantes* durante las biorreacciones, tanto los factores como sus combinaciones tienen un valor-P menor a 0.05, esto indica con un 95 % de confianza que son significativos en el proceso de hidrólisis de celulosa para obtener ácido cítrico. El valor que se observa en la razón-F muestra el grado de relevancia de los factores y de sus combinaciones en el bioproceso, es decir, la interacción entre el pH, la concentración de metales traza en el medio de cultivo y los gramos de celulosa iniciales, tiene el mayor efecto sobre el conjunto de experimentos con una razón-F de 2731.32, seguido de la combinación de los factores celulosa y medio de cultivo con una razón-F de 979.33, lo mismo se puede inferir del cuadrado medio. No obstante, es de suma importancia resaltar que nivel de factor o combinación de factores favorece a la variable de respuesta, esto se puede apreciar en la Figura 6.49.

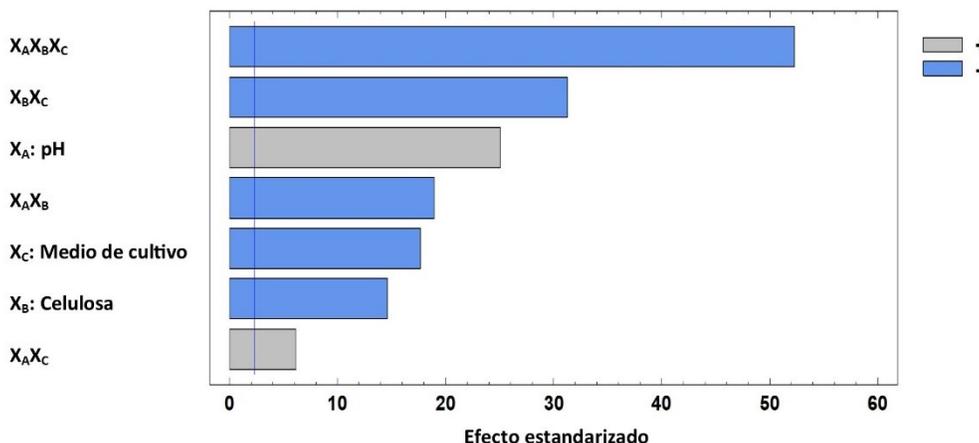


Figura 6.49. Diagrama de Pareto estandarizado para la concentración de ácido cítrico.

Después de lo observado en el ANOVA para los experimentos con *A. niger*, es importante señalar cual es el nivel de variable que favoreció la formación de ácido cítrico en los biorreactores. En la Figura 6.49 se tiene que la interacción entre el pH, la concentración de metales traza en el medio de cultivo y los gramos de celulosa en sus niveles -1, tienen el mayor efecto sobre el conjunto de experimentos, es decir, pH 2, concentración de metales (20 Cu, 50 Zn, 40 Mn) ppb y 20 g de celulosa. Por otro lado, la combinación de las variables celulosa y medio de cultivo en sus niveles -1, tuvieron un efecto importante sobre los experimentos. Lo anterior, es un indicativo de la correcta selección de variables a controlar en esta fase del bioproceso, toda vez que, son las interacciones de las variables las que tuvieron un efecto importante durante las fermentaciones para obtener ácido cítrico.

En cuanto a la influencia de las variables por separado, se tiene que tanto la razón-F en el ANOVA, así como el diagrama de Pareto, indican lo siguiente: la variable pH tiene una razón-F mayor, seguida de la variable medio de cultivo y los gramos de celulosa, en los niveles pH 4, concentración de metales (20 Cu, 50 Zn, 40 Mn) ppb y 20 g/L de celulosa favorece la formación del producto.

6.7.2 Evaluación de las condiciones de operación durante la obtención del ácido cítrico.

Hasta el momento aún son insuficientes los elementos para inferir el conjunto de niveles de las variables controladas, los cuales favorecieron al bioproceso de obtención de ácido cítrico, sin embargo, se exploró en una forma detallada la región experimental en la obtención de dicho ácido orgánico, utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR), con el propósito de determinar las condiciones óptimas [33-35]. En este caso la respuesta estimada es la concentración de ácido cítrico en g/L, para lo cual se generaron las Superficies y Contornos asociados a dicha respuesta (véase anexo 9.2), para simplificar los resultados, en la Tabla 6.16, se muestran las concentraciones de ácido cítrico obtenidas gráficamente de los contornos de las superficies, se puede inferir que se tiene un óptimo durante la obtención de ácido cítrico de 5.6 g/L, para la siguiente combinación de variables: pH de 4, 20 g de Celulosa y Medio de cultivo A: concentración de metales traza: 70 ppb Cu, 75 ppb Zn y 56 ppb Mn.

Tabla 6.16. Resultados de la exploración de las superficies de la concentración de ácido cítrico.

Pivote	Variables fijas		Ácido cítrico (g/L)	
	Medio de cultivo	Celulosa (g/L)		pH
sin considerar el efecto		20	4	4.0
A		20	4	5.6
B		30	4	4.8
pH	Medio de cultivo	Celulosa (g/L)		
sin considerar el efecto	B	30		4.0
4	A	20		5.6
2	B	30		3.2
Celulosa (g/L)	pH	Medio de cultivo		
sin considerar el efecto	4	B		4.0
30	4	B		4.8
20	4	A		5.6

* Medio de cultivo A: Concentración de metales (70 Cu, 75 Zn, 56 Mn) ppb.

** Medio de cultivo B: Concentración de metales (20 Cu, 50 Zn, 40 Mn) ppb.

Asimismo, la exploración de la región experimental propuesta en el diseño experimental para obtener ácido cítrico con *A. niger*, sugiere que el modelo que describe dicha concentración es de primer orden, dicho modelo se presenta en la ecuación 10, donde Y representa la concentración de ácido cítrico en g/L, X_A : pH, X_B : Celulosa y X_C : Medio de cultivo.

$$Y = 3.32349 + 0.554906X_A - 0.323919X_B - 0.390819X_C - 0.418831X_AX_B + 0.136444X_AX_C - 0.692756X_BX_C - 1.15692X_AX_BX_C \dots \text{ec. (10)}$$

En la Tabla 6.17 se muestra el predicho encontrado con la ecuación 10, la cual asegura con un 99.8482 % de confianza la validez de la predicción, también se muestra el intervalo de confianza.

Tabla 6.17. Valor observado y predicho para la concentración de ácido cítrico, g/L.

<i>Experimento</i>	<i>Observados g/L</i>	<i>Predicho g/L</i>	<i>Intervalo de confianza</i>	
			<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
E5	2.9456	2.9266	2.78221	3.07099
E1	5.3309	5.2397	5.09531	5.38409
E2	6.3291	6.21645	6.07206	6.36084
E4	2.8525	2.8004	2.65601	2.94479
E8	3.0145	3.02585	2.88146	3.17024
E6	1.7583	1.68225	1.53786	1.82664
E7	1.0078	1.0316	0.887215	1.17599
E3	3.6368	3.6651	3.52071	3.80949
E13	2.9076	2.9266	2.78221	3.07099
E9	5.1485	5.2397	5.09531	5.38409
E10	6.1038	6.21645	6.07206	6.36084
E12	2.7483	2.8004	2.65601	2.94479
E16	3.0372	3.02585	2.88146	3.17024
E14	1.6062	1.68225	1.53786	1.82664
E15	1.0554	1.0316	0.887215	1.17599
E11	3.6934	3.6651	3.52071	3.80949

El modelo de la ecuación 10 se obtuvo a través de una regresión lineal múltiple, la cual se realizó con ayuda del software Statgraphics Centurion XVII®.

En relación con los supuestos de normalidad, varianza constante e independiente, asociados a los resultados presentados en el ANOVA para el ácido cítrico, estos quedan supeditados a que los supuestos del modelo se cumplan, dicho de otra manera, la respuesta *Y (g/L de ácido cítrico)* debe tener una distribución normal, con la misma varianza en cada tratamiento y las mediciones deben ser independientes (véase anexo 9.3.2) [33].

Uno de los últimos tratamientos que se realizó a los datos experimentales obtenidos de las biorreacciones con *Aspergillus niger*, durante la obtención de ácido cítrico, es la optimización del predicho, bajo el supuesto de un modelo de primer orden, el método del camino de máximo ascenso fue utilizado para moverse en la dirección del incremento máximo en la respuesta (concentración de ácido cítrico). Para este caso y considerando los valores predichos, es la media de las biorreacciones E2 y E10, dando como resultado 6.21645 g/L de ácido cítrico, esto para la combinación de variables: pH de 4, 20 g/L de celulosa y concentración de metales 70 ppb Cu, 75 ppb Zn y 56 ppb Mn.

En la Figura 6.50 se presenta el promedio del comportamiento de la biomasa, Oxígeno disuelto, concentración de carbohidratos reductores y ácido cítrico (AC) para las fermentaciones E2 y E10. El consumo de la celulosa indica que las exoenzimas (celulasas) de *A. niger* degradan el sustrato (celulosa), cabe señalar que para esta determinación se cuantificaron los carbohidratos reductores totales por el método del ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS) [3, 8, 9], también se determinó para cada muestra el contenido de celulosa [25] (como se describió en la sección 5.4.1), es decir, se analizó la fase líquida y sólida de las muestras obtenidas durante las biorreacciones. Por otro lado, se observa que

el aumento en la biomasa ocasiona una disminución en la concentración del Oxígeno disuelto presente en el medio de cultivo, alcanzando aproximadamente un mínimo de 3.5 ppm de OD. Así como un máximo de 1.1 g/L de biomasa. En cuanto al ácido cítrico se alcanzó una concentración cercana a 6.3 g/L. Además, se determinaron para los biorreactores E2 y E10 el coeficiente de rendimiento de sustrato consumido para formar producto y el coeficiente de rendimiento de sustrato consumido para formar biomasa ($Y_{x/s}$ y $Y_{p/s}$), en promedio $Y_{x/s} = 0.25$ (g biomasa/g sustrato) y $Y_{p/s} = 0.746$ (g producto/g sustrato).

$$Y_{x/s} = \frac{(C_{bf} - C_{bi})}{(C_{si} - C_{sf})} \text{ y}$$

$$Y_{p/s} = \frac{(C_{pf} - C_{pi})}{(C_{si} - C_{sf})}, \text{ donde:}$$

C_{bf} es la concentración de biomasa al final de la biorreacción, C_{bi} es la concentración de biomasa en el inóculo, C_{si} es la concentración del sustrato al inicio de la biorreacción, C_{sf} es la concentración del sustrato al final de la biorreacción, C_{pf} es la concentración del producto al final de la biorreacción y C_{pi} es la concentración del producto al inicio de la biorreacción.

En la Tabla 6.18 se muestran los coeficientes $Y_{x/s}$ y $Y_{p/s}$ agrupados por experimento y réplica, y en la Figura 6.51 se muestra un gráfico de barras con los coeficientes de rendimiento de sustrato consumido para formar producto y coeficientes de rendimiento de sustrato consumido para formar biomasa. Para más detalles sobre la operación de los fermentadores véase el anexo 9.6.

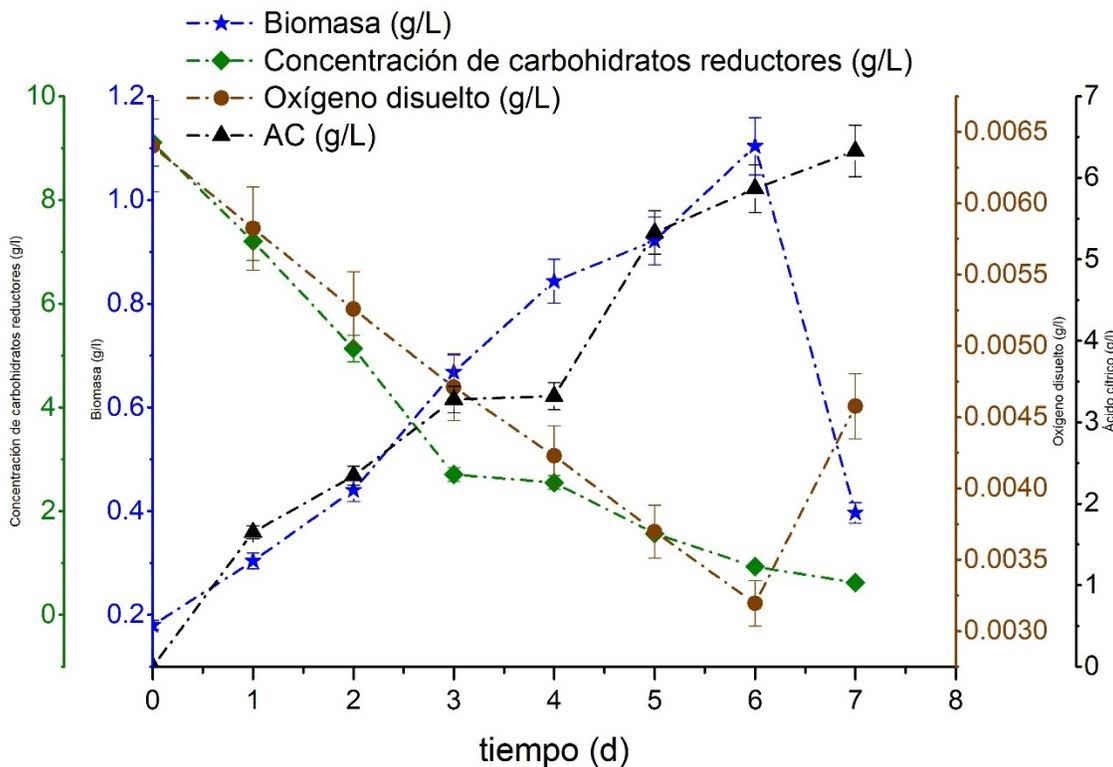


Figura 6.50. Variación de la biomasa, concentración de carbohidratos reductores, Oxígeno disuelto y ácido cítrico dentro de los biorreactores, promedios: E2-E10.

De la Tabla 6.18 se puede observar que el mayor coeficiente de rendimiento $Y_{p/s}$ se obtuvo para los experimentos E2 y E10, los cuales para fines prácticos denominaremos R1, de

igual forma esto ya se había concluido durante el análisis de las superficies de respuesta para la concentración de ácido cítrico, para la misma combinación de experimentos.

Tabla 6.18. Promedio de los coeficientes $Y_{x/s}$ y $Y_{p/s}$.

Clave	Experimentos	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)
R1	E2-E10	0.1089 ± 0.0055	0.7460 ± 0.0373
R2	E1-E9	0.0267 ± 0.0013	0.4381 ± 0.0219
R3	E3-E11	0.0323 ± 0.0016	0.4329 ± 0.0216
R4	E4-E12	0.0689 ± 0.0035	0.3071 ± 0.0154
R5	E5-E13	0.0730 ± 0.0037	0.2444 ± 0.0122
R6	E6-E14	0.2888 ± 0.0144	0.1970 ± 0.0099
R7	E7-E15	0.0624 ± 0.0031	0.0839 ± 0.0042
R8	E8-E16	0.1528 ± 0.0076	0.3278 ± 0.0164

Así también es importante señalar que los experimentos clave R2 (experimentos E1 y E9) y R3 (experimentos E3 y E11) tuvieron los $Y_{p/s}$ más altos después de los obtenidos en R1.

En relación con el coeficiente $Y_{x/s}$ se tiene que para los experimentos con clave R1 se tuvo el menor valor, seguido de R2 y R3, esto es importante, toda vez que la inhibición parcial del ciclo de los ácidos tricarbónicos es fundamental para la acumulación del ion citrato, de tal forma que la fuente de Carbono sea empleada principalmente para generar el producto de interés, y no así tener un incremento considerable en la biomasa dentro de los biorreactores [16, 46].

En la Figura 6.51 se presenta un gráfico de barras donde se muestran los promedios de los coeficientes $Y_{x/s}$ y $Y_{p/s}$, para todas las biorreacciones desarrolladas con *A. niger* para la obtención de ácido cítrico. El menor $Y_{x/s}$ y mayor $Y_{p/s}$ se obtuvieron en los experimentos con clave R1, seguidos de los experimentos con clave R2 y R3, de lo anterior se infiere que las condiciones en las que se desarrollaron los experimentos con clave R1 favorecen la formación de producto, además se logra un coeficiente bajo en el rendimiento asociado al aumento de biomasa (variables: pH 4, 20 g/L de celulosa y concentración de metales alta 70 ppb Cu, 75 ppb Zn, 56 ppb Mn).

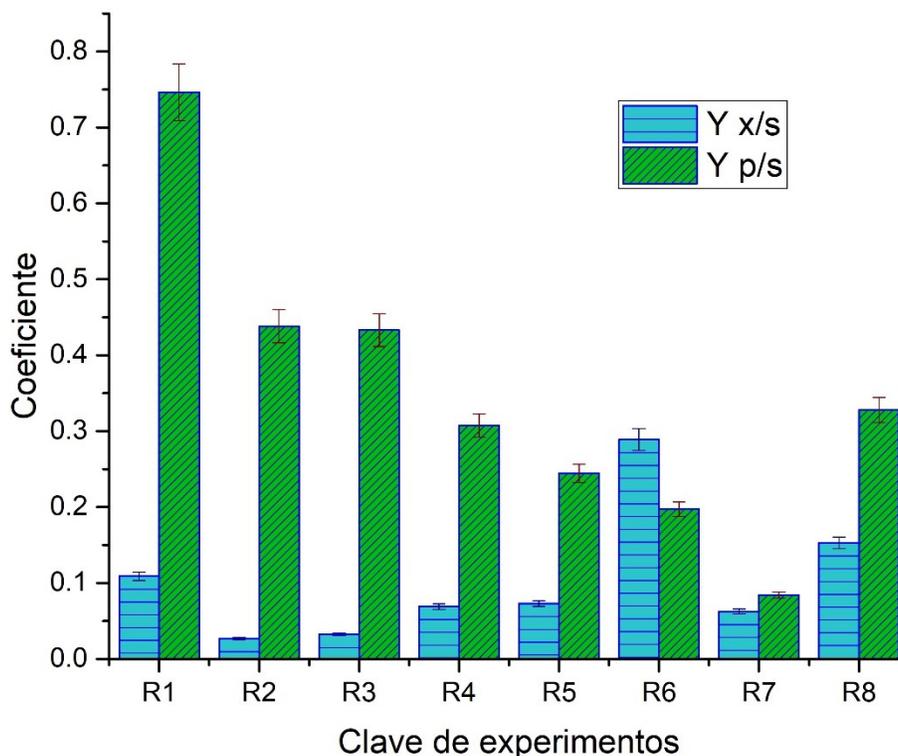


Figura 6.51. Promedio de los coeficientes $Y_{x/s}$ y $Y_{p/s}$

Como último tratamiento a los datos experimentales, se puede evaluar la diferencia entre los experimentos, así como su importancia, principalmente para determinar la influencia de las variables controlables y las no controlables durante la obtención de ácido cítrico con *A. niger*. Dichas comparaciones pueden realizarse mediante uno o más de los siguientes métodos: ANOVA unidireccional y bidireccional, método de rango múltiple de Duncan, método de la diferencia menos significativa de Fisher, método de Bonferroni o método de la diferencia significativa honesta de Tukey [33], por mencionar algunos. En la presente investigación se empleó el Método de rango múltiple de Duncan, el cual consiste en determinar la significancia del error experimental sobre el efecto de cada parámetro y sus interacciones, es decir, cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

Con apoyo del software Statgraphics Centurion XVII® se obtuvo la tabla ANOVA asociada a la comparación de varias muestras, que previamente en el diseño de experimentos se designó como la variable respuesta (concentraciones de ácido cítrico), para las ocho fermentaciones con su réplica que van de R1 a R8 (véase Tabla 6.19), con $\alpha = 0.05$.

Tabla 6.19. ANOVA para las ocho fermentaciones con su réplica.

Componente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	41.2479	7	5.89255	751.538	0.0000
Intra grupos	0.0627253	8	0.00784066		
Total (Corr.)	41.3106	15			

La Tabla 6.19 descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de grupos (intra grupos). La razón-F, que en este caso es igual a 751.538, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos ($5.89255/0.00784066$) y puesto que el valor-P es menor que 0.05, existe una

diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 8 variables respuesta con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se ejecutó el método de rango múltiple de Duncan (Tabla 6.20).

Tabla 6.20. Método de rango múltiple de Duncan para los experimentos con *A. niger*.

Contraste	Sig.	Diferencia	Contraste	Sig.	Diferencia
R1: E2-E10 – R2: E1-E9	*	0.97675	R3: E3-E11 – R5: E5-E13	*	0.7385
R1: E2-E10 – R3: E3-E11	*	2.55135	R3: E3-E11 – R6: E6-E14	*	1.98285
R1: E2-E10 – R4: E4-E12	*	3.41605	R3: E3-E11 – R7: E7-E15	*	2.6335
R1: E2-E10 – R5: E5-E13	*	3.28985	R3: E3-E11 – R8: E8-E16	*	0.63925
R1: E2-E10 – R6: E6-E14	*	4.5342	R4: E4-E12 – R5: E5-E13		-0.1262
R1: E2-E10 – R7: E7-E15	*	5.18485	R4: E4-E12 – R6: E6-E14	*	1.11815
R1: E2-E10 – R8: E8-E16	*	3.1906	R4: E4-E12 – R7: E7-E15	*	1.7688
R2: E1-E9 – R3: E3-E11	*	1.5746	R4: E4-E12 – R8: E8-E16	*	-0.22545
R2: E1-E9 – R4: E4-E12	*	2.4393	R5: E5-E13 – R6: E6-E14	*	1.24435
R2: E1-E9 – R5: E5-E13	*	2.3131	R5: E5-E13 – R7: E7-E15	*	1.895
R2: E1-E9 – R6: E6-E14	*	3.55745	R5: E5-E13 – R8: E8-E16		-0.09925
R2: E1-E9 – R7: E7-E15	*	4.2081	R6: E6-E14 – R7: E7-E15	*	0.65065
R2: E1-E9 – R8: E8-E16	*	2.21385	R6: E6-E14 – R8: E8-E16	*	-1.3436
R3: E3-E11 – R4: E4-E12	*	0.8647	R7: E7-E15 – R8: E8-E16	*	-1.99425

Sig. Significancia; * indica una diferencia significativa.

En la Tabla 6.20 se presentan las diferencias estimadas para cada par de medias, con el fin de conocer cuáles son significativamente diferentes de otras, el asterisco que se encuentra al lado de cada contraste indica que esos pares tienen diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza, por lo tanto esas medias son distintas, en el caso de los contrastes entre: R4-R5 y R5-R8, estos indican que las diferencias estimadas entre cada par de medias son significativamente iguales.

6.7.2.1 Caracterización del licor post-fermentativo

En relación con la caracterización del producto obtenido de las biorreacciones con el microorganismo *A. niger*, el procedimiento consistió en someter al licor post-fermentativo, en particular el licor de los experimentos con clave R1, al proceso cal-sulfúrico para recuperar el ácido cítrico, luego, se determinó el espectro IR de los cristales obtenidos, en la Figura 6.52 se muestra el espectro IR del ácido cítrico, en ésta, se aprecian las bandas características correspondientes a: vibraciones de estiramiento del grupo funcional hidróxilo (-OH) en el (ν) número de onda igual a 3299.52 cm^{-1} , con una intensidad fuerte y ancha; las vibraciones del enlace C=O (grupo carboxilo) en ν igual a 1717.92 cm^{-1} , con una intensidad fuerte, y vibraciones de flexión del enlace C-O en ν igual a 1206.08 cm^{-1} , con una intensidad media [43].

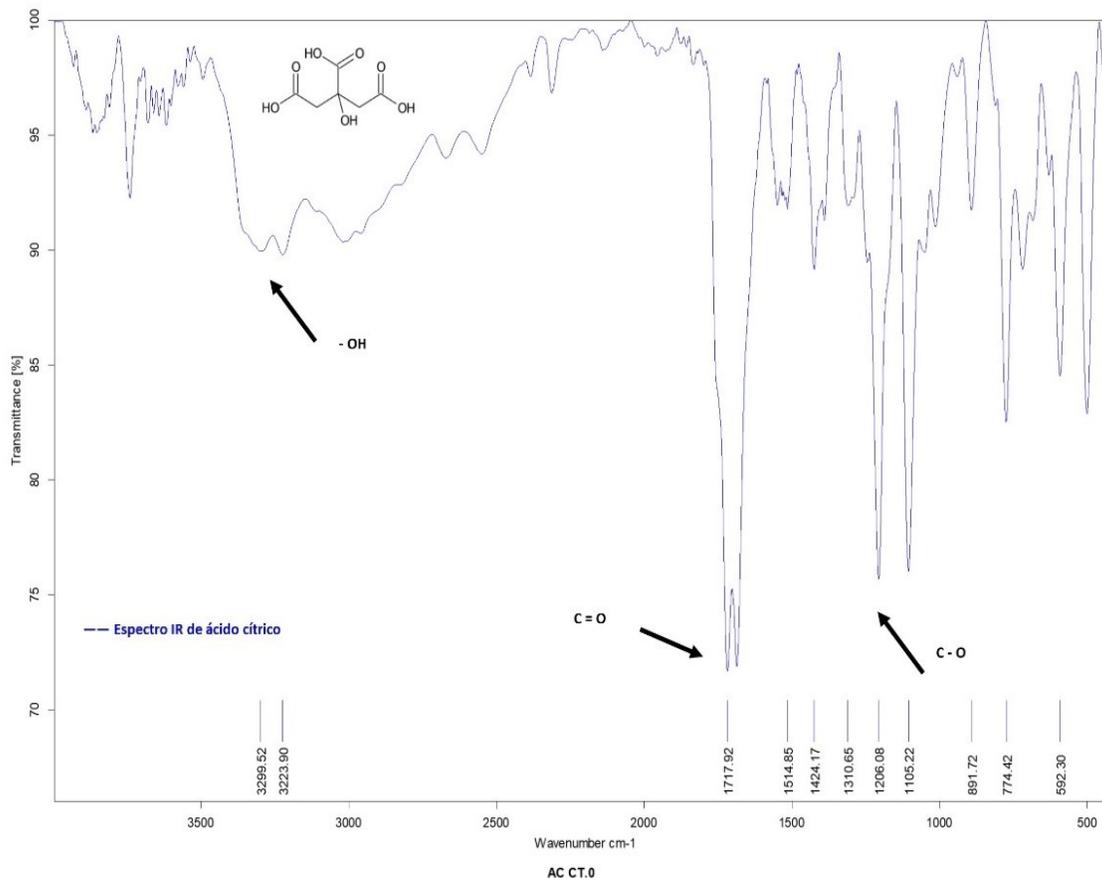


Figura 6.52. Espectro IR del producto obtenido de las biorreacciones clave R1.

6.7.3 Simulación de la cinética de formación de ácido cítrico con *Aspergillus niger*.

Como ya se discutió en las secciones anteriores el ácido cítrico es considerado un metabolito cuya producción aumenta bajo condiciones de desequilibrio metabólico [20]. Aunque las investigaciones bioquímicas con *A. niger* han sido extensas, la comprensión de los fenómenos que promueven la inhibición parcial del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, permitiendo la acumulación del ácido cítrico a nivel citoplasmático y mitocondrial [39], continúa en desarrollo.

En la presente investigación se utilizó el modelo cinético de la ecuación 8 (ecuación de Luedeking-Piret) que describe la formación de producto, dicha ecuación relaciona la concentración del producto con el crecimiento de la biomasa, $r_p = (\alpha \cdot r_x) + (\beta \cdot x)$, donde: r_p es la velocidad de formación de producto, r_x es la velocidad de formación de biomasa, x es la concentración de biomasa, α es el coeficiente de formación de producto asociado al crecimiento del hongo y β es el coeficiente de formación de producto no asociado al crecimiento del hongo [53].

Con apoyo del software Polymath Professional se determinaron las constantes: α , β , μ_m (velocidad específica máxima de crecimiento), ks (constante de saturación) y kd (constante de muerte celular), mediante un procedimiento de regresión no-lineal (64 iteraciones, método de Levenberg Marquardt). Se usaron los valores experimentales de las

fermentaciones R1, asociados al consumo de celulosa, formación de producto (ácido cítrico) y crecimiento de biomasa (*A. niger*), para estimar los valores que se muestran en la Tabla 6.21, en esta misma tabla se muestran los valores reportados en la literatura para estas mismas variables, para la producción de ácido cítrico con *A. niger*, es importante mencionar que, la clave asignada por el autor a las cepas de *A. niger* fueron: B60/B3 y B60/B5b [53].

Tabla 6.21. Valores calculados de las constantes asociadas a la formación de ácido cítrico.

Parámetro	<i>A. niger</i> B60/B3 [50]	<i>A. niger</i> B60/B5b [50]	Presente estudio
α	1.9	24	2.91 ± 0.1457
β	0.090	2.0	4.282 ± 0.1264
$\mu_m (d^{-1})$	nr*	nr	0.1362 ± 0.0067
$k_s (g\ sustrato/l)$	Nr	nr	0.603 ± 0.0010
kd	Nr	nr	0.0102 ± 0.0013

*nr: no reportado

En cuanto a la formación de producto, se presentan los resultados obtenidos con el modelo de Luedeking-Piret en la Figura 6.53, en esta misma figura se compara la predicción del modelo (R^2 de 0.9454) con el valor experimental de las fermentaciones clave R1.

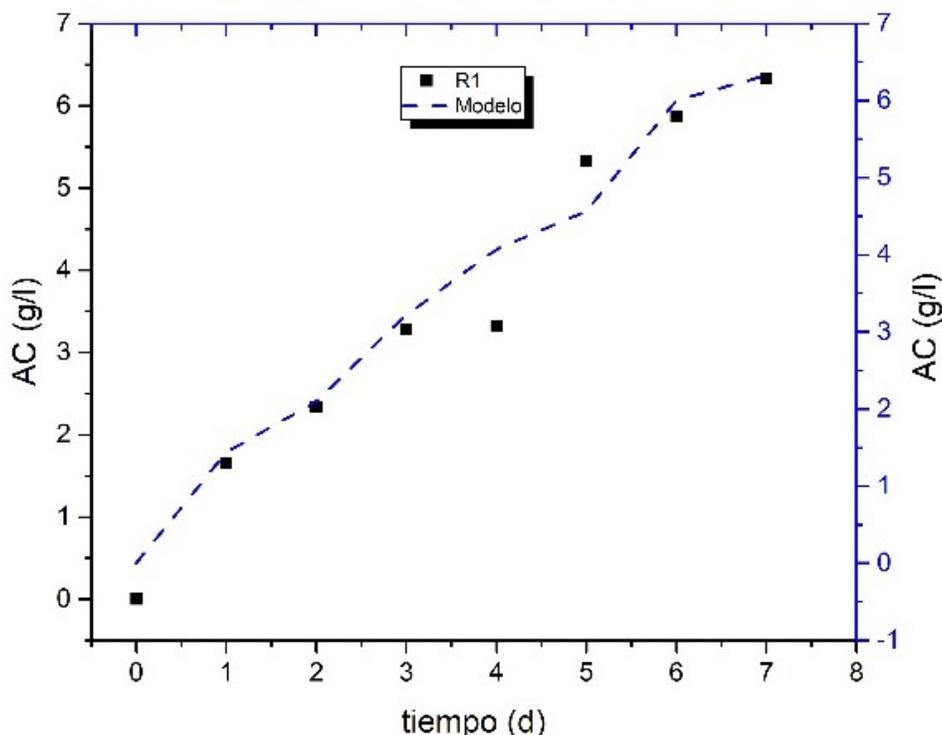


Figura 6.53. Comparación de la formación de producto (AC, ácido cítrico): ■ valores experimentales de las biorreacciones clave R1, --- predicción del modelo cinético.

6.7.3.1 Valores al séptimo día de las biorreacciones para obtener ácido cítrico

En la Tabla 6.22 se presentan los promedios de las concentraciones de biomasa, concentración de carbohidratos reductores (CR) y ácido cítrico para los experimentos clave R1 a R8; de igual forma se muestran las variables controladas durante las biorreacciones.

Como ya se discutió previamente, en los experimentos clave R1 (E2 y E10) se obtuvo la mayor concentración de ácido cítrico 6.2 ± 0.040 g/L, seguido de los experimentos con clave R2, las diferencias entre las condiciones de reacción entre R1 y R2 son la concentración inicial de celulosa y la concentración de metales traza. Esto indica que el control de estas variables favorece la acumulación del ácido cítrico, además de los fenómenos de transporte de masa en el micelio de *A. niger* [20, 46].

En relación con el pH y la temperatura, R1 y R2 operaron a un pH de 4 y a una temperatura de 30 grados Celsius, ambos parámetros cercanos a los óptimos reportados por Bansal [54] para las celulasas producidas por *A. niger*.

Tabla 6.22. Concentraciones promedio de biomasa, concentración de carbohidratos reductores totales y concentración de ácido cítrico, en cada experimento y su réplica.

	R1 (E2:E10) C _B , M _A , pH 4	R2 (E1:E9) C _A , M _B , pH 4	R3 (E3:E11) C _B , M _B , pH 2	R4 (E4:E12) C _A , M _A , pH 2	R5 (E5-E13) C _A , M _B , pH 2	R6 (E6-E14) C _B , M _A , pH 2	R7 (E7-E15) C _A , M _A , pH 4	R8 (E8-E16) C _B , M _B , pH 4
Biomasa (g/L)	0.40	0.53	0.35	0.76	0.78	0.84	0.85	0.80
Concentración de CR (g/L)	0.62	0.45	1.32	2.4	1.62	0.78	2.50	0.27
Ácido cítrico (g/L)	6.2 ± 0.040	5.23 ± 0.032	3.66 ± 0.010	2.80 ± 0.018	2.92 ± 0.007	1.68 ± 0.027	1.03 ± 0.008	3.02 ± 0.004

C_A: 30 g/L celulosa, C_B: 20 g/L celulosa; M_A: Concentración de metales (70 Cu, 75 Zn, 56 Mn) ppb, M_B: Concentración de metales (20 Cu, 50 Zn, 40 Mn) ppb, R1 a R2: 30 °C.

En la Tabla 6.23 se presenta la comparación de la concentración de ácido cítrico obtenida en este estudio. En ella se puede apreciar que se encuentra en un rango medio (31 g de ácido cítrico por cada 100 gramos de Celulosa de *O. f. indica*). Es claro que las condiciones de operación de los biorreactores, así como el tipo de sustrato son diferentes, no obstante, permiten una comparación en la obtención de ácido cítrico, el presente estudio representa una opción viable en la obtención de dicho ácido orgánico.

Tabla 6.23. Producción de ácido cítrico a partir de diferentes materias primas.

Cepa de <i>Aspergillus</i>	Condiciones de operación del biorreactor	Tiempo de biorreacción (días)	Concentración inicial de sustrato	Ácido cítrico obtenido	g ácido cítrico/100 g de sustrato	Referencia
<i>A. niger</i> ATCC 9142	T=30 °C, pH=2, BR Batch	6	Bagazo caña de azúcar 80 g/l	18.63 (g/L)	23.3	Amenaghawon [34]
<i>A. niger</i> NRRL 567	T=32 °C, pH= 4, BR Airlift	12	Turba 300 g/l	123.9 (g/kg)	41.3	Barrington [37]
<i>A. niger</i> ATCC 9124	T=25 °C, pH= 2, BR Batch	6	Almidón de maíz hidrolizado, 50 g/l	31.96 (g/L)	63.9	Amenaghawon [35]
<i>A. niger</i> ATCC 9142 (NRRL 599)	T=30 °C, pH=4, BR Batch	3.5	Cáscara de naranja, 1 Kg	193 g/kg	19.3	Torrado [55]
<i>A. niger</i> van. Tieghem MTCC	T=30 °C, pH= 5, BR Batch	5	Orojo de manzana 100 g/l	46 g/ kg	46	Kumar [56]
<i>A. niger</i> NRRL 567	T=30 °C, pH 3.5, BR Tambor rotativo	5	Orojo de manzana, 3 kg/l	294.19 (g/kg)	9.8	Gurpreet [36]
<i>Aspergillus niger</i> 10	T=30 °C, pH= 4, Heterogéneo, BR Batch	7	Celulosa de <i>O. f. indica</i> 20 g/l	6.2 (g/L)	31	Presente estudio

De lo anterior, es importante mencionar que, si se desea que un proyecto sea considerado viable técnica y comercialmente hablando, se requiere, deseablemente, plantear dicho análisis al inicio de la investigación, lo que permitirá abordar el resultado desde distintos aspectos. De esta forma durante el desarrollo tecnológico es posible generar un plan para

llevar el resultado a una escala de mercado. Dentro de los principales aspectos que es necesario considerar se encuentran los siguientes:

- 1.- estado de desarrollo del producto o proceso,
- 2.- financiamiento necesario para avanzar con el resultado de la investigación,
- 3.- aspectos regulatorios vinculados al resultado que podrían condicionar su salida al mercado,
- 4.- la propiedad intelectual vinculada al resultado, y por último,
- 5.- el análisis de mercado.

Lo antes señalado se aborda iterativamente en concordancia con la Transferencia tecnológica [57], en la presente investigación se realizó un desglose de costos por reactivo utilizado para llevar a cabo las biorreacciones en las condiciones de operación que generan la mayor concentración de deslignificación de espinas de *O. f. indica* y ácido cítrico (Tabla 6.24). No es óbice sugerir que, en futuras investigaciones se podrá desarrollar el Análisis de viabilidad técnico-comercial, así como lo relacionado a la Transferencia tecnológica.

Tabla 6.24. Costo por reactivo utilizado para obtención de ácido cítrico.

REACTIVO	Unid.	Presentación	Precio (\$MXN)	Cantidades utilizadas por biorreacción			Precio por reactivo utilizado (\$MXN)
				P. c.	A. n.	Total	
NaOH	g	500	1291.00	3.2	1.6	3.2	12.393600
CH ₃ COOH	L	2.5	3320.00	0.00384	0.00192	0.00384	7.649280
KH ₂ PO ₄	g	500	1681.00	4.94	2.47	4.94	24.912420
NH ₄ NO ₃	g	1000	2522.00	13.2	6.6	13.2	49.935600
MgSO ₄ •7H ₂ O	g	500	926.00	0.76	0.38	0.76	2.111280
NaCl	g	500	858.00	0.64	0.32	0.64	1.647360
FeSO ₄	g	500	1446.00	0.1	0.05	0.1	0.433800
CaCl ₂	g	1000	2571.00	0.96	0.48	0.96	3.702240
ZnSO ₄ •7H ₂ O	g	500	689.00	0.001	0.0005	0.001	0.002067
H ₃ BO ₃	g	500	647.00	4.9508	2.4754	4.9508	9.609503
MnCl ₂ •4H ₂ O	g	1000	3113.00	0.00032	0.00016	0.00032	0.001494
CoCl ₂ •6H ₂ O	g	1000	4677.00	0.00032	0.00016	0.00032	0.002245
CuSO ₄ •5H ₂ O	g	1000	1679.00	0.0044	0.0022	0.0044	0.011081
Estándar Titrisol:							
Cu, ampolleta	L	1	537.00	-	0.001	0.001	0.537
Zn, ampolleta	L	1	443.00	-	0.001	0.001	0.443
Mn, ampolleta	L	1	618.00	-	0.001	0.001	0.618
Precio total por reactivos utilizados (\$MXN):							114.01

Unid.: Unidades, P. c.: *Pycnoporus cinnabarinus*, A. n.: *Aspergillus niger*. Precios obtenidos de la página electrónica de Merck México (25/06/2020).

El precio total por reactivos utilizados para desarrollar ambas biorreacciones con *P. cinnabarinus* y *A. niger* para obtener ácido cítrico fue de 114 pesos mexicanos. Para el cálculo se consideró la biorreacción con *P. cinnabarinus* para producir alrededor de 20 g de celulosa, la cual es la cantidad utilizada para llevar a cabo la mejor biorreacción con *A. niger*

(experimentos clave R1), obteniendo un producto con valor agregado. Es decir, por cada kilogramo de residuos de *O. ficus indica* se obtienen 150 g de ácido cítrico, es importante resaltar que el residuo de *O. ficus indica* se obtiene sin costo.

7. Conclusiones

Se acondiciono al microorganismo *P. cinnabarinus* a producir enzimas lignocelulolíticas, esto se apreció en el incremento en la concentración de glucosa en el medio de cultivo, además mediante el análisis de espectroscopía IR se observó la disminución en la intensidad de una de las bandas características del anillo aromático presente en el alcohol sinapílico y el alcohol coniferílico que conforman a la lignina, por lo que *P. cinnabarinus* liberó enzimas extracelulares (pectinolíticas, lignolíticas y hemicelulolíticas), demostrando así su capacidad para deslignificar los residuos de *O. ficus indica* (espinas).

La biorreacción para obtener celulosa está influenciada principalmente por los efectos provocados por la temperatura y el tamaño de partícula, seguido del pH, además de que la interacción del pH con el tamaño de partícula y la temperatura tienen un efecto significativo durante la deslignificación de la lignocelulosa de *Opuntia ficus indica*.

La metodología de superficie de respuesta demostró las condiciones óptimas para obtener celulosa a partir de desechos de *O. ficus indica*: temperatura de 50 °C, pH de 4 y tamaño de partícula de 0.25 mm. En esas condiciones, se logró un 65.9 % de deslignificación.

El análisis de regresión lineal múltiple sobre los datos estadísticos de las biorreacciones con *P. cinnabarinus* representó con un 99.7674 % de confianza la relación entre el porcentaje de deslignificación y las variables independientes (temperatura, pH y tamaño de partícula).

La mayor concentración de ácido cítrico se obtuvo para la combinación de los niveles pH 4, 20 g/L celulosa y concentración de metales (70 Cu, 75 Zn, 56 Mn) ppb, por lo que *A. niger* sacrificó la fuente de Carbono (celulosa) para posteriormente ser metabolizada y excretar el ion citrato al medio de cultivo.

La metodología de superficie de respuesta demostró las condiciones óptimas para obtener ácido cítrico a partir de celulosa de *Opuntia ficus indica*.

El análisis de regresión lineal múltiple sobre los datos estadísticos de las biorreacciones con *A. niger* representó con un 99.85 % de confianza la relación entre la concentración de ácido cítrico y las variables independientes (pH, celulosa y concentración de metales).

El modelo cinético de formación de producto se ajustó a los datos observados y estimó la concentración de ácido cítrico con un 94.54 % de confianza.

El ácido cítrico es uno de los ácidos orgánicos más utilizados en muchas industrias, por lo que al obtenerlo a partir de desechos biodegradables como las espinas de nopal (presente estudio), cáscara de mango, cáscara de naranja, cascará de coco, cáscara de plátano, etc., convierte a dichos desechos en potenciales sustratos para la producción de ácido cítrico, en consecuencia, se minimizan los problemas de manejo y gestión. Por otro lado, la biomasa generada durante la biorreacción para obtener el ácido cítrico se puede utilizar para la producción de biogás y también en la preparación de fertilizantes, generando beneficios económicos y ambientales. Por lo tanto, el diseño de biorreactores apropiados con un control preciso de los parámetros del proceso es de gran importancia.

8. Referencias

- [1]. Bu'Lock, J.D., B. Kristiansen, and P.L. Padín, *Biotecnología básica*. 2° ed. 1991: Acribia, Editorial, S.A.
- [2]. Willey, J., Sherwood, L., y Woolverton, C., *Microbiology*. 7° ed. 2008. 636, 152-158, 546-571.
- [3]. Tuor, U., K. Winterhalter, and A. Fiechter, Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *Journal of Biotechnology*, 1995. 41(1): p. 1-17.
- [4]. Mester, T. and M. Tien, Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *International biodeterioration & biodegradation*, 2000. 46(1): p. 51-59.
- [5]. Asiegbu, F., A. Paterson, and J. Smith, The effects of co-fungal cultures and supplementation with carbohydrate adjuncts on lignin biodegradation and substrate digestibility. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1996. 12(3): p. 273-279.
- [6]. Baldrian, P., Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial technology*, 2003. 32(1): p. 78-91.
- [7]. Van Dyk, J. and B. Pletschke, A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology advances*, 2012. 30(6): p. 1458-1480.
- [8]. Herpoël, I., et al., Selection of *Pycnoporus cinnabarinus* strains for laccase production. *FEMS Microbiology Letters*, 2000. 183(2): p. 301-306.
- [9]. Eggert, C., et al., A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *Febs Letters*, 1996. 391(1-2): p. 144-148.
- [10]. Sigoillot, C., et al., Lignocellulolytic and hemicellulolytic system of *Pycnoporus cinnabarinus*: isolation and characterization of a cellobiose dehydrogenase and a new xylanase. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002. 31(6): p. 876-883.
- [11]. Polak, J. and A. Jarosz-Wilkolazka, Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis. *Process Biochemistry*, 2012. 47(9): p. 1295-1307.
- [12]. Eggert, C., U. Temp, and K.-E.L. Eriksson, Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Febs Letters*, 1997. 407(1): p. 89-92.
- [13]. Soccol, C., Luciana, P., Rodrigues, C. y Pandey, A., New perspectives for citric acid production and application. *Food Technology Biotechnology*, 2006. 44(1330-9862): p. 141-149.
- [14]. Mostafa, Y.y.A., S., Optimization of date syrup for enhancement of the production of citric acid using immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2012. 19: p. 241-246.
- [15]. Adeoye, A., A. Lateef, and E. Gueguim-Kana, Optimization of citric acid production using a mutant strain of *Aspergillus niger* on cassava peel substrate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2015. 4(4): p. 568-574.
- [16]. Agrawal, P., Bhatt, C. y Viswanathan, L., Studies on some enzymes relevant to citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, 1983. 5: p. 369-372.
- [17]. Roukas, T. and P. Kotzekidou, Influence of some trace metals and stimulants on citric acid production from brewery wastes by *Aspergillus niger*. *Enzyme and microbial technology*, 1987. 9(5): p. 291-294.
- [18]. Melzer, G., et al., Metabolic flux analysis using stoichiometric models for *Aspergillus niger*: comparison under glucoamylase-producing and non-producing conditions. *Journal of biotechnology*, 2007. 132(4): p. 405-417.
- [19]. Campbell, M.y.F., S., *Bioquímica*. 6° ed. 2009: Cengage Learning.

- [20]. Papagianni, M., Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology advances*, 2007. 25(3): p. 244-263.
- [21]. INEGI, Censo Agropecuario: Características principales del cultivo de nopal en el Distrito Federal, México, caso Milpa Alta. 2007.
- [22]. Agustín, A.y.A., Inifap, Z., El cultivo del nopal verdura en Milpa Alta, D.F., México. 2000.
- [23]. SEMARNAT, Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos. Diario Oficial de la Federación., 2018: p. 1-53.
- [24]. Yang, L., et al., Biomass characterization of Agave and Opuntia as potential biofuel feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, 2015. 76: p. 43-53.
- [25]. Malainine, M.E., et al., Structure and morphology of cladodes and spines of *Opuntia ficus-indica*. Cellulose extraction and characterisation. *Carbohydrate Polymers*, 2003. 51(1): p. 77-83.
- [26]. Mayer, J.A. and J.C. Cushman, Nutritional and mineral content of prickly pear cactus: A highly water-use efficient forage, fodder and food species. *Journal of Agronomy and Crop science*, 2019. 205(6): p. 625-634.
- [27]. Lefsih, K., et al., Extraction, characterization and gelling behavior enhancement of pectins from the cladodes of *Opuntia ficus indica*. *International journal of biological macromolecules*, 2016. 82: p. 645-652.
- [28]. Vignon, M., et al., Arabinan–cellulose composite in *Opuntia ficus-indica* prickly pear spines. *Carbohydrate Research*, 2004. 339(1): p. 123-131.
- [29]. Reese, E.T., Siu, R. G. H. y Levinson, H. S. , The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *Journal of Bacteriology*, 1950. 59: p. 485-497.
- [30]. Montencourt, B.S.y.E., D. E., Production and characterization of high yielding cellulase of *Trichoderma reesei*. TAPPI Annu Meet Proc, 1979: p. 101-108.
- [31]. Lucas, L., Robles, G., Gálvez, A., García, T., Pérez, R. y Álvarez, G., Biodegradación de la celulosa y de la lignina. 2001: 1°.
- [32]. Liu, Y.-K., et al., Producing bioethanol from cellulosic hydrolyzate via co-immobilized cultivation strategy. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2012. 114(2): p. 198-203.
- [33]. Montgomery, D.y.R., G., Probabilidad y estadística aplicada a la ingeniería. 2011: 2°.
- [34]. Amenaghawon, N., et al., Application of Box-Behnken design for the optimization of citric acid production from corn starch using *Aspergillus niger*. *Biotechnology Journal International*, 2013: p. 236-245.
- [35]. Amenaghawon, N., et al., Modelling and statistical optimisation of citric acid production from solid state fermentation of sugar cane bagasse using *Aspergillus niger*. *International Journal of Sciences*, 2013.
- [36]. Dhillon, G.S., et al., Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor. *Industrial Crops and Products*, 2013. 41: p. 78-84.
- [37]. Barrington, S., et al., Optimization of citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown in a column bioreactor. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2009. 26(2): p. 422-427.
- [38]. Bizukojc, M. and S. Ledakowicz, A kinetic model to predict biomass content for *Aspergillus niger* germinating spores in the submerged culture. *Process Biochemistry*, 2006. 41(5): p. 1063-1071.
- [39]. Andersen, M.R., M.L. Nielsen, and J. Nielsen, Metabolic model integration of the bibliome, genome, metabolome and reactome of *Aspergillus niger*. *Molecular Systems Biology*, 2008. 4(1): p. 178.

- [40]. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 1976. 72(1-2): p. 248-254.
- [41]. Marrier, J. and M. Boulet, Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine-acetic anhydride method. *Journal of Dairy Science*, 1958. 41(12): p. 1683-1692.
- [42]. Dean, J.A., *Lange's handbook of chemistry*. Vol. 15. 1992: McGraw-Hill New York.
- [43]. Skoog, D.A., F.J. Holler, and T.A. Nieman, *Principios de análisis instrumental*. 2008.
- [44]. Wingrove, A.y.C., R., *Química orgánica*. 2000: 1°.
- [45]. Zhao, J., et al., Thermal degradation of softwood lignin and hardwood lignin by TG-FTIR and Py-GC/MS. *Polymer degradation and stability*, 2014. 108: p. 133-138.
- [46]. Bizukojc, M. and S. Ledakowicz, Morphologically structured model for growth and citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. *Enzyme and microbial technology*, 2003. 32(2): p. 268-281.
- [47]. López, L.N., A.A. Cárdenas, and R.G. Zambrano, Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Revista facultad de ingeniería universidad de Antioquia*, 2013(69): p. 317-326.
- [48]. Teschke, K., et al., INDUSTRIA DEL PAPEL Y DE LA PASTA DE PAPEL SECTORES BASADOS EN RECURSOS BIOLÓGICOS. Teschke K, Astrakianakis G, Anderson J, Keefe A, Heederik D. Guía de RIESGOS PROFESIONALES Y CONTROLES de la ENCICLOPEDIA DE SALUD Y SEGURIDAD EN EL TRABAJO, 2008.
- [49]. Suhara, H., et al., Screening of selective lignin-degrading basidiomycetes and biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of bamboo culms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2012. 75: p. 176-180.
- [50]. Song, L., et al., Biological pretreatment under non-sterile conditions for enzymatic hydrolysis of corn stover. *BioResources*, 2013. 8(3): p. 3802-3816.
- [51]. Yu, J., et al., Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. *Bioresource technology*, 2009. 100(2): p. 903-908.
- [52]. Kadimaliev, D., et al., Effect of wood modification on lignin consumption and synthesis of lignolytic enzymes by the fungus *Panus (Lentinus) tigrinus*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2003. 39(5): p. 488-492.
- [53]. Roehr, M., O. Zehentgruber, and C.P. Kubicek, Kinetics of biomass formation and citric acid production by *Aspergillus niger* on pilot plant scale. *Biotechnology and Bioengineering*, 1981. 23(11): p. 2433-2445.
- [54]. Bansal, N., et al., Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste management*, 2012. 32(7): p. 1341-1346.
- [55]. Torrado, A.M., et al., Citric acid production from orange peel wastes by solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2011. 42(1): p. 394-409.
- [56]. Kumar, D., R. Verma, and T. Bhalla, Citric acid production by *Aspergillus niger* van. Tieghem MTCC 281 using waste apple pomace as a substrate. *Journal of food science and technology*, 2010. 47(4): p. 458-460.
- [57]. Nielsen, L., Evaluating Inventions from Research Institutions. In *Intellectual Property Management in Health and Agricultural Innovation*. 2007.

9. Anexos

9.1 MSR deslignificación de *O. ficus-indica* usando el hongo *P. cinnabarinus*.

En la Figura 9.54 se presentan las superficies y contornos del porcentaje de deslignificación en función del tamaño de partícula, el pH y la temperatura; en este caso la temperatura se utilizó como pivote para generar los gráficos.

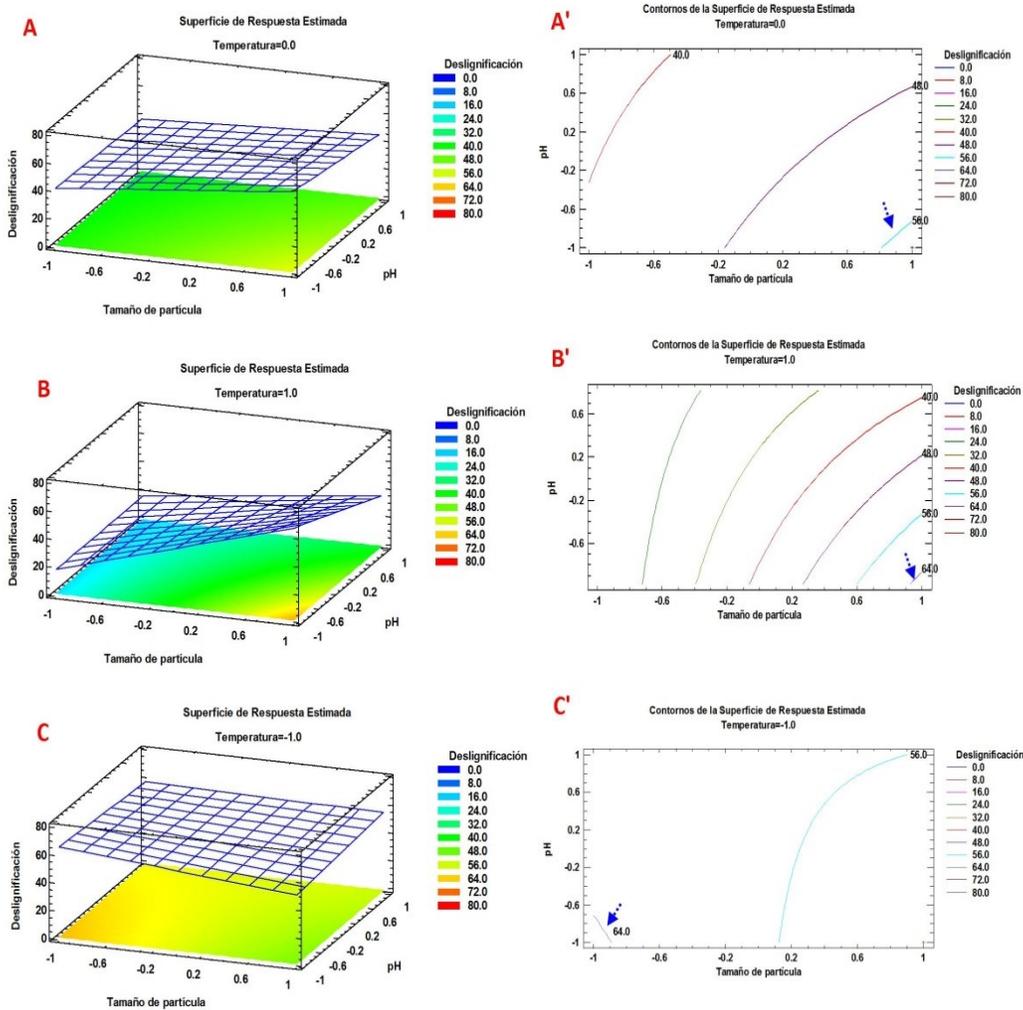


Figura 9.54. Superficies y contornos para el porciento de deslignificación en función de las variables independientes (tamaño de partícula, pH y temperatura [pivote]).

En la Figura 9.54 los niveles A, B y C están relacionados con las superficies, y los niveles A', B' y C' con los contornos, todos asociados al porcentaje de deslignificación. Las superficies representadas como una malla, y los contornos de las superficies, están en función del tamaño de partícula y el pH; en el intervalo de -1 a +1 (niveles codificados), para este caso el tamaño de partícula va de 0.074 a 0.25 mm, y el pH de 4 a 6, se pivoteó la temperatura de 30 a 50 °C.

En el nivel "A" el efecto de la temperatura no se contempló para generar la malla que describe el porcentaje de deslignificación, solo está en función del pH y el tamaño de partícula. En el nivel "B" el efecto de la temperatura se mantuvo en su nivel alto (50 °C), y en el nivel "C" el efecto de la temperatura se conservó en su nivel bajo (30 °C).

En relación con los tres niveles representados como: A', B' y C', los contornos de las superficies relacionadas con el porcentaje de deslignificación describen un modelo de primer orden, al menos para el contorno que indicó una combinación de variables en donde se alcanzó un mayor porcentaje de deslignificación, señalado con la flecha azul.

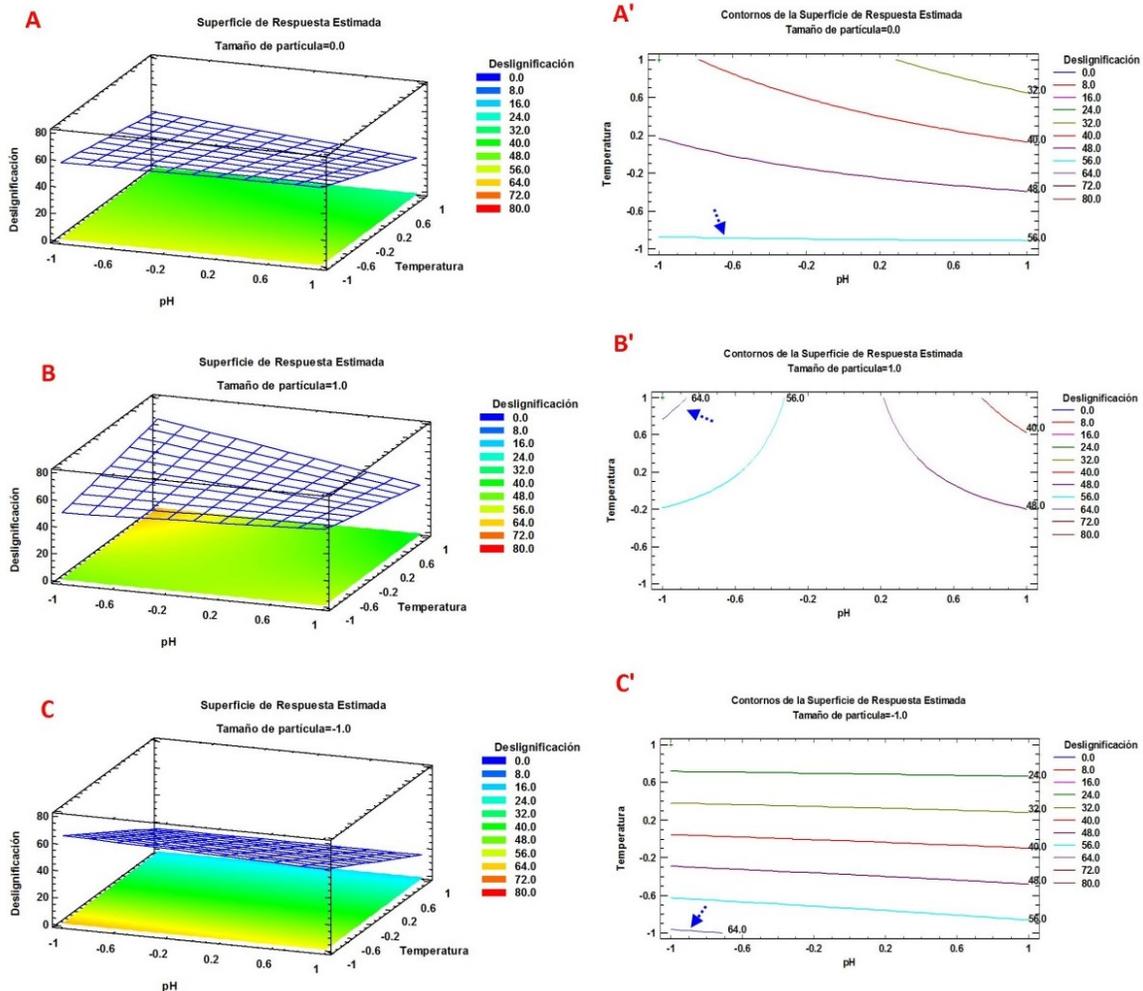


Figura 9.55. Superficies y contornos para el porciento de deslignificación en función de las variables independientes (pH, temperatura y tamaño de partícula [pivote]).

Como se describió líneas antes, en la Figura 9.55 se muestran las superficies y contornos del porcentaje de deslignificación, para este caso la variable respuesta está en función del pH de 4 a 6, y temperatura de 30 a 50 °C, se pivoteó el tamaño de partícula de 0.074 a 0.25 mm. Nuevamente los contornos de las superficies señalados con la flecha azul son de primero orden, lo mismo se puede deducir de la Figura 9.56, donde los gráficos del porcentaje de deslignificación están en función del tamaño de partícula de 0.074 a 0.25 mm, y la temperatura de 30 a 50 °C, se pivoteó el pH de 4 a 6.

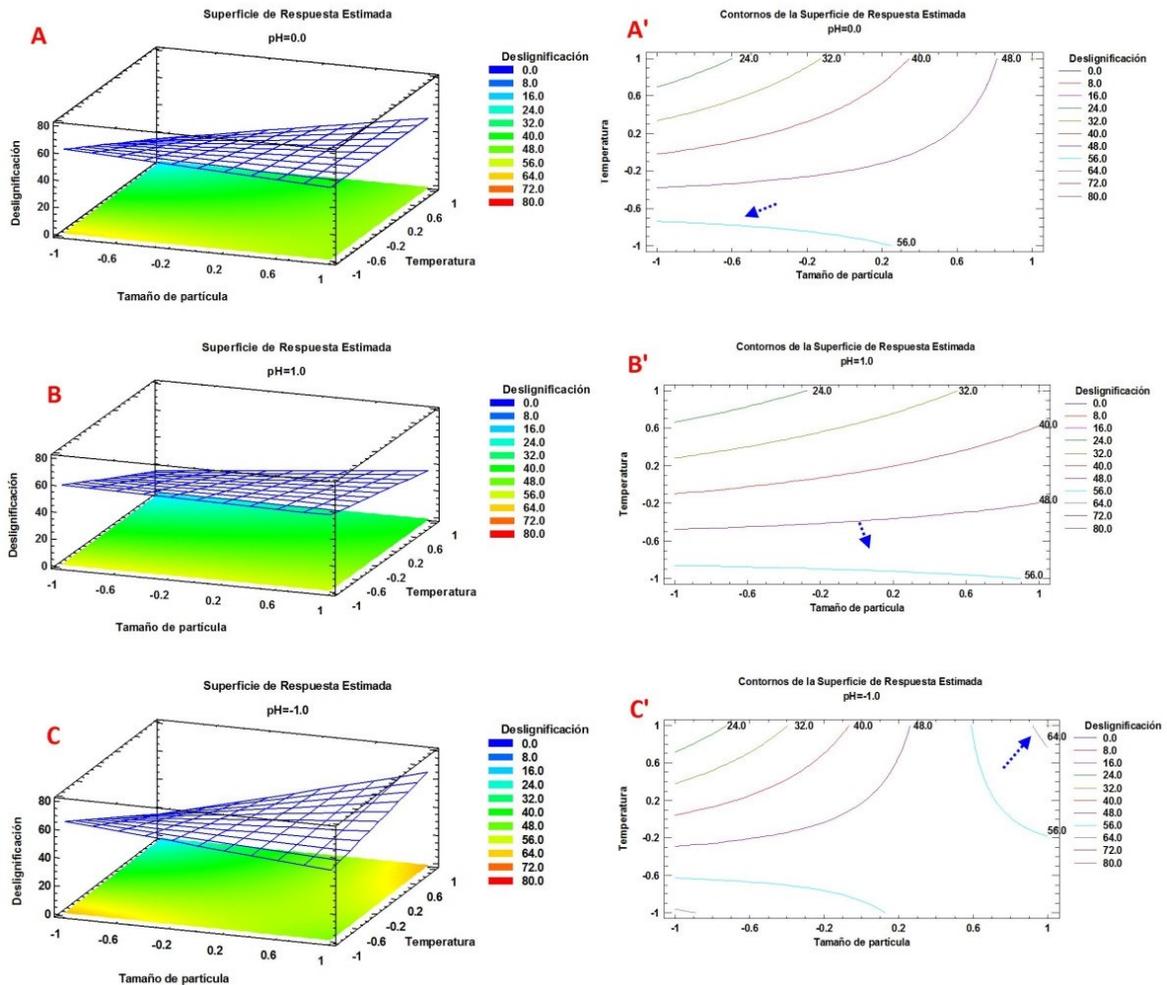


Figura 9.56. Superficies y contornos para el porciento de deslignificación en función de las variables independientes (tamaño de partícula, temperatura y pH [pivote]).

9.2 MSR obtención de ácido cítrico usando el hongo *A. niger*.

En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Figura 9.57 se presentan las superficies de respuesta estimada para la concentración de ácido cítrico en función de los gramos de celulosa, el pH y el medio de cultivo; la variable medio de cultivo es utilizada como pivote, de igual manera se muestra el contorno de la superficie de respuesta, en el cual se indica la máxima concentración de ácido cítrico con la flecha azul.

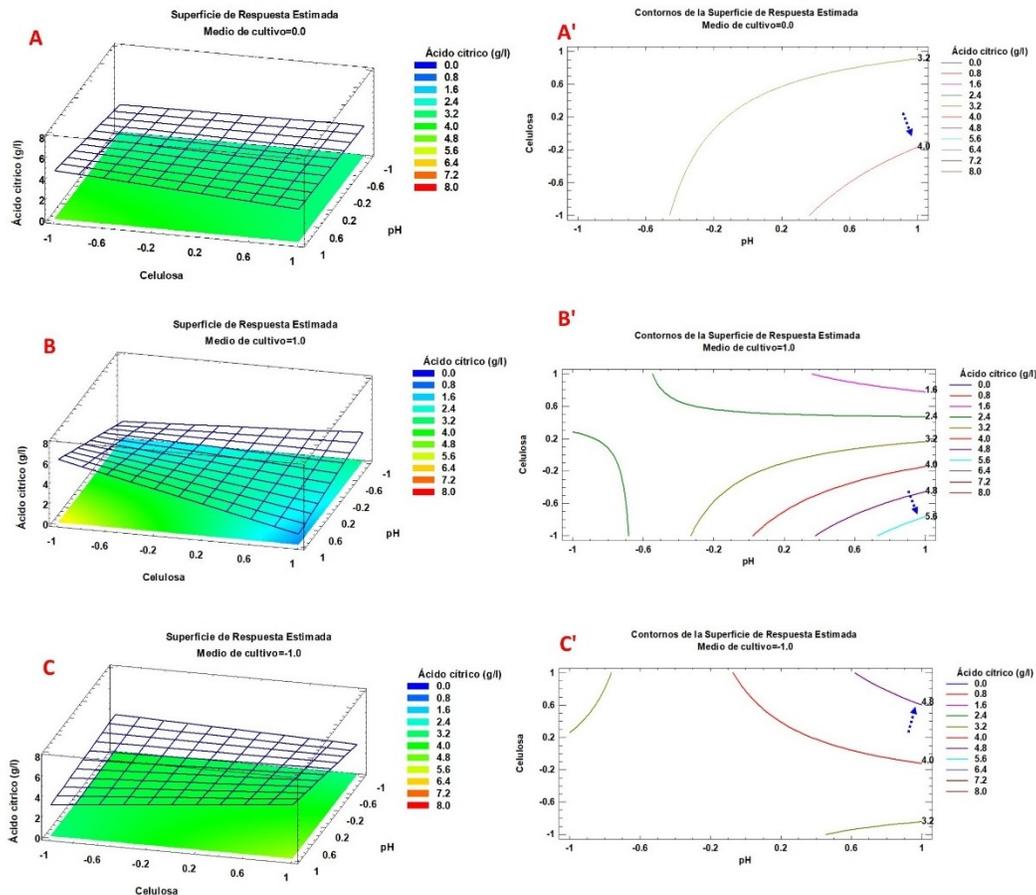


Figura 9.57. Superficie respuesta para la concentración de ácido cítrico en función de las variables independientes (celulosa, pH y medio de cultivo [pivote]).

Lo que se representa en la Figura 9.57 son superficies de respuesta para la obtención de ácido cítrico en tres niveles (A, B y C), es decir, el gráfico de la concentración de ácido cítrico se representa como una malla en función de los gramos de celulosa y el pH, en el intervalo de -1 a +1 (niveles codificados), para este caso el pH va de 2 a 4, la celulosa de 20 a 30 g/L, se pivotó la variable medio de cultivo de **A**: concentración de metales 70 ppb Cu, 75 ppb Zn y 56 ppb Mn, a **B**: concentración de metales 20 ppb Cu, 50 ppb Zn y 40 ppb Mn.

En el nivel "A" el efecto del medio de cultivo no es contemplado para generar la malla que describe la concentración del ácido cítrico, solo está en función de los gramos de celulosa y el pH. En el nivel "B" se dejó fijo el efecto del medio de cultivo en su nivel alto para construir dicha malla (+1, concentración de metales 70 ppb Cu, 75 ppb Zn y 56 ppb Mn); y en el nivel "C" el efecto del medio de cultivo se encuentra en su nivel bajo (-1, concentración de metales 20 ppb Cu, 50 ppb Zn y 40 ppb Mn). De los tres niveles (representado como A', B' y C') los contornos de las superficies de respuesta describen un modelo de primer orden, en particular para el contorno que indica una combinación de variables en donde se alcanza una mayor concentración de ácido cítrico 5.6 g/L (B').

En el Figura 9.58 se representa la concentración de ácido cítrico como una malla en función de los gramos de celulosa y los metales traza en el medio de cultivo; en el intervalo de -1 a +1 (niveles codificados), para este caso se pivotea el pH.

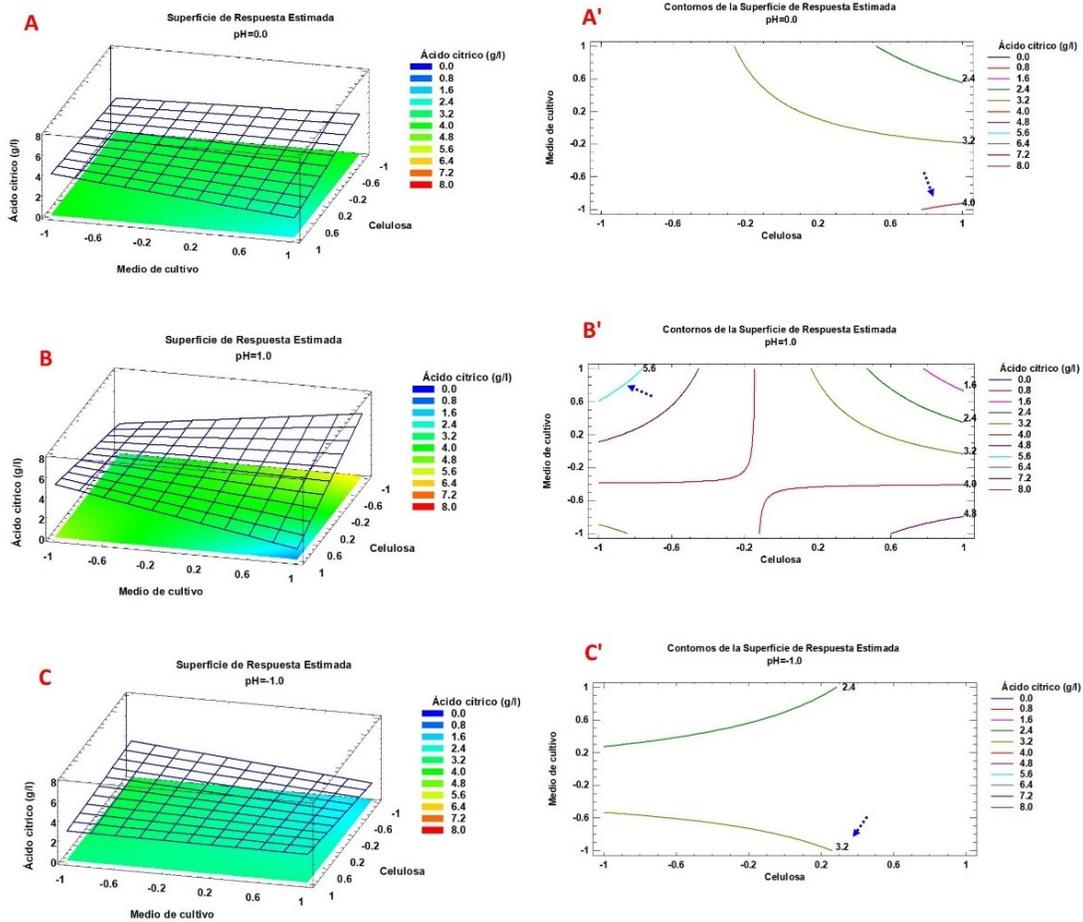


Figura 9.58. Superficie respuesta para la concentración de ácido cítrico en función de las variables independientes (celulosa, medio de cultivo y pH [pivote]).

De la Figura 9.58 se tiene que en el nivel “A” el efecto del pH no es contemplado para generar la malla que describe la concentración del ácido cítrico en función de los gramos de celulosa y los metales traza en el medio de cultivo. En el nivel “B” se contempla el efecto del pH en su nivel alto (+1, pH de 4) para construir dicha malla; y en el nivel “C” el efecto del pH se encuentra en su nivel bajo (-1, pH de 2). Los niveles representados como: A’, B’ y C’ son los contornos de las superficies de respuesta los cuales describen un modelo de primer orden, en particular para el contorno que indica una combinación de variables en donde se alcanza una mayor concentración de ácido cítrico 5.6 g/L (B’).

Por último, la Figura 9.59 muestra la concentración de ácido cítrico como una malla en función del pH y los metales traza en el medio de cultivo; en el intervalo de -1 a +1 (niveles codificados), para este caso se pivotea la variable celulosa de 20 a 30 g/L. Además, se tiene que, en el nivel “A” el efecto de la celulosa no es contemplado para generar la malla que describe la concentración del ácido cítrico. En el nivel “B” se contempla el efecto de la celulosa en su nivel alto (+1, 30 g/L) para construir dicha malla; y en el nivel “C” el efecto de la celulosa se encuentra en su nivel bajo (-1, 20 g/L). En cuanto a los niveles representados como: A’, B’ y C’ se tiene que las superficies de respuesta describen un modelo de primer orden, en particular para el contorno que indica una combinación de variables en donde se alcanza una mayor concentración de ácido cítrico 5.6 g/L (C’).

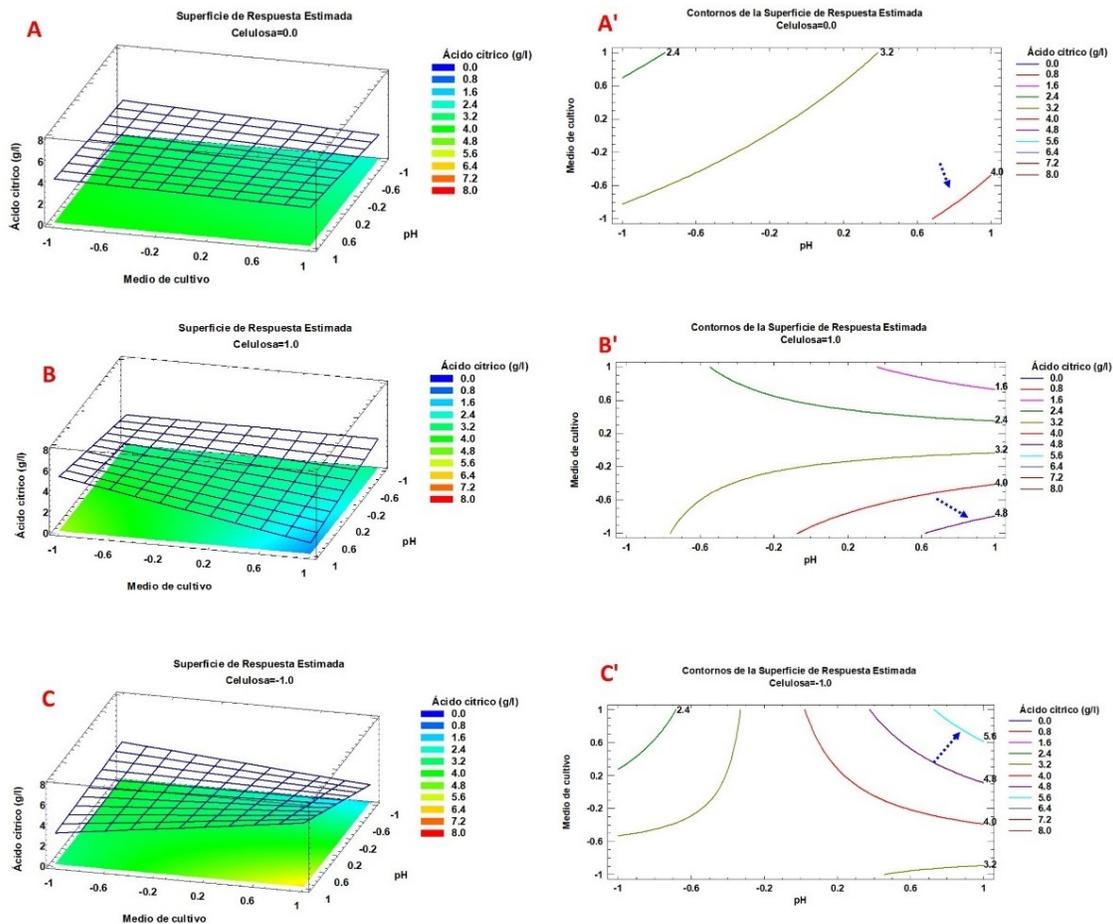


Figura 9.59. Superficie respuesta para la concentración de ácido cítrico en función de las variables independientes (pH, medio de cultivo y celulosa [pivote]).

Del análisis de las superficies de respuesta estimada para la concentración del ácido cítrico se tiene que la siguiente combinación de variables alcanza la mayor concentración de dicho ácido orgánico 5.6 g/L: pH 4, celulosa 20 g y concentración de metales (70 ppb Cu, 75 ppb Zn y 56 ppb Mn).

9.3 Validación de normalidad, varianza constante e independendia.

A continuación, se muestra la validación gráfica de los supuestos de normalidad, varianza constante e independendia para el porcentaje de deslignificación y la concentración de ácido cítrico, obtenidos usando los hongos *P. cinnabarinus* y *A. niger*, respectivamente (véase Apéndice A, sección 10.1, donde se explica brevemente sobre dicha validación gráfica).

9.3.1 Porcentaje de deslignificación de *O. ficus-indica*.

En la Figura 9.60 se muestra el gráfico de probabilidad normal para los residuos del porcentaje de deslignificación, dichos datos tienen una distribución normal ya que se encuentran alineados con la línea recta.

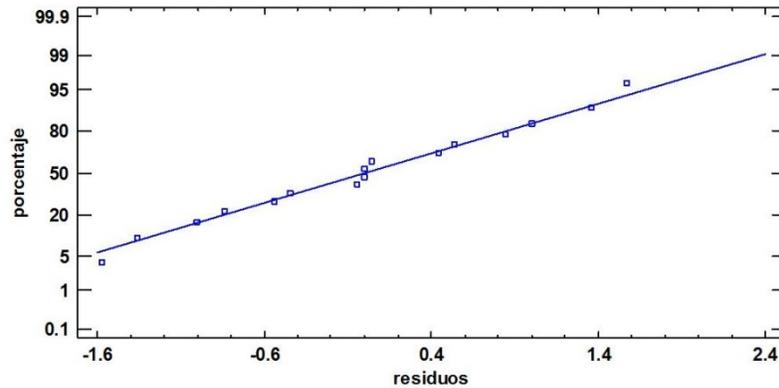


Figura 9.60. Gráfica de probabilidad Normal para los residuos del porcentaje de designificación.

En la Figura 9.61 se demuestra que se cumple con el supuesto de la varianza constante para el porcentaje de designificación, ya que los datos no muestran un patrón claro y contundente.

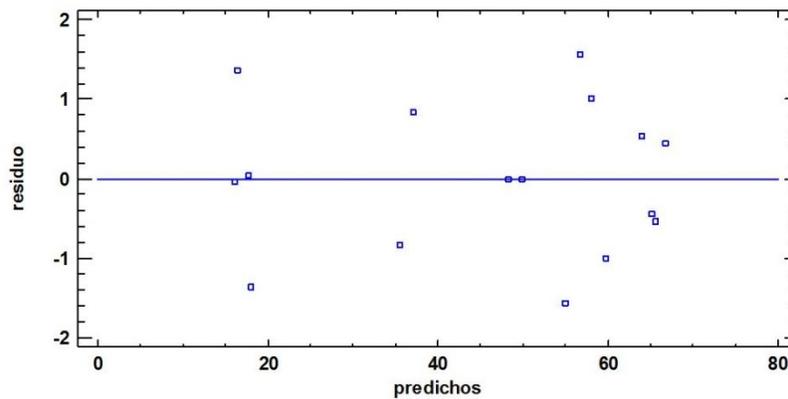


Figura 9.61. Gráfico de predicho contra residuos para el porcentaje de designificación.

En la Figura 9.62 se demuestra que se cumple con el supuesto de independencia para el porcentaje de designificación, ya que la tendencia de los datos es aleatoria.

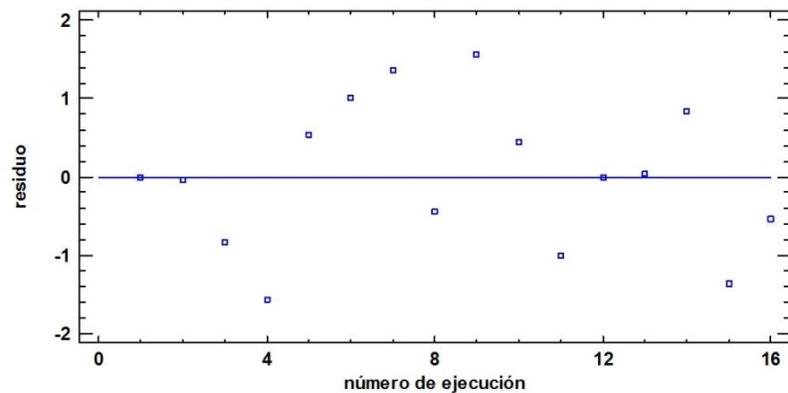


Figura 9.62. Gráfico de número de ejecución contra residuos para el porcentaje de designificación.

9.3.2 Concentración de ácido cítrico, g/L.

En la Figura 9.63 se muestra el gráfico de probabilidad normal para los residuos de la concentración de ácido cítrico, dichos datos tienen una distribución normal ya que se encuentran alineados con la línea recta.

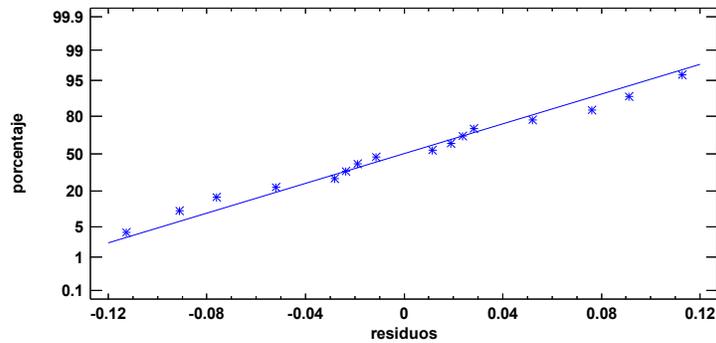


Figura 9.63. Gráfica de probabilidad Normal para los residuos de la concentración de ácido cítrico.

Una forma de verificar el supuesto de varianza constante es graficando los predichos contra los residuos, en la Figura 9.64 se demuestra que se cumple con el supuesto de la varianza constante para la concentración de ácido cítrico, ya que los datos no muestran un patrón claro y contundente.

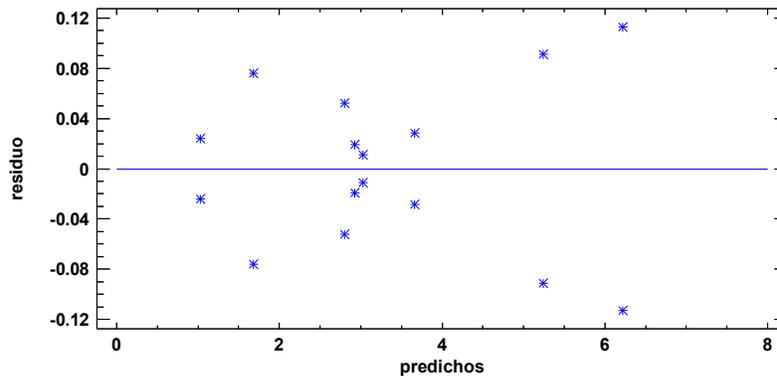


Figura 9.64. Gráfico de predicho contra residuos para la concentración de ácido cítrico.

La suposición de independendia en los residuos puede verificarse si se grafica el número de ejecución (orden en que se colectó un dato) contra el residuo correspondiente. En la Figura 9.65 se demuestra que se cumple con el supuesto de independendia para la concentración de ácido cítrico, ya que la tendencia de los datos es aleatoria, de igual forma se demuestra que se aplicó de forma correcta el principio de aleatorización.

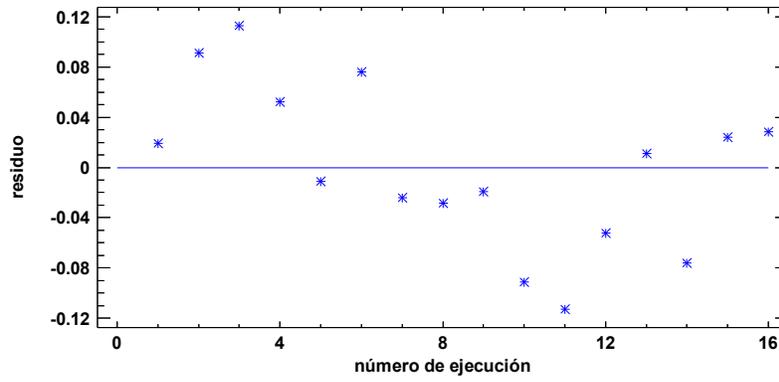
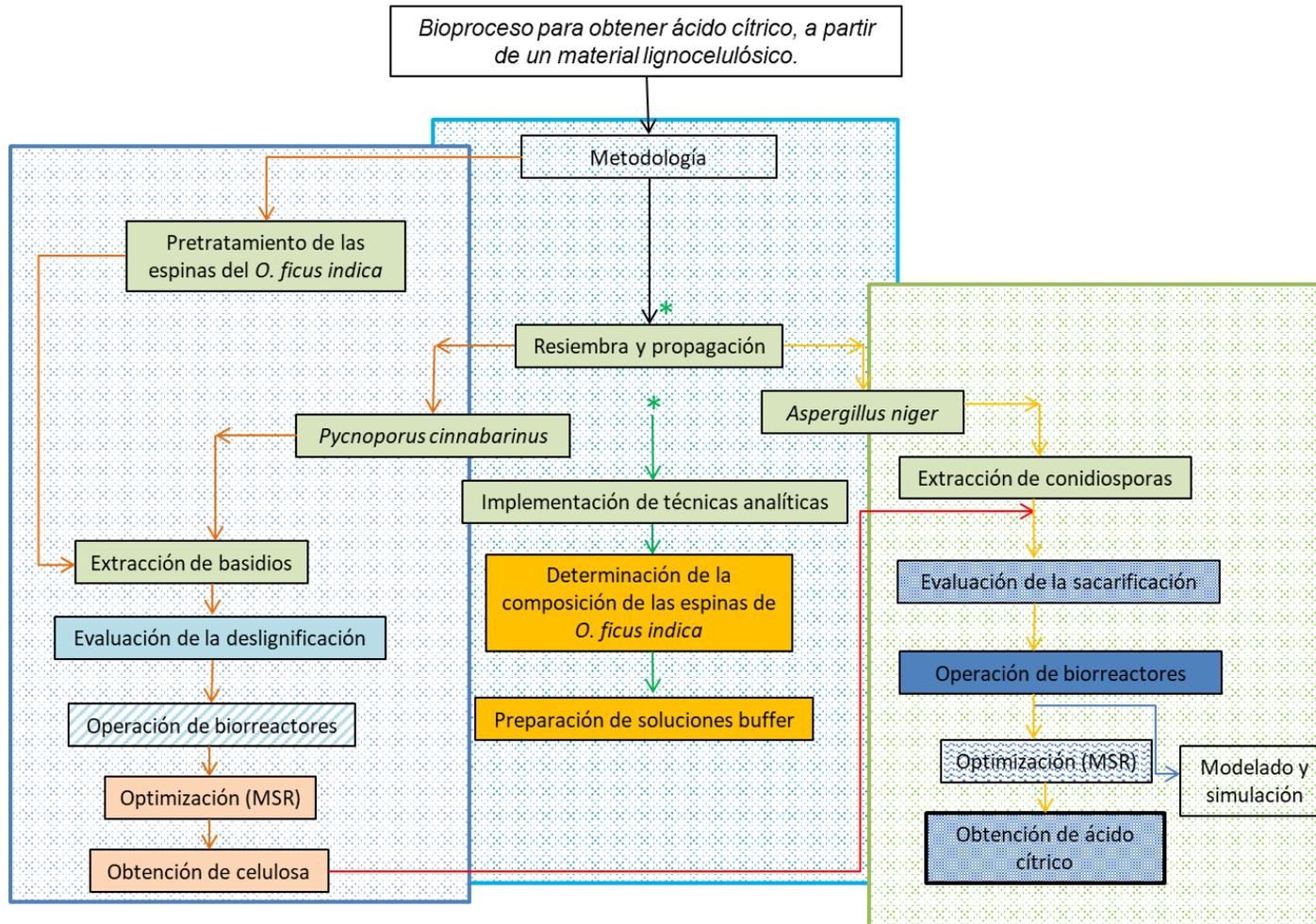


Figura 9.65. Gráfico de número de ejecución contra residuos para la concentración de ácido cítrico.

9.4 Diagrama de flujo de la metodología



9.5 Deslignificación de *Opuntia ficus indica*

9.5.1 Monitoreo durante la operación de los biorreactores (*P. cinnabarinus*)

A continuación, se presentarán los gráficos del promedio de las mediciones de ORP, OD, biomasa y CRT; que describen el comportamiento de los biorreactores de las fermentaciones con claves de F1 a F16, exceptuando F5 y F13 (previamente explicados en la sección 6.6).

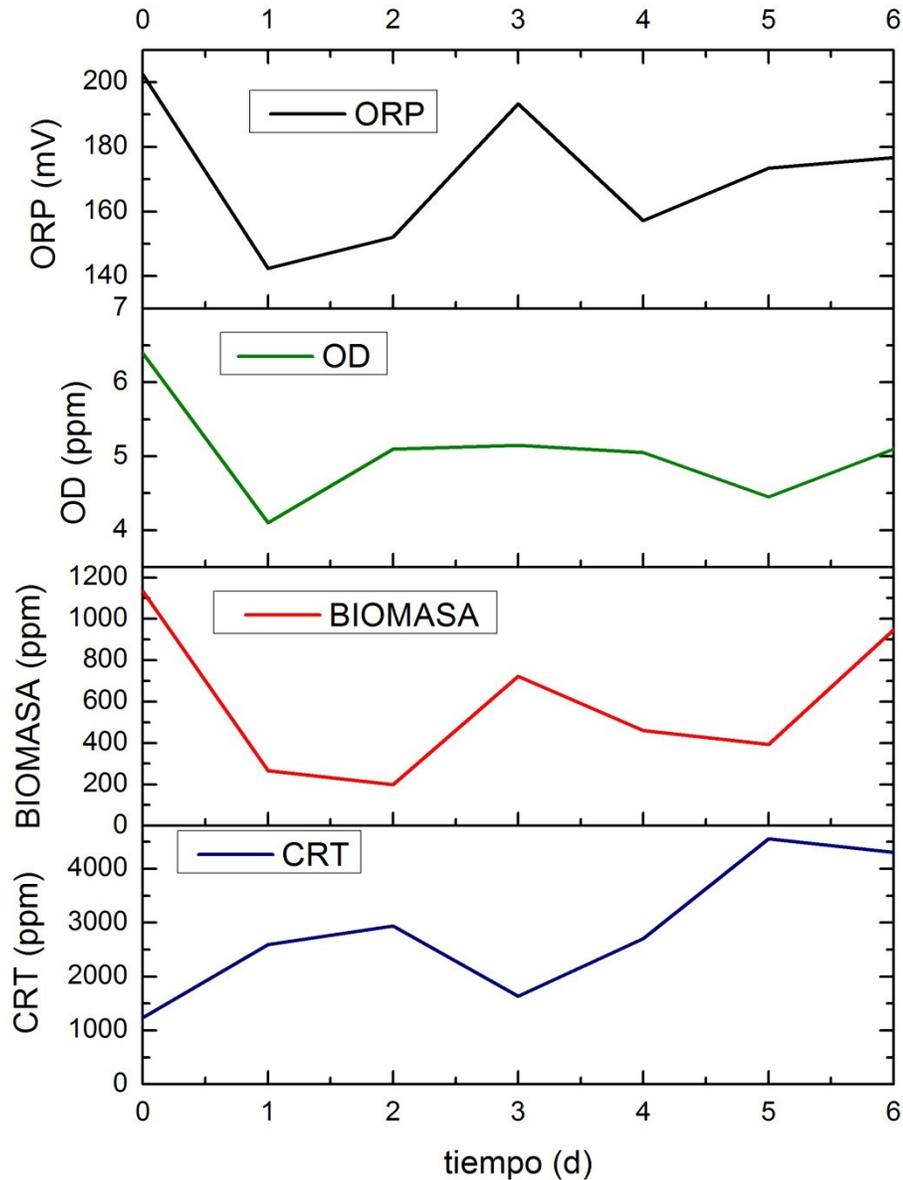


Figura 9.66. Comportamiento del ORP, OD, Biomasa y CRT (promedios fermentaciones F1-F12): pH 6, tamaño de partícula de 0.074 mm y temperatura de 30 °C.

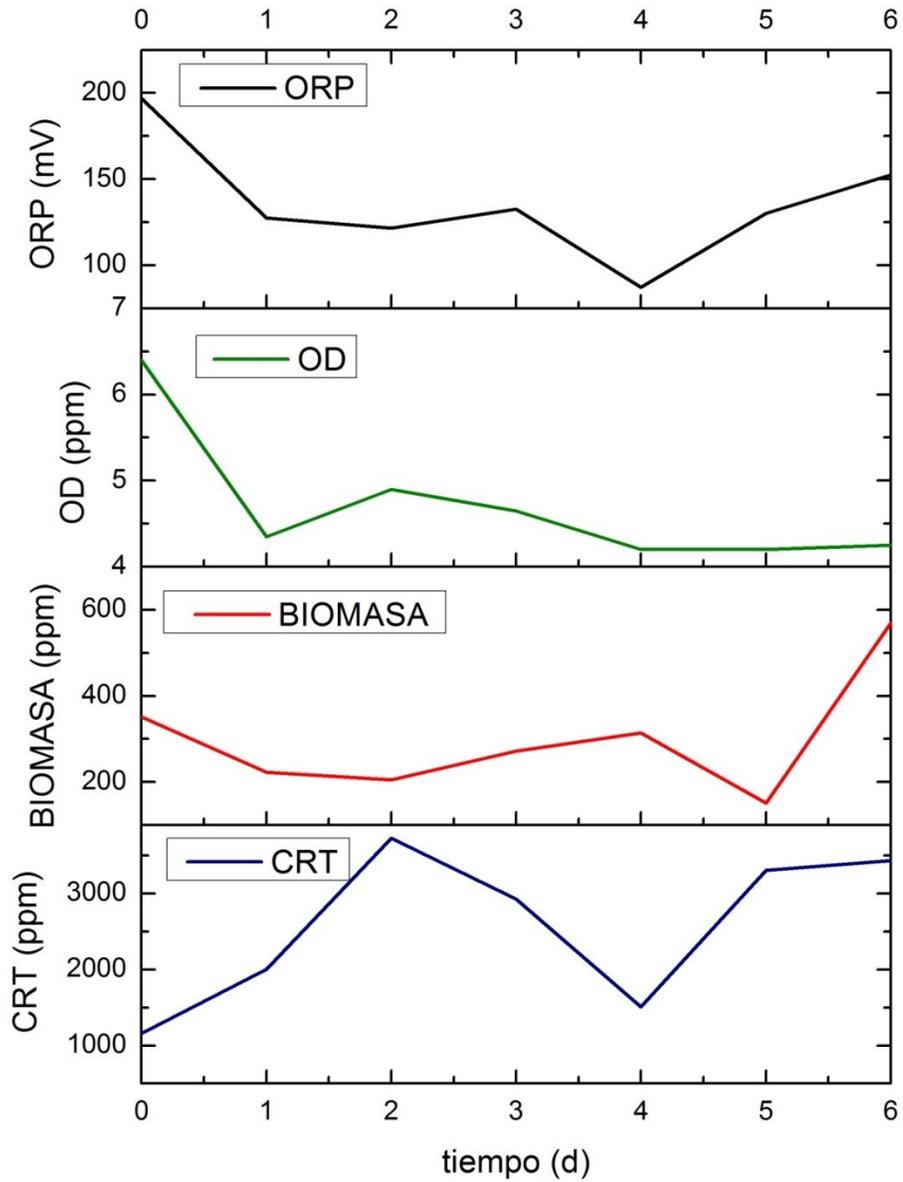


Figura 9.67. Comportamiento del ORP, OD, Biomasa y CRT (promedios fermentaciones F2-F10): pH 4, tamaño de partícula de 0.074 mm y temperatura de 30 °C.

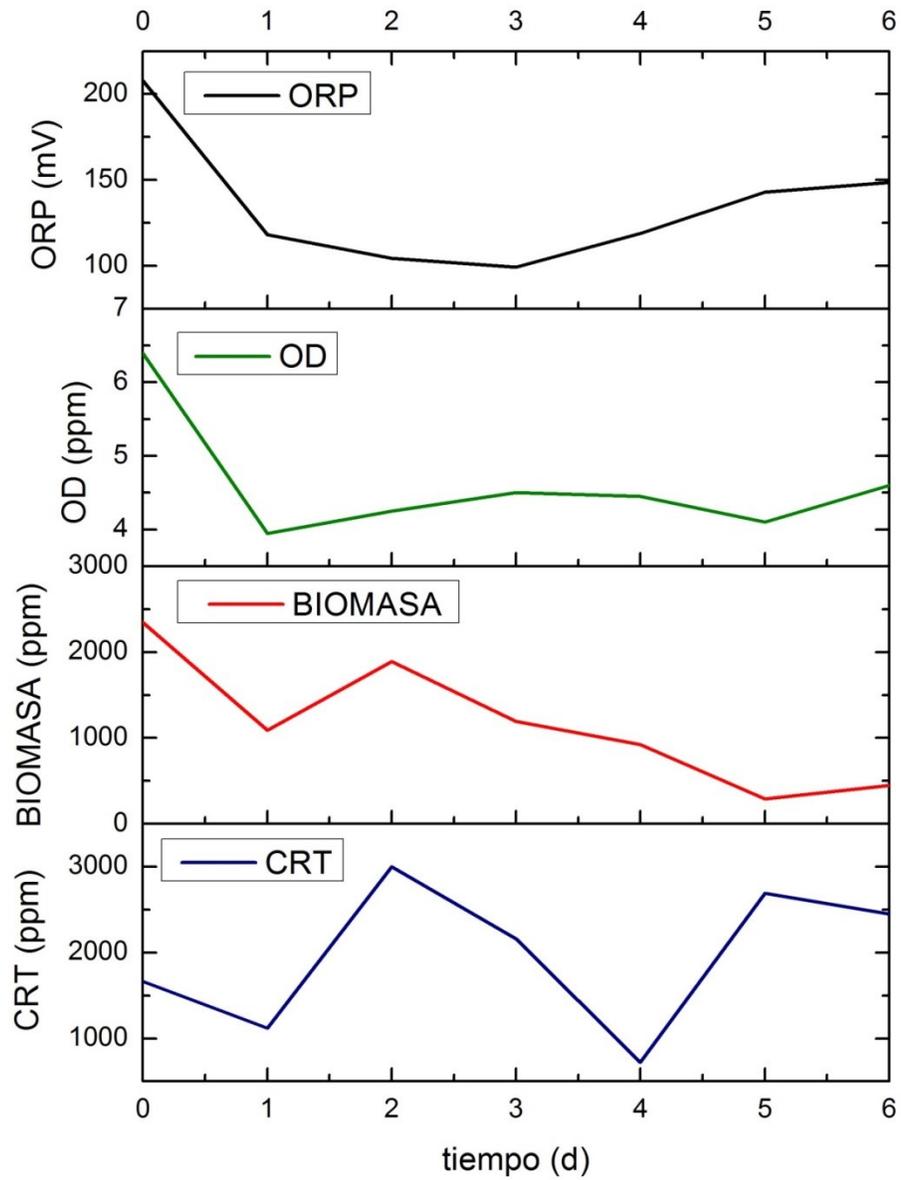


Figura 9.68. Comportamiento del ORP, OD, Biomasa y CRT (promedios fermentaciones F3-F9): pH 4, tamaño de partícula de 0.25 mm y temperatura de 30 °C.

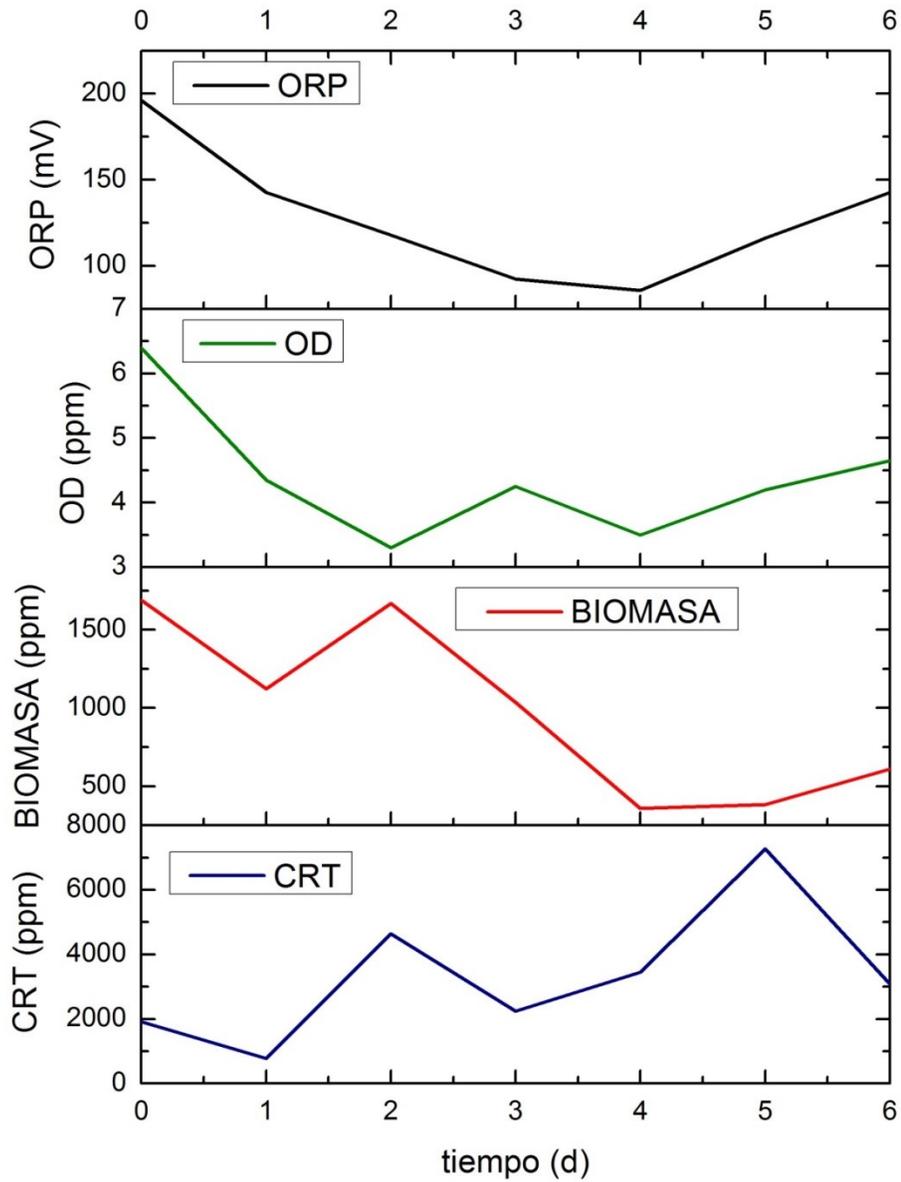


Figura 9.69. Comportamiento del ORP, OD, Biomasa y CRT (promedios fermentaciones F4-F11): pH 6, tamaño de partícula de 0.25 mm y temperatura de 30 °C.

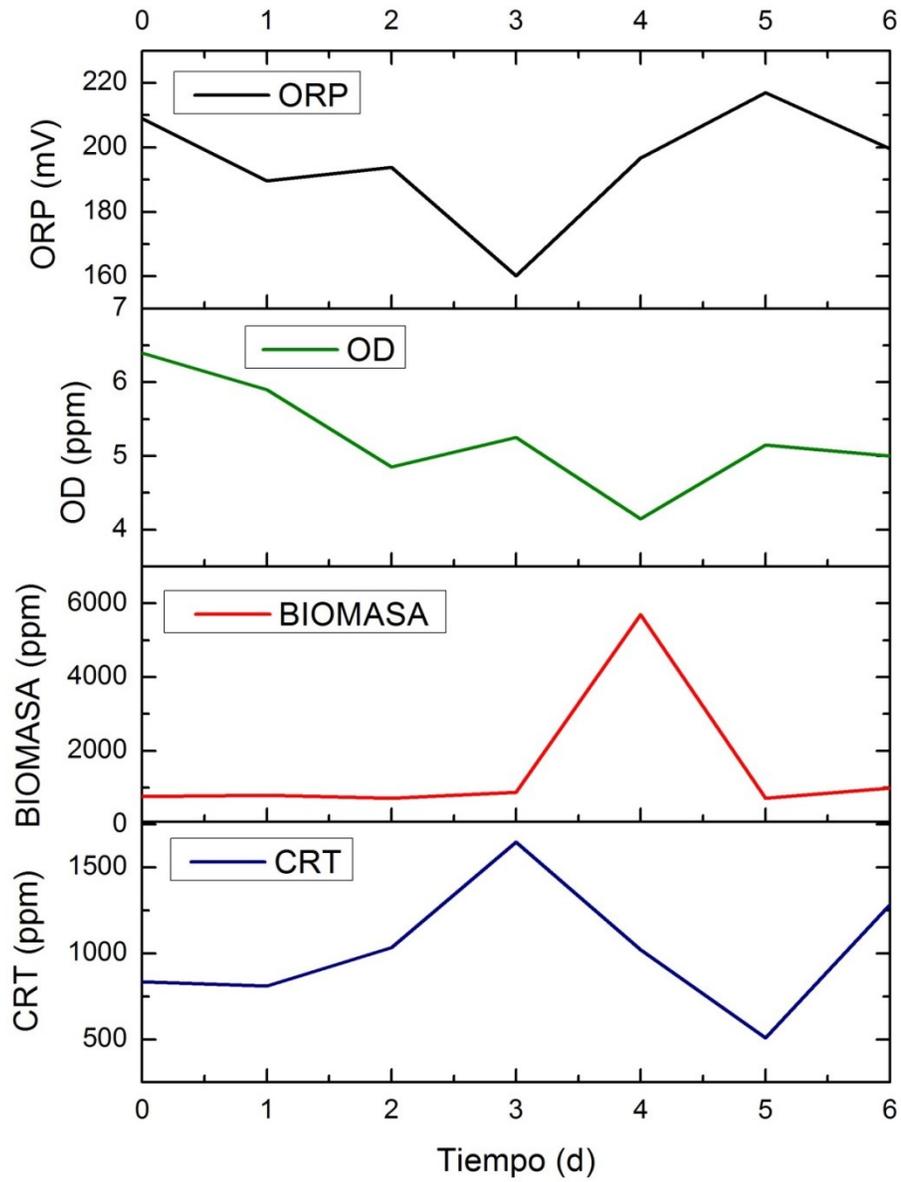


Figura 9.70. Comportamiento del ORP, OD, Biomasa y CRT (promedios fermentaciones F6-F14): pH 4, tamaño de partícula de 0.074 mm y temperatura de 50 °C.

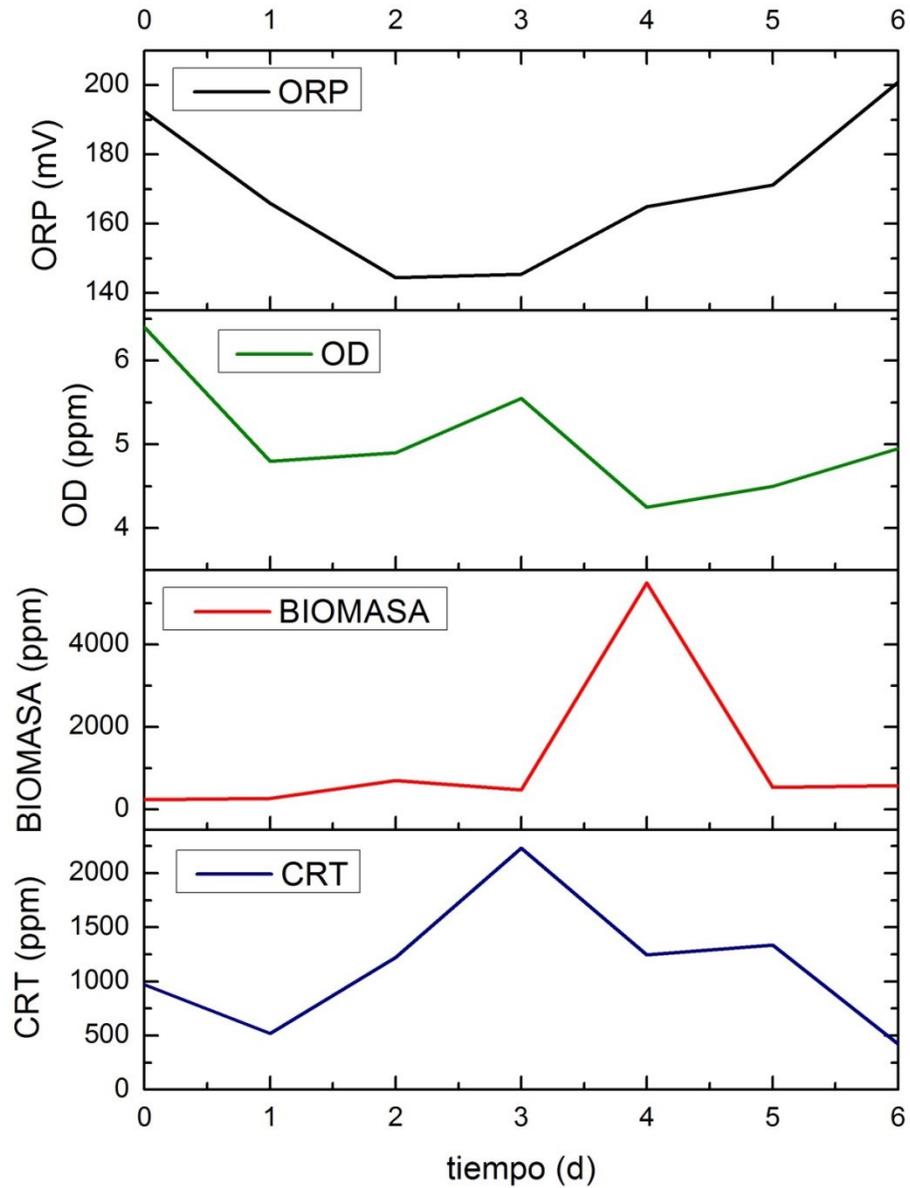


Figura 9.71. Comportamiento del ORP, OD, Biomasa y CRT (promedios fermentaciones F7-F15): pH 6, tamaño de partícula de 0.25 mm y temperatura de 50 °C.

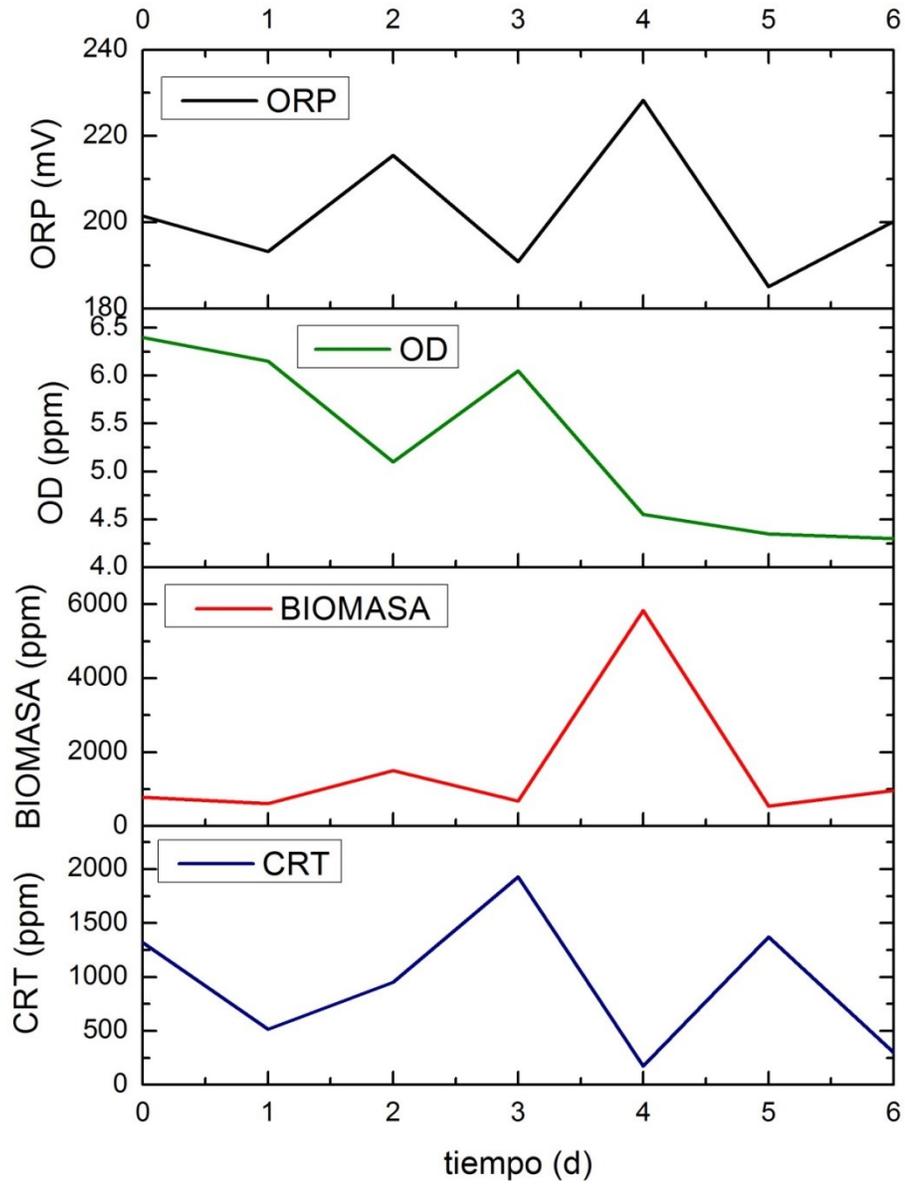


Figura 9.72. Comportamiento del ORP, OD, Biomasa y CRT (promedios fermentaciones F8-F16): pH 6, tamaño de partícula de 0.074 mm y temperatura de 50 °C.

9.5.2 Espectros IR (*P. cinnabarinus*)

A continuación, se presentan los espectros IR de las fermentaciones con *P. cinnabarinus*.

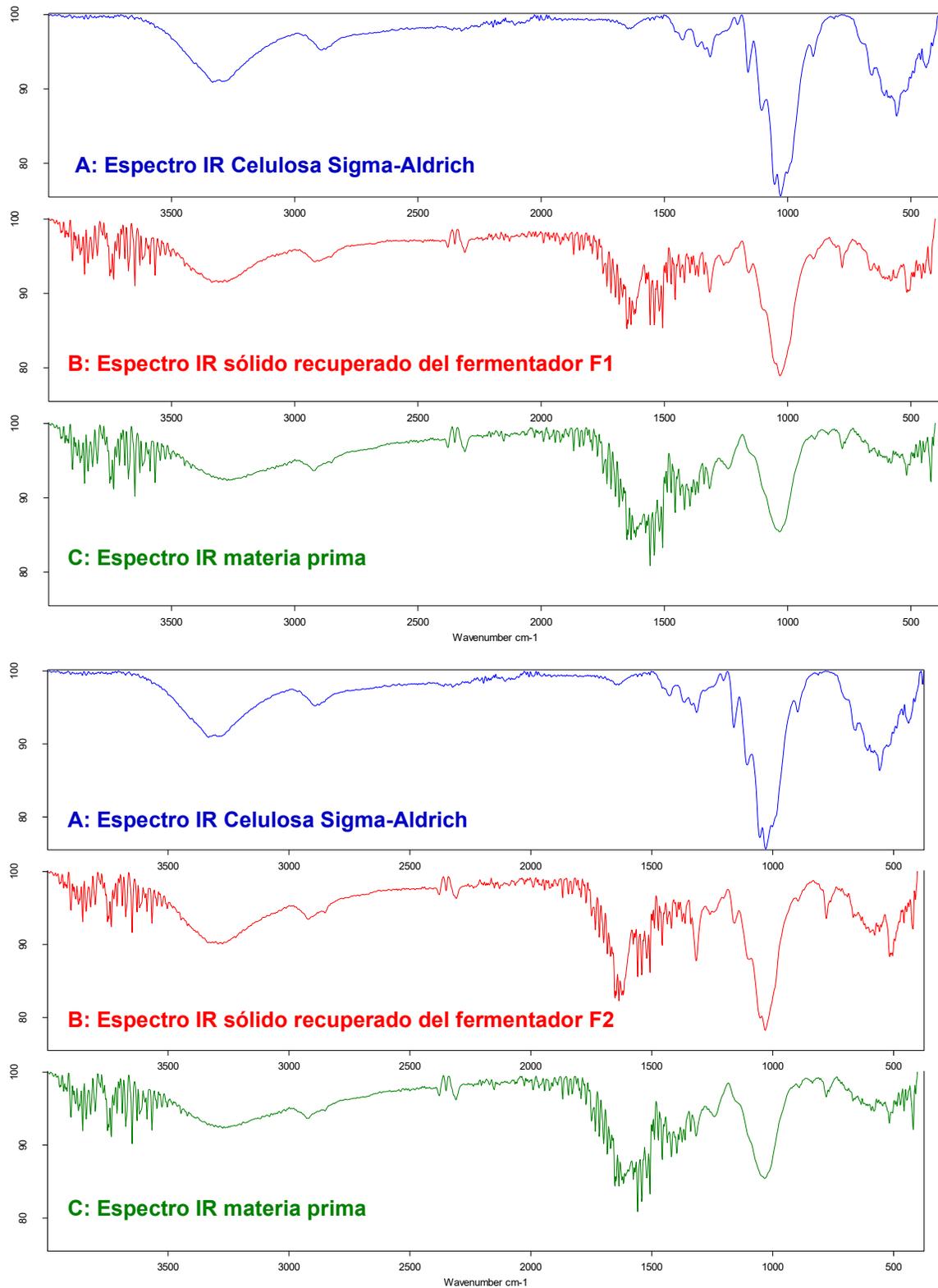


Figura 9.73. Comparación de espectros IR fermentadores clave: F1 y F2.

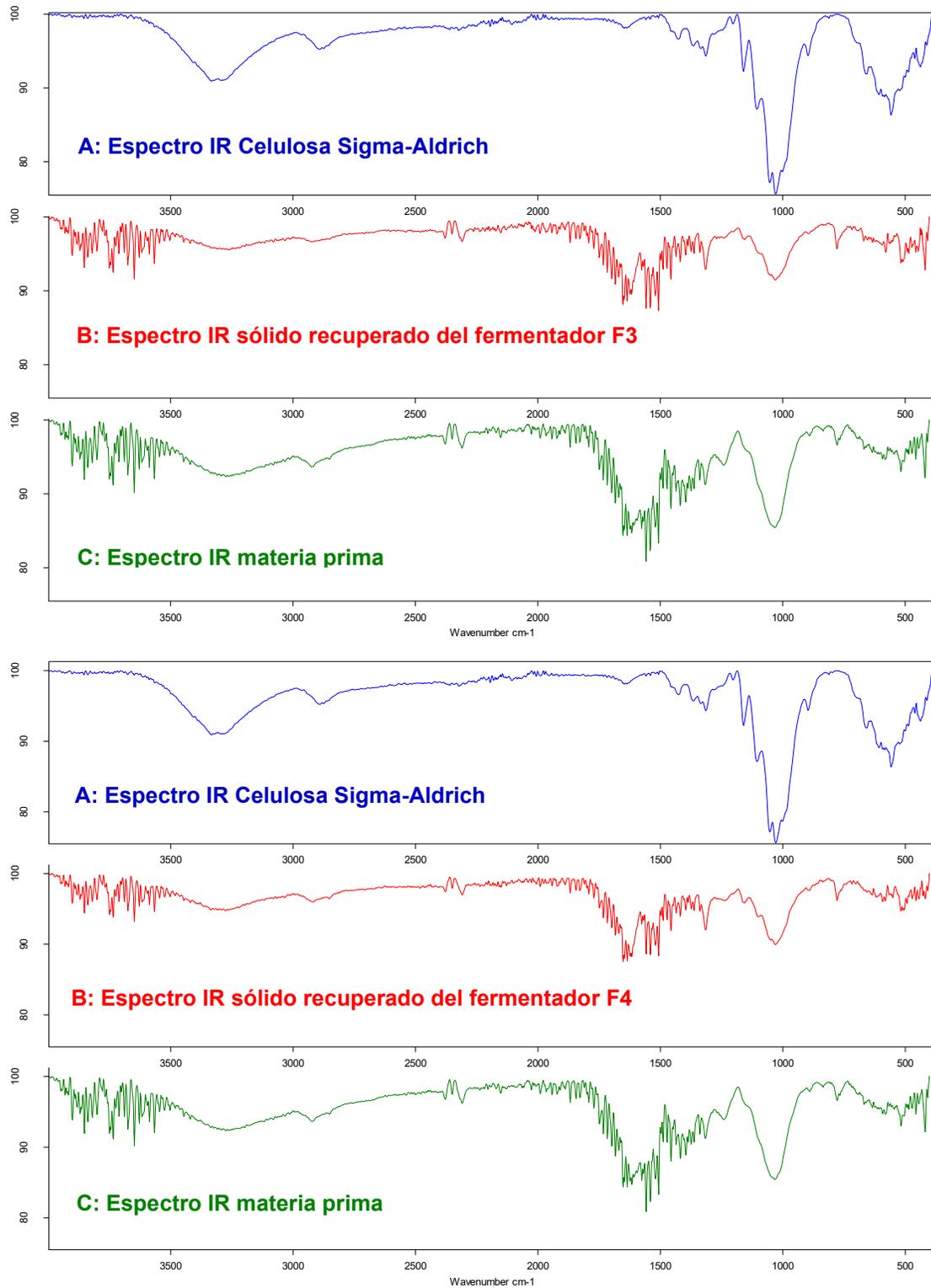


Figura 9.74. Comparación de espectros IR fermentadores clave: F3 y F4.

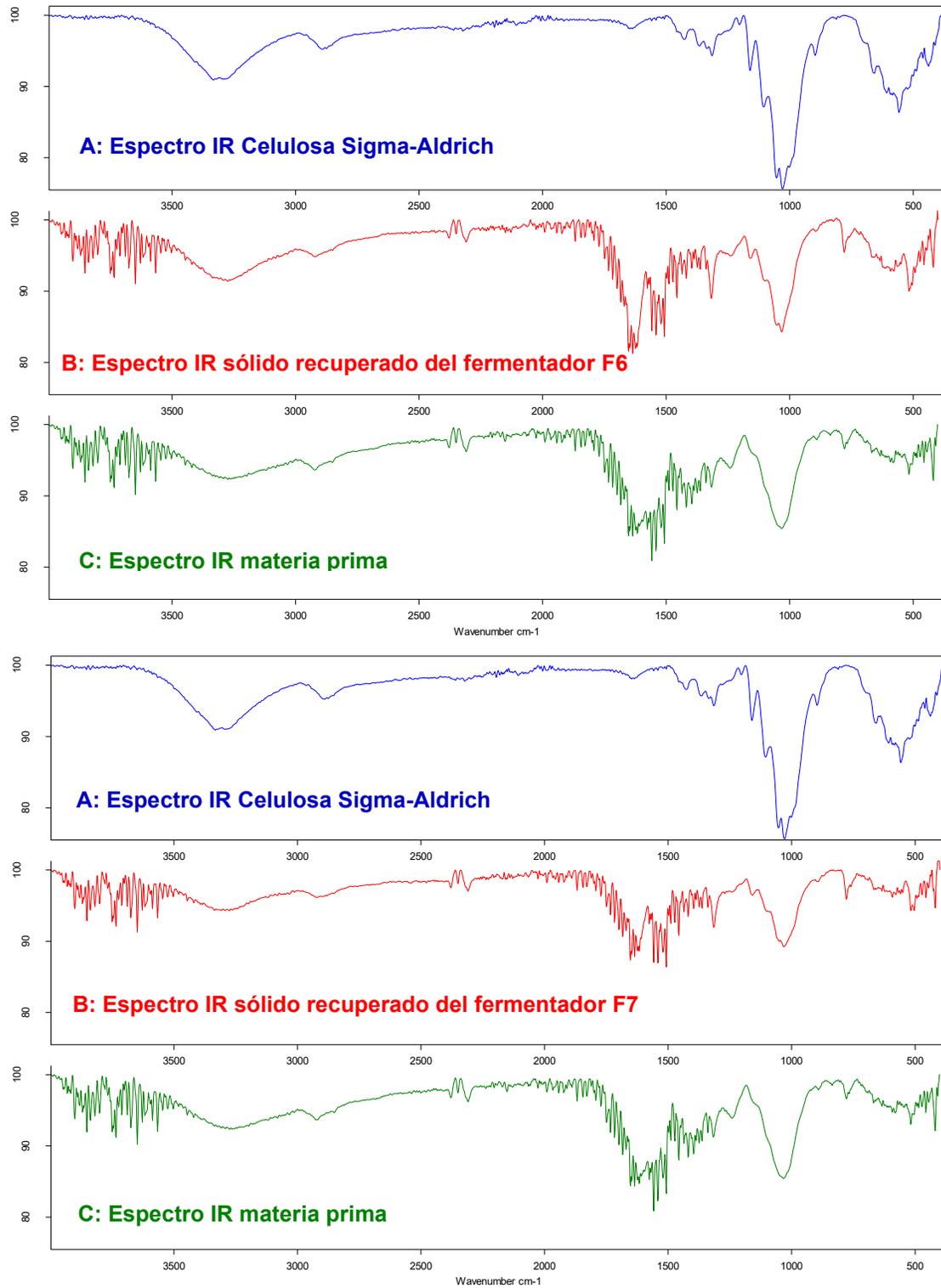


Figura 9.75. Comparación de espectros IR fermentadores clave: F6 y F7.

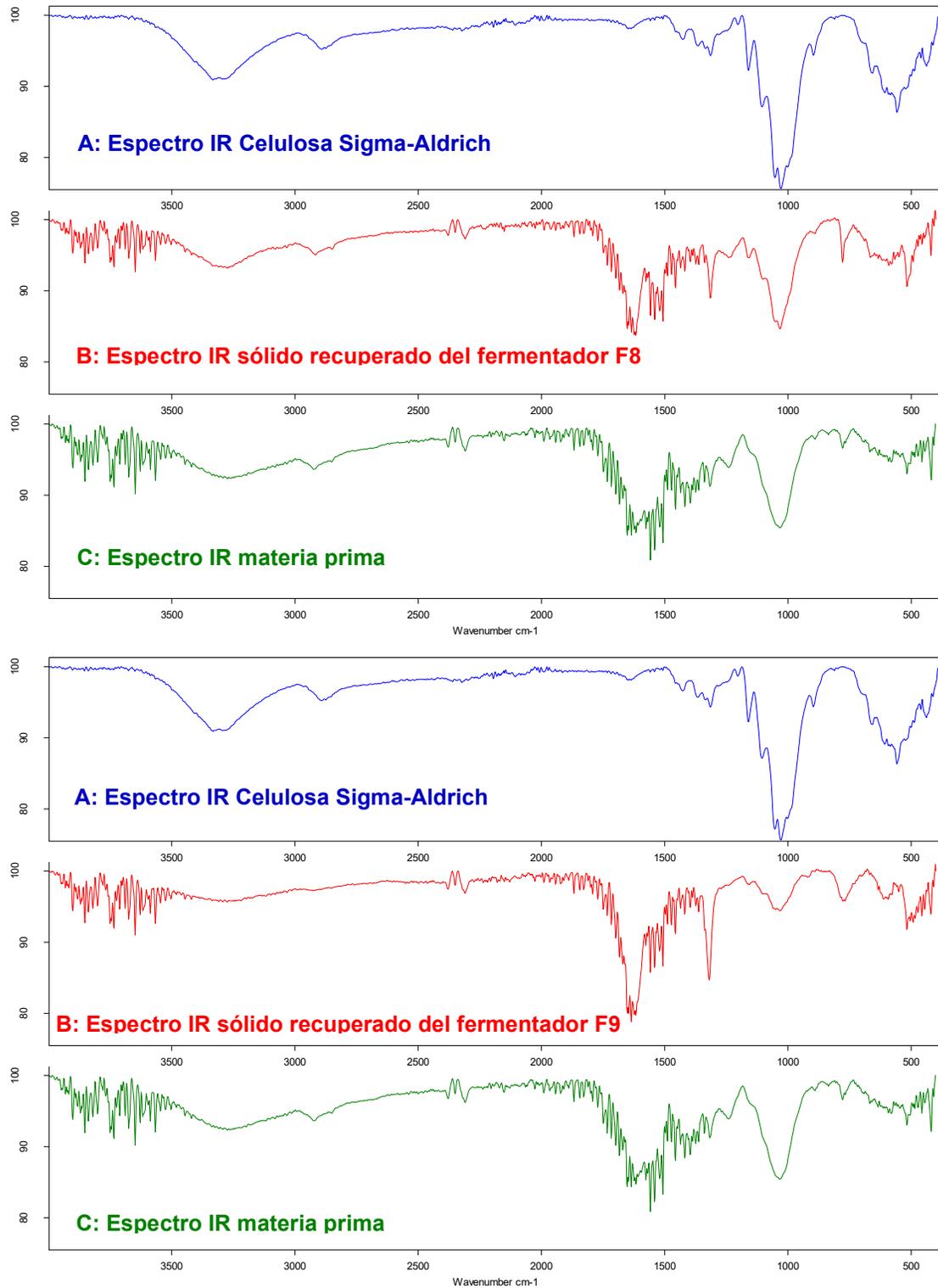


Figura 9.76. Comparación de espectros IR fermentadores clave: F8 y F9.

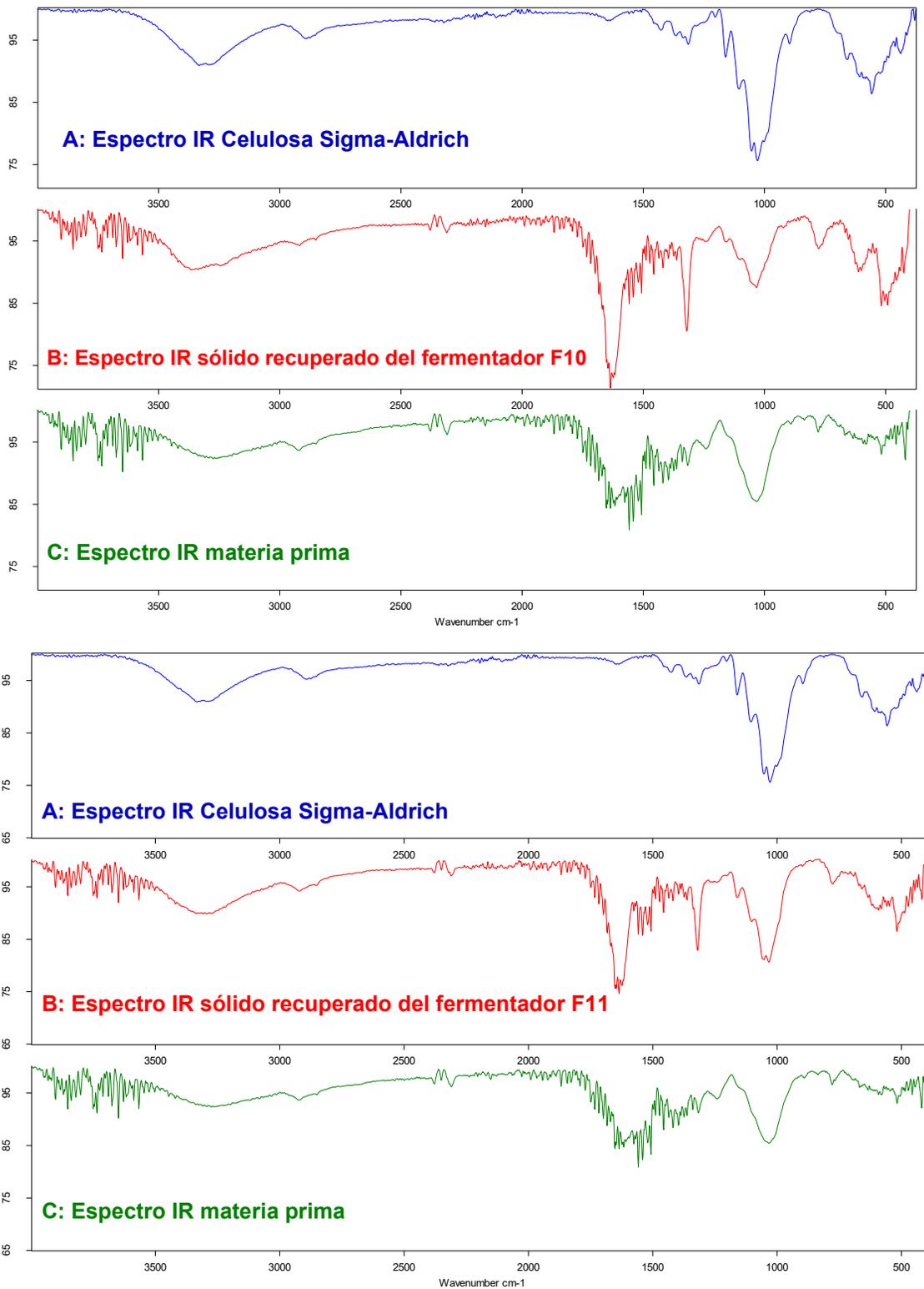


Figura 9.77. Comparación de espectros IR fermentadores clave: F10 y F11.

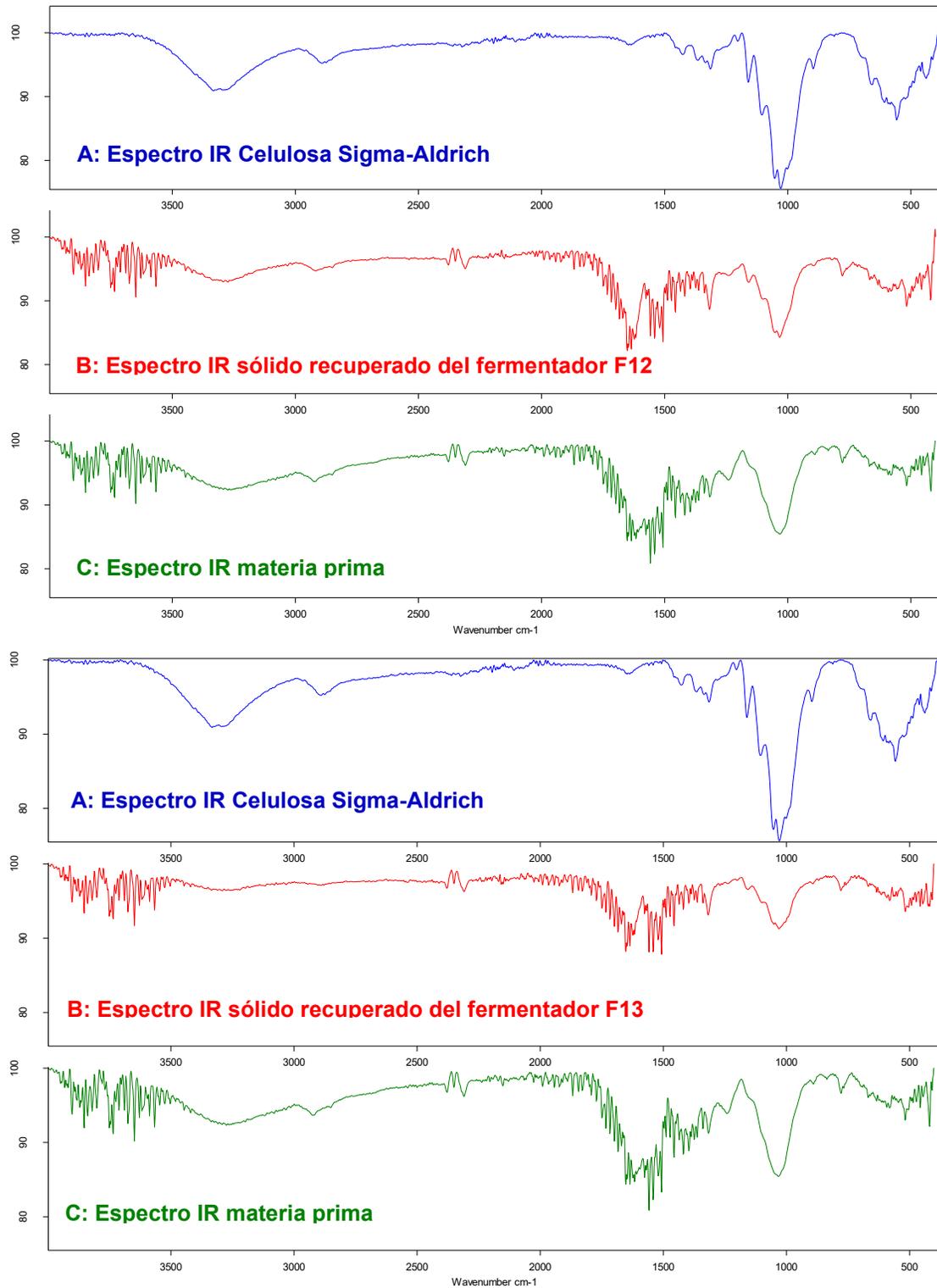


Figura 9.78. Comparación de espectros IR fermentadores clave: F12 y F13.

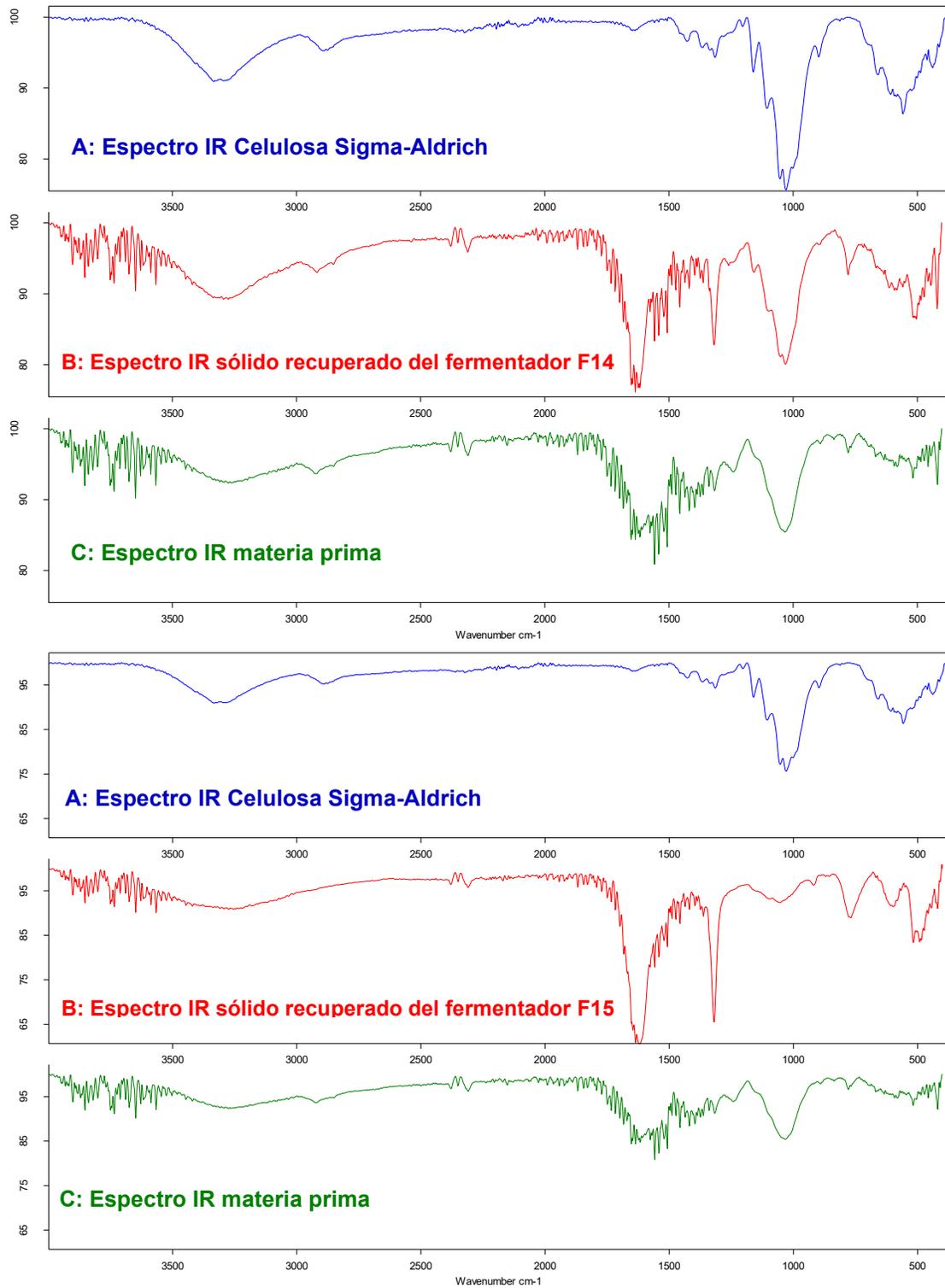


Figura 9.79. Comparación de espectros IR fermentadores clave: F14 y F15.

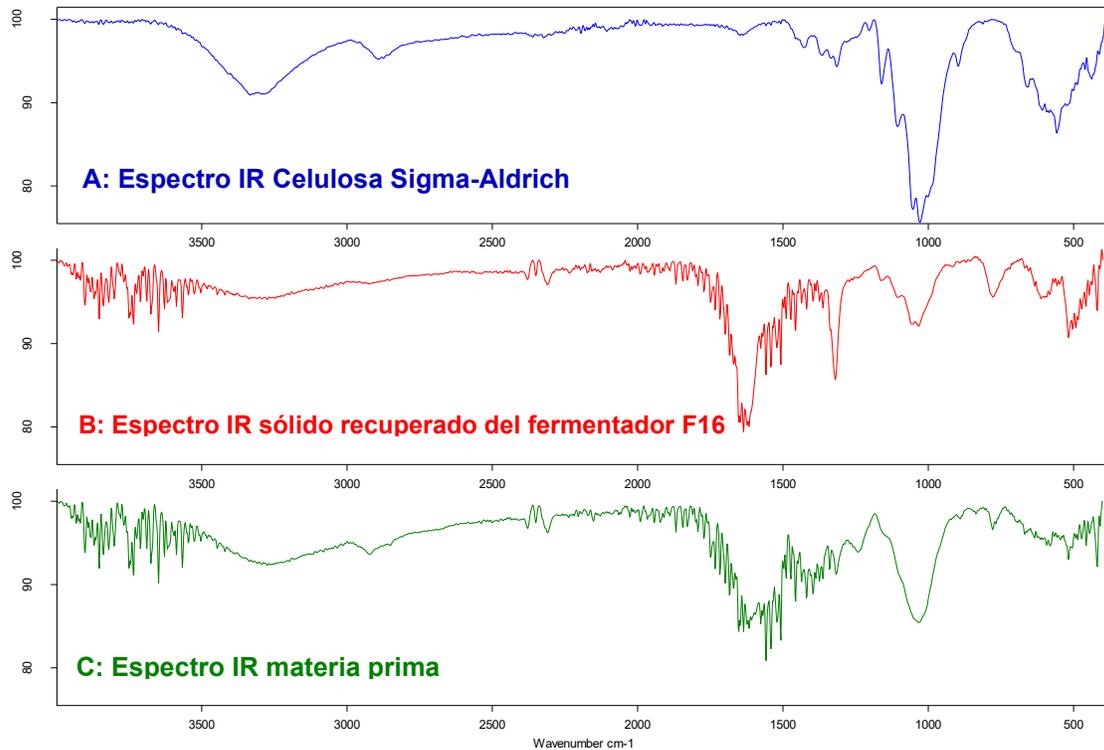


Figura 9.80. Comparación de espectros IR fermentador clave: F16.

9.6 Obtención de ácido cítrico

9.6.1 Monitoreo durante la operación de los biorreactores (*A. niger*)

A continuación, se presentarán los gráficos del promedio de las mediciones de consumo de celulosa, Oxígeno disuelto, biomasa, y concentración de ácido cítrico; que describen el comportamiento de los biorreactores de las fermentaciones con claves de R1 a R8 referidas en la Tabla 6.18.

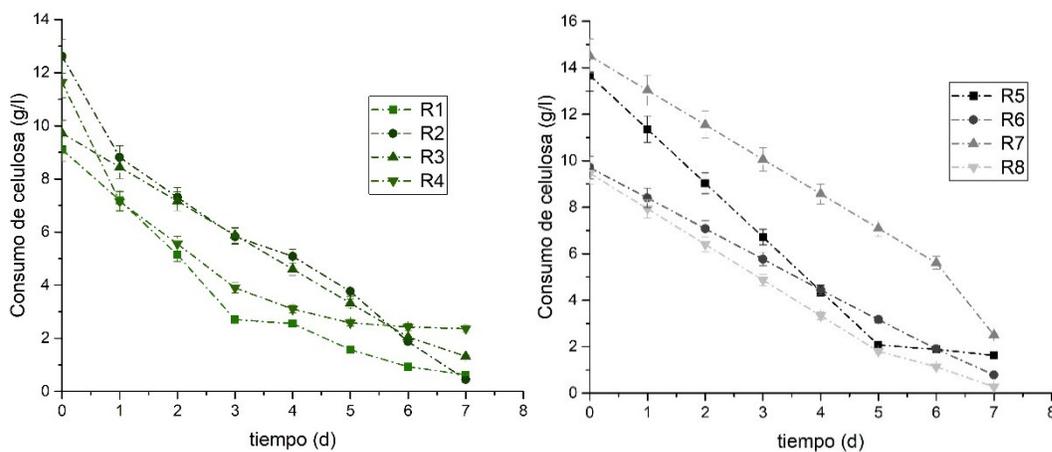


Figura 9.81. Comportamiento del consumo de celulosa dentro de los biorreactores R1 a R8.

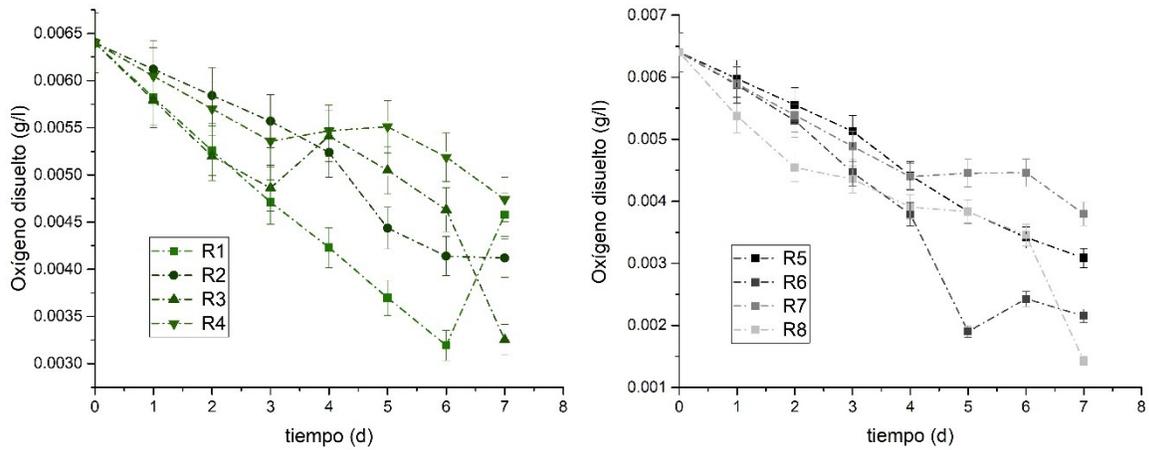


Figura 9.82. Comportamiento del Oxígeno disuelto dentro de los biorreactores R1 a R8.

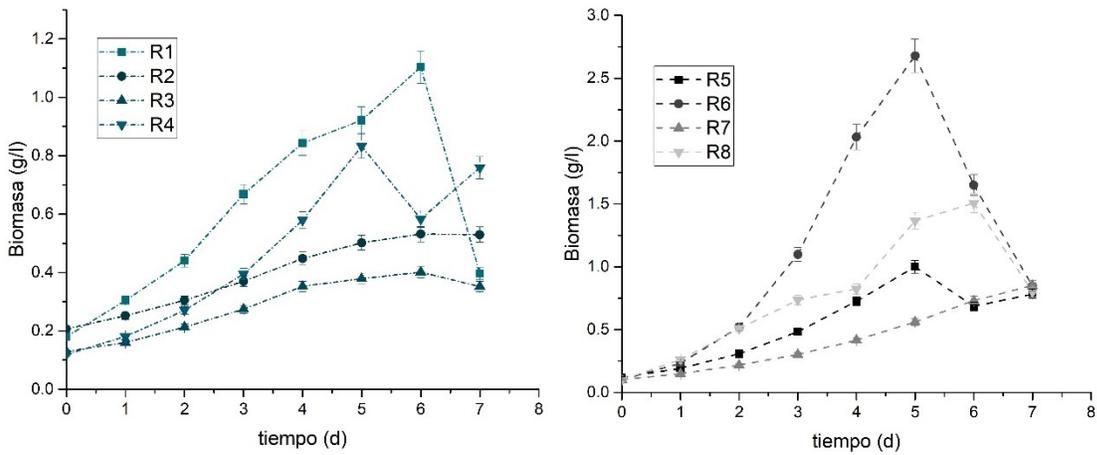


Figura 9.83. Comportamiento de la Biomasa dentro de los biorreactores R1 a R8.

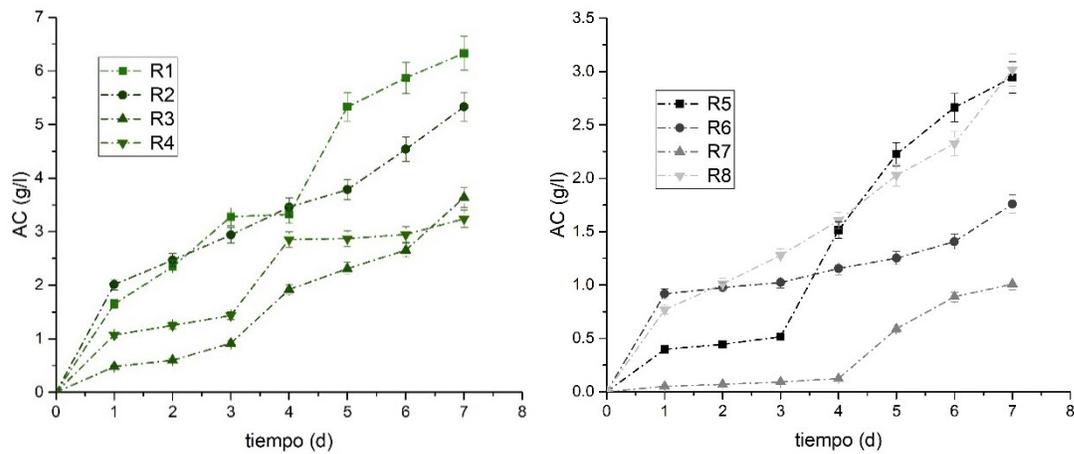


Figura 9.84. Comportamiento del ácido cítrico dentro de los biorreactores R1 a R8.

10. Apéndices

10.1 Apéndice A: Normalidad, varianza constante e independencia.

Es una práctica común utilizar la muestra de residuos para comprobar si los supuestos de normalidad, varianza constante e independencia se cumplen, los residuos o residuales se pueden ver como una muestra aleatoria de una distribución normal con media cero y varianza constante [33].

Un procedimiento gráfico para verificar el cumplimiento del supuesto de *normalidad* de los residuos consiste en la gráfica de probabilidad normal. Esta gráfica del tipo X-Y tiene las escalas de tal manera que, si los residuos siguen una distribución normal al graficarlos, tienden a quedar alineados en una línea recta [33].

Una forma de verificar el supuesto de *varianza constante* es graficando los predichos contra los residuos, si los puntos en esta gráfica se distribuyen de manera aleatoria en una banda horizontal (sin ningún patrón claro y contundente), entonces es señal de que se cumple el supuesto de que los tratamientos tienen igual varianza. Por el contrario, si se distribuyen con algún patrón claro y contundente, como por ejemplo una forma de “embudo, arco doble, no lineal”, entonces es señal de que no se está cumpliendo el supuesto de varianza constante. Un claro embudo en los residuales indicará que el error de pronóstico del modelo tiene una relación directa (positiva o negativa) con la magnitud del pronóstico (predicho) [33].

La suposición de independencia en los residuos puede verificarse si se grafica el número de ejecución (orden en que se colectó un dato) contra el residuo correspondiente. De esta manera, si al graficar se detecta una tendencia o patrón no aleatorio claramente definido, esto es evidencia de que existe una correlación entre los errores y, por lo tanto, el supuesto de independencia no se cumple. Si el comportamiento de los puntos es aleatorio dentro de una banda horizontal, el supuesto se está cumpliendo. La violación de este supuesto generalmente indica deficiencias en la planeación y ejecución del experimento; asimismo, puede ser un indicador de que no se aplicó en forma correcta el principio de aleatorización, o de que conforme se fueron realizando las pruebas experimentales aparecieron factores que afectaron la respuesta observada (variables no controlables) [33].

10.2 Apéndice B: Fundamentos teóricos.

10.2.1 Introducción a los métodos espectrométricos

Los métodos espectrométricos son un amplio grupo de métodos analíticos que se basan en las espectroscopías atómicas y moleculares. La espectroscopía es un término general para la ciencia que trata de las distintas interacciones de la radiación con la materia. Históricamente, las interacciones de interés se producían entre la radiación electromagnética y la materia, sin embargo, ahora el término espectroscopía se ha ampliado para incluir las interacciones entre la materia y otras formas de energía. Ejemplos de ello son las ondas acústicas y los haces de partículas como iones o electrones. La espectrometría y los métodos espectrométricos hacen referencia a la medida de la intensidad de la radiación mediante un detector fotoeléctrico o con otro tipo de dispositivo electrónico [43].

10.2.2 Propiedades generales de la radiación electromagnética

Muchas de las propiedades de la radiación electromagnética se explican adecuadamente con un modelo clásico de onda sinusoidal, que utiliza parámetros como la longitud de onda, la frecuencia, la velocidad y la amplitud. A diferencia de otros fenómenos ondulatorios, como el sonido, la radiación electromagnética no necesita un medio de apoyo para transmitirse y, por tanto, se propaga fácilmente a través del vacío.

El modelo ondulatorio falla al intentar explicar fenómenos asociados con la absorción o la emisión de energía radiante. Para comprender estos procesos, hay que acudir a un modelo corpuscular en el que la radiación electromagnética se contempla con un flujo de partículas discretas, o paquetes ondulatorios, de energía denominados fotones, en los que la energía de un fotón es proporcional a la frecuencia de la radiación. Este doble punto de vista de la radiación como partícula y como onda no es mutuamente excluyente, sino complementario. De hecho, la dualidad onda-corpúsculo se aplica al comportamiento de haces de electrones, protones y de otras partículas elementales, y se racionaliza completamente por medio de la mecánica ondulatoria [43, 44].

10.2.3 Propiedades ondulatorias de la radiación electromagnética

Para muchos fines, la radiación electromagnética se representa como un campo eléctrico y otro magnético que están en fase, con oscilaciones sinusoidales en ángulo recto de uno respecto al otro y respecto a la dirección de propagación. La Figura 10.85 es una representación de este tipo de oscilación sinusoidal para un rayo individual de una radiación electromagnética polarizada en el plano. Polarizada en el plano significa que todas las oscilaciones tanto del campo eléctrico como del magnético están en un solo plano. La Figura 10.85 (b) es una representación bidimensional de la componente eléctrica del rayo de la Figura 10.85 (a) En esta figura, el campo eléctrico se representa como un vector cuya longitud es proporcional a la fuerza del campo. La abscisa de esta representación gráfica puede ser el tiempo, cuando la radiación atraviesa un punto fijo del espacio, o la distancia, cuando el tiempo se mantiene constante [43].

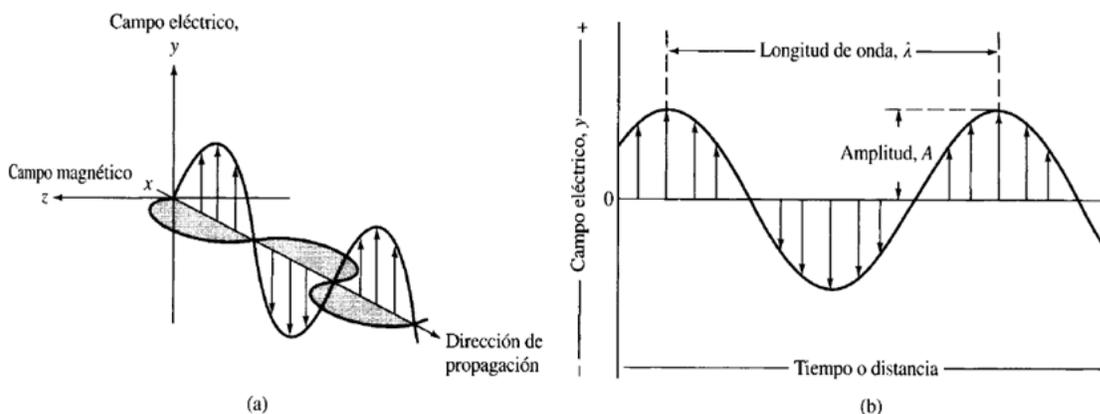


Figura 10.85. Representación de un haz de radiación monocromática, polarizada en el plano: (a) campos eléctrico y magnético perpendiculares entre sí y respecto a la dirección de propagación, (b) representación bidimensional del vector eléctrico. [43]

10.2.4 El espectro electromagnético

Como se muestra en la Figura 10.86, el espectro electromagnético abarca un intervalo enorme de longitud de onda y de frecuencia (así como de energía). De hecho, el intervalo es tan grande que se necesita una escala logarítmica; también describe cualitativamente las principales regiones espectrales. Las divisiones se basan en los métodos que se precisan para generar y detectar las diversas clases de radiación. La región visible del espectro percibido por el ojo humano es muy pequeña si se compara con otras regiones espectrales. Hay que tener en cuenta también que los métodos espectroquímicos que utilizan no sólo la radiación visible sino también las radiaciones ultravioleta e infrarroja se denominan con frecuencia *métodos ópticos*.

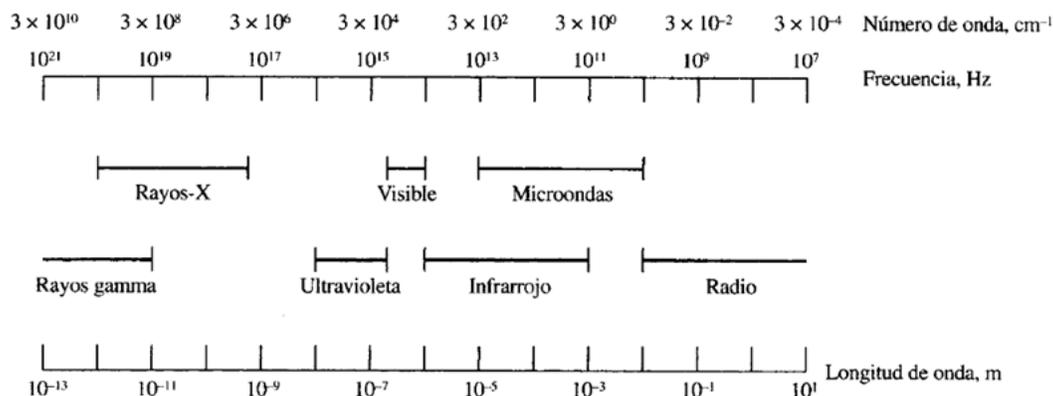


Figura 10.86. Regiones del espectro electromagnético [35]

La Tabla 10.25 recoge los intervalos de longitud de onda y de frecuencia de las regiones del espectro que interesan con fines analíticos, así como los nombres de los diversos métodos espectroscópicos asociados con cada uno. La última columna de la tabla indica los tipos de transiciones cuánticas nucleares, atómicas o moleculares que constituyen el fundamento de las distintas técnicas espectroscópicas.

Tabla 10.25. Métodos espectroscópicos generales basados en la radiación electromagnética. [43]

Tipo de espectroscopía	Intervalo habitual de longitud de onda*	Intervalo habitual de número de onda, cm^{-1}	Tipo de transición cuántica
Emisión de rayos gamma	0.005-1.4 Å	---	Nuclear
Absorción, emisión, fluorescencia y difracción de rayos X	0.1-100 Å	---	Electrones internos
Absorción ultravioleta de vacío	10-180 nm	1×10^6 a 5×10^4	Electrones de enlace
Absorción, emisión y fluorescencia ultravioleta visible	180-780 nm	5×10^4 a 1.3×10^4	Electrones de enlace
Absorción infrarroja y dispersión Raman	0.78-300 μm	1.3×10^4 a 3.3×10^{41}	Rotación/vibración de moléculas
Absorción de microondas	0.75-3.75 mm	13-27	Rotación de moléculas
Absorción de espín electrónico	3 cm	0.33	Espín de los electrones en un campo magnético
Resonancia magnética nuclear	0.6-10 m	1.7×10^{-2} a 1×10^3	Espín de los núcleos en un campo magnético

*1 Å = 10^{-10} m = 10^{-8} cm1 nm = 10^{-9} m = 10^{-7} cm1 μm = 10^{-6} m = 10^{-4} cm

Los métodos cuantitativos basados en la absorción requieren dos medidas de potencia: una, antes de que el haz haya pasado a través del medio que contiene el analito (P_0), y la otra, después (P). La transmitancia y la absorbancia son dos términos que se utilizan ampliamente en la espectrometría de absorción y se relacionan por la razón de P_0 a P [43].

10.2.5 Transmitancia y Absorbancia

La Figura 10.87 muestra un haz de radiación paralelo antes y después de atravesar un medio que tiene un espesor de b cm y una concentración c de una especie absorbente. Como consecuencia de las interacciones entre los fotones y los átomos o moléculas absorbentes, la potencia del haz disminuye de P_0 a P . La transmitancia (T) del medio es la fracción de radiación incidente transmitida por el medio (ec. 11).

$$T = \frac{P}{P_0} \text{ ec. (11)}$$

La transmitancia se expresa con frecuencia como porcentaje o

$$\%T = \frac{P}{P_0} (100\%) \text{ ec. (12)}$$

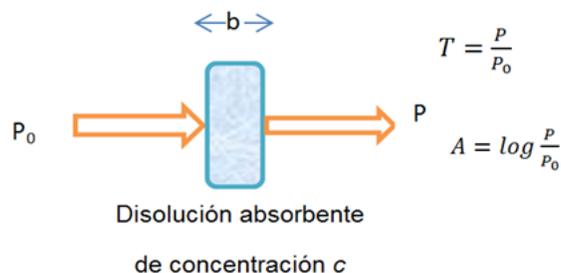


Figura 10.87. Atenuación de un haz de radiación por una disolución absorbente. [43]

La absorbancia A de un medio se define por la ecuación 13.

$$A = -\log_{10} T = \log \frac{P_0}{P} \text{ ec. (13)}$$

Al contrario que con la transmitancia, la absorbancia de un medio aumenta cuando la atenuación del haz se hace mayor.

10.2.6 La ley de Beer

Para una radiación monocromática, la absorbancia es directamente proporcional al camino óptico b a través del medio y la concentración c de la especie absorbente. Estas relaciones vienen dadas por la ecuación 14:

$$A = abc \text{ ec. (14)}$$

Donde a es una constante de proporcionalidad denominada *absortividad*. La magnitud de a claramente dependerá de las unidades utilizadas para b y c . Con frecuencia para disoluciones de una especie absorbente, b se da en centímetros y c en gramos por litro. Las unidades de la absortividad en ese caso son L/g-cm.

Cuando la concentración en la ecuación 15 se expresa en moles por litro y la longitud de la cubeta en centímetros, la absortividad se denomina *absortividad molar* y se representa por el símbolo ϵ . Así, cuando b está en centímetros y c en moles por litro:

$$A = \epsilon bc \text{ ec. (15)}$$

Donde ϵ tiene las unidades de L/mol-cm.

La ecuación 14 y 15 son expresiones de la *ley de Beer*, que sirve como base para el análisis cuantitativo mediante medidas de absorción atómica y molecular [43, 44].

10.2.7 Calibración de los métodos instrumentales

La mayoría de los métodos instrumentales requieren una calibración, proceso que relaciona la señal analítica medida con la concentración del analito. Para la elaboración de la curva de calibración se introducen en el instrumento varios patrones que contienen concentraciones exactamente conocidas del analito y se registra la señal del instrumento.

Normalmente esta señal se corrige con la correspondiente señal obtenida con el blanco. En condiciones ideales el blanco contiene todos los componentes de la muestra original excepto el analito. Los datos obtenidos se representan para obtener una gráfica de la señal corregida del instrumento frente a la concentración de analito [43, 44].

10.2.8 Espectrometría de absorción molecular ultravioleta/visible

Las medidas de absorción de la radiación ultravioleta y visible encuentran una enorme aplicación en la determinación cuantitativa de una gran variedad de especies tanto inorgánica como orgánica [43]. En contraste con la espectroscopía IR, que mide el estiramiento y flexión de los enlaces covalentes, la espectroscopía UV es un método instrumental para medir *transiciones electrónicas* en las moléculas, además las regiones UV y visible del espectro electromagnético, son adyacentes entre sí.

Dependiendo de la molécula en estudio, las absorciones pueden ocurrir en la región del UV o del visible o en ambas. Por lo regular, la espectroscopía UV comprende la absorción de la energía que no es visible a simple vista.

La descarga eléctrica en gases inertes provoca que los electrones se eleven a orbitales atómicos más altos. Cuando los electrones regresan a su estado fundamental o estado basal, se emite energía en forma de luz visible. Cada gas inerte produce su color único en tubos de descarga eléctrica. La espectroscopía ultravioleta comprende básicamente lo mismo, cambios electrónicos entre los niveles de energía, pero esta vez tales cambios se realizan por la aplicación de luz UV y generalmente involucran pares de electrones no compartidos o electrones en los enlaces π . Los espectros ultravioleta cubren normalmente la región de 200 a 400 nm.

10.2.8.1 Efectos de la estructura en los espectros de absorción del UV.

El tipo de cambio básico que puede medirse en la espectroscopía UV es el de las *transiciones electrónicas*, en las que se requiere *energía* para promover electrones a un nivel de energía más alto. Esta absorción de energía es la que se mide y registra en la espectroscopía UV. La cantidad de energía requerida para la excitación electrónica, varía de acuerdo con la naturaleza del enlace químico y la estructura molecular.

10.2.8.2 Enlaces σ

Los electrones en un enlace σ están fuertemente unidos entre núcleos atómicos y pueden excitarse a un estado de energía más alto, sólo por longitudes de onda muy cortas en la región del UV lejano. La excitación de los electrones de valencia en los enlaces (σ) C-C y C-H (como en los alcanos) requieren una radiación de 130 nm o menos (220 Kcal/mol, 920.5 KJ/mol). La elevación de estos electrones a un estado más alto de energía se denomina transición $\sigma \rightarrow \sigma^*$ porque los electrones se excitan de un orbital de enlace σ a un orbital de antienlace σ^* .

10.2.8.3 Enlaces π

A diferencia de los electrones que constituyen los enlaces σ , los electrones de enlace en los enlaces π se enlazan menos fuertemente y son más volátiles. Como resultado de ello, es más sencillo excitarlos a niveles de energía más altos (y menos estables), y estas transiciones electrónicas se pueden observar en la región UV con la mayoría de los instrumentos. Dichas transiciones se denominan *transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$* , ya que los electrones experimentan transiciones entre los orbitales de enlace π y los de antienlace π^* . Ejemplos de grupos funcionales que muestran transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ son C=C (alquenos), C \equiv C (alquinos) y C=O (grupos carbonilo).

10.2.8.4 Excitación de los pares electrónicos no compartidos

Otro tipo de excitación electrónica involucra pares de electrones no compartidos en átomos que forman parte de un enlace múltiple. Por ejemplo, se puede desplazar un electrón de un enlace en el oxígeno del grupo carbonilo, C=O a un estado de energía más alto inestable, mediante la aplicación de energía. Este tipo de transición recibe el nombre de transición $n \rightarrow \pi^*$, en donde n se refiere a los pares de electrones no enlazados, en este ejemplo del oxígeno.

10.2.8.5 Efectos de la conjugación en los espectros UV

Una aplicación tangible de la espectroscopía UV es en la localización e identificación de sistemas conjugados, tales como C=C-C= y C=C-C=O, en los que ocurren las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$ a menores energías y longitudes de onda más altas, y se pueden medir en la región de UV. Debido a la relación existente entre la longitud de onda (λ) y la energía ($E=hc/\lambda$, donde h es la constante de Planck y c es la velocidad de la luz), el máximo de absorción, $\lambda_{\text{máx}}$, indica la diferencia entre la energía del estado fundamental y la energía del estado excitado de una molécula. Los sistemas conjugados de electrones π están deslocalizados y, a juzgar por los datos espectrales de UV, parecen ser más estables en el estado excitado de lo que sería un sistema no conjugado correspondiente. Esto es apoyado por los datos de UV en los alquenos conjugados, donde el butadieno-1,3 tiene una $\lambda_{\text{máx}}$ a 217 nm, el hexatrieno-1,3,5 (un C=C adicional) tiene una $\lambda_{\text{máx}}$ a 258 nm, y el octatetraeno-1,3,5,7 (otro C=C agregado) tiene una $\lambda_{\text{máx}}$ a 286 nm. Dado que aumenta la cantidad de conjugación, disminuye el ΔE entre los estados fundamentales y excitados; el segundo estado es más estable en relación con el estado fundamental [44].

10.2.8.6 Terminología de la espectroscopía UV

Las definiciones siguientes se emplean comúnmente en la espectroscopía UV:

- **Cromóforo.** Grupo no saturado (o colección de grupos) que es el causante de la absorción UV; literalmente significa “que tiene color”, aun cuando muchos compuestos incoloros producen espectros UV.
- **Auxocromo.** Un sustituyente (generalmente saturado) que altera la longitud de onda y el coeficiente de extinción molar del máximo de absorción cuando se une a un cromóforo.
- **Desplazamiento batocrómico.** El desplazamiento del máximo de absorción a longitudes de onda más larga (λ mayor) causado por cualquier sustitución en el cromóforo (por un auxocromo) o un cambio en el disolvente.
- **Desplazamiento hipsocrómico.** El desplazamiento a longitudes de onda más cortas (λ menor) como resultado de una sustitución o cambio del disolvente.
- **Efecto hipercrómico.** Aumento en el coeficiente de extinción molar (ϵ).
- **Efecto hipocrómico.** Reducción en el coeficiente de extinción molar.

10.2.9 Espectroscopía en el Infrarrojo (IR)

Los espectros en el infrarrojo dan una gran cantidad de información sobre los detalles estructurales de los compuestos orgánicos. *La espectroscopía en el infrarrojo permite la localización e identificación de, virtualmente, todos los grupos funcionales*, pues muestran absorciones específicas y características en la región del infrarrojo. El IR es el único análisis instrumental que permite la determinación *directa* del grupo funcional.

Un espectro IR es único para un compuesto dado, de manera que la espectroscopía IR es un método excelente para confirmar la estructura de un compuesto desconocido, siempre que se conozca el mismo compuesto a partir de otras fuentes. Es poco probable que dos compuestos orgánicos cualesquiera posean espectros IR idénticos, tanto en posición como en intensidad de los picos.

Un ejemplo del uso de la espectroscopía IR estriba en la síntesis de los compuestos orgánicos. Si un producto natural conocido, se sintetiza en el laboratorio, y si su espectro IR es completamente idéntico, la síntesis resulta satisfactoria.

Los espectros en el infrarrojo son complejos y a menudo difíciles de interpretar completamente. La espectroscopía en el infrarrojo es ampliamente empírica y se deben poder reconocer e identificar ciertos picos de absorción característicos de diversos grupos funcionales.

La espectroscopía en el infrarrojo mide los cambios en las vibraciones de *estiramiento* y *flexión* que ocurren cuando una molécula absorbe energía electromagnética. Los movimientos vibratorios posibles de una molécula dependen de dos cosas: 1) la masa de los átomos que forman un enlace dado y 2) la naturaleza del enlace en sí, esto es, su energía de enlace.

Las energías asociadas a los modos vibratorios de las moléculas (véase Figura 10.88) se pueden ilustrar (*aproximadamente*) mediante un sistema de esferas y resortes, que también se mueven con diversas vibraciones de estiramiento y flexiones. Los átomos (o esferas) de mayores masas se mueven con menos frecuencia, y cuando más fuerte es el enlace (o resorte), más rápido es el movimiento. Se puede derivar una relación matemática de la física clásica, al asociar la frecuencia de vibración de un enlace dado, a la fuerza del enlace. La relación es la siguiente (ecuación 16):

$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{m^*}} \quad (16)$$

Donde ν = frecuencia de absorción en cm^{-1}

c = velocidad de la luz (3.0×10^{10} cm/seg)

k = constante de fuerza del enlace

m^* = masa reducida de dos átomos que constituyen el enlace: es decir,

$m^* = (m_1 + m_2) / m_1 m_2$, donde m_1 y m_2 son las masas de dos átomos

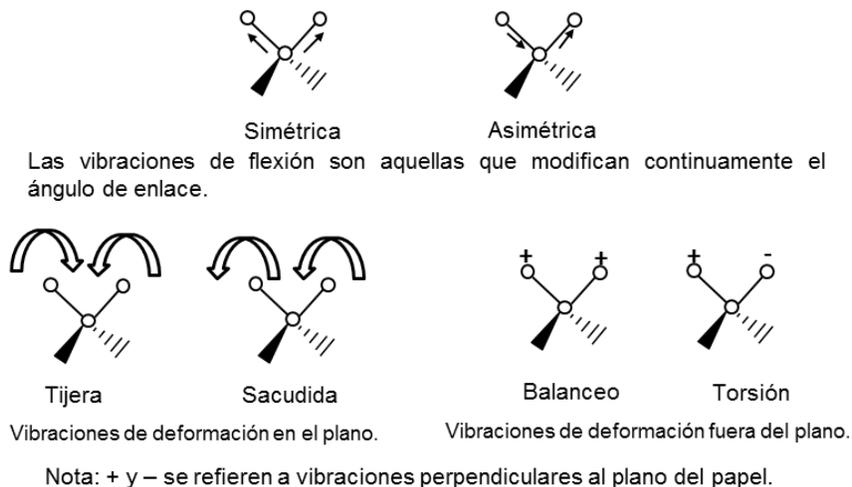


Figura 10.88. Arriba modos vibratorios y abajo plegamiento de un grupo de átomos, XY_2 [44]

La relación establece que la frecuencia de vibración es directamente proporcional a la raíz cuadrada de la constante de fuerza del enlace, k . La constante de fuerza es particular para un enlace dado, así como característico de él.

Es otra constante física, por ejemplo, como el punto de fusión. En el modelo anterior, la constante de fuerza puede asemejarse al estiramiento y resistencia del resorte. Asimismo, la frecuencia es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la masa reducida, m^* , del sistema. Cuando mayor sea la masa, menor será la frecuencia de absorción. Del mismo modo, cuando más fuerte sea el enlace (k), mayor será la frecuencia de absorción [44].