



Educación

Secretaría de Educación Pública



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®
Instituto Tecnológico de Orizaba

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

“EFECTO DE LAS CONDICIONES BATCH EN
LA FERMENTACIÓN POR MEDIO SÓLIDO
DE *A. NIGER*”

QUE PARA OBTENER EL GRADO:
MAESTRA EN CIENCIAS EN
INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTA:

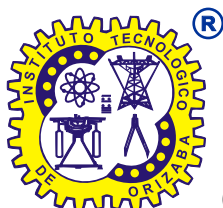
I.Q. Karla Ávila Martínez

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Rosalía Cerecero Enríquez

CODIRECTOR DE TESIS:

Dr. José Manuel Tejero Andrade



ORIZABA, VERACRUZ, MÉXICO.

NOVIEMBRE 2025



Educación
Secretaría de Educación Pública



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



Instituto Tecnológico de Orizaba
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Orizaba, Veracruz, 3/noviembre/2025
Dependencia: División de Estudios de
Posgrado e Investigación.
Asunto: Autorización de Impresión
Opción: I

KARLA AVILA MARTÍNEZ
CANDIDATA A GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA
PRESENTE

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros de Enseñanza Técnica Superior, dependiente de la Dirección General de Institutos Tecnológicos de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

EFFECTO DE LAS CONDICIONES BATCH EN LA FERMENTACIÓN POR MEDIO SÓLIDO DE A. NIGER

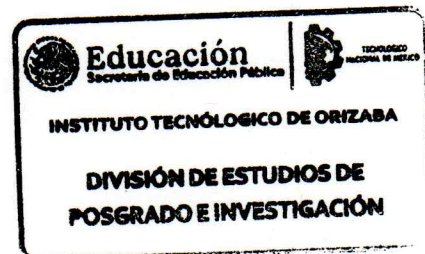
Comunico a usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
CIENCIA-TÉCNICA-CULTURA®

DRA. OFELIA LANDETA ESCAMILLA
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ccp. Archivo
OLE/NAVC



2025
Año de
La Mujer
Indígena

Av. Oriente 9 #852 Colonia Emiliano Zapata, C.P. 94320
Orizaba, Veracruz. Tel. 01 (272) 1105360
e-mail: info@orizaba.tecnm.mx www.orizaba.tecnm.mx





Instituto Tecnológico de Orizaba
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Orizaba, Veracruz, 6/marzo/2025
Asunto: **revisión de trabajo escrito**

DRA. OFELIA LANDETA ESCAMILLA
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PRESENTE

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (la) C.

KARLA ÁVILA MARTÍNEZ

La cual lleva el título de:

"EFECTO DE LAS CONDICIONES BATCH EN LA FERMENTACIÓN POR MEDIO SÓLIDO DE A. NIGER"

Y concluyen que se acepta.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
CIENCIA-TÉCNICA-CULTURA®

PRESIDENTE: DRA. ROSALÍA CERECERO ENRÍQUEZ

FIRMA

SECRETARIO: DR. JOSÉ MANUEL TEJERO ANDRADE

FIRMA

VOCAL: DRA. LETICIA LOPEZ ZAMORA

FIRMA

VOCAL SUP.: DRA. GUADALUPE LUNA SOLANO

FIRMA

TA-09-18



2025
Año de
La Mujer
Indígena

Av. Oriente 9 #852 Colonia Emiliano Zapata, C.P. 94320
Orizaba, Veracruz. Tel. 01 (272) 1105360
e-mail: info@orizaba.tecnm.mx www.orizaba.tecnm.mx



Declaratoria de originalidad y cesión de derechos

Orizaba, Veracruz el día 03 del mes de noviembre del año 2025

La que suscribe

C. Karla Ávila Martínez

Declaro que esta tesis, tiene una extensión de 74 cuartillas, ha sido escrita por mí y constituye el registro escrito del trabajo de tesis titulada

“EFECTO DE LAS CONDICIONES BATCH EN LA FERMENTACIÓN POR MEDIO
SÓLIDO DE *A.Niger*.”

del programa: Maestría en Ciencias en Ingeniería Química bajo la asesoría y dirección de la Dra. Rosalía Cerecero Enríquez y del Dr. José Manuel Tejero Andrade y no ha sido sometida en ninguna otra institución previamente.

Todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal y, en los casos que así lo requieran, cuento con las debidas autorizaciones de quienes poseen los derechos patrimoniales. Por lo tanto, me hago responsable de cualquier litigio o reclamación relacionada con derechos de propiedad intelectual, exonerando de toda responsabilidad al Tecnológico Nacional de México campus Orizaba.

También declaro que, al presentar esta tesis, cedo los derechos del trabajo al Tecnológico Nacional de México campus Orizaba, para su difusión, con fines académicos y de investigación, bajo las regulaciones propias de la institución y que si existe algún acuerdo de confidencialidad de la información lo haré saber en forma escrita para que se omitan las secciones correspondientes.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráfico o de datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: depi_orizaba@tecnm.mx Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente de este.

Nombre y firma



Karla Ávila Martínez

AGRADECIMIENTOS

"El conocimiento es un viaje, y lo más importante no es llegar al destino, sino aprovechar cada paso del camino."

Para Anya Sofía.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi esposo Gerardo, familia, amigos y todas las personas que han sido un pilar fundamental en este proceso. A la Dra. Rosalía Cerecedo por todo su apoyo y por seguir apoyándome aún después tanto tiempo. Su apoyo incondicional, paciencia y aliento constante han sido clave para alcanzar mis metas. Gracias por siempre creer en mí, por enseñarme que el esfuerzo y la perseverancia son esenciales para superar cualquier desafío.

Este logro no es solo mío, sino también de ustedes, que me han acompañado en cada paso de este viaje académico y personal. Gracias por ser mi fuente constante de inspiración y motivación.

RESUMEN

Efecto de las condiciones batch en la fermentación por medio sólido de *A. niger*

Elaborada por: Ing. Karla Ávila Martínez

Dirigida por: Dra. Rosalía Cerecero Enríquez

Dr. José Manuel Tejero Andrade.

La fermentación en estado sólido (SSF) es un proceso microbiológico que ocurre en la superficie de materiales sólidos con capacidad de adsorber y contener agua. En este proceso, una diversidad de microorganismos, como hongos, levaduras y bacterias, han sido utilizados.

Este trabajo se enfoca en la utilización de residuos agroindustriales, como la pulpa de café y el bagazo de caña, como sustratos para la producción de ácido cítrico utilizando la cepa *Aspergillus niger* ITV-18 en un proceso de SSF. El ácido cítrico es un compuesto clave en diversas industrias, como alimentos, bebidas y farmacia, cuya producción a través de fermentación es una alternativa sostenible y económica.

Se realizaron ensayos preliminares para evaluar la adaptación de *A. niger* a diferentes sustratos, destacando la combinación pulpa de café - bagazo de caña de azúcar, que mostró el mejor crecimiento celular, alcanzando una concentración de esporas de 8.3×10^5 esporas/mL. Mediante la caracterización de los sustratos y el análisis de diversas condiciones de fermentación, se determinó que la combinación 60:40 (café-bagazo) sin tratamiento de hidrólisis ni extracción fue la más eficiente, alcanzando un rendimiento máximo en la producción de ácido cítrico.

El desarrollo experimental incluyó la activación y propagación de *A. niger* ITV-18 en PDA a 35°C, acidificando a pH 4.5 en 5 días. Las esporas fueron recuperadas mediante agitación en solución de Tween 80 al 0.01% y conservadas a 4°C. Se formularon sustratos en diferentes proporciones de subproductos de café y bagazo de caña, deshidratados a 30°C durante 4 horas, triturados, tamizados en malla 18 y esterilizados a 121°C durante 10 minutos. Las muestras fueron inoculadas con una concentración inicial de 1×10^5 esporas/mL e incubadas a 35°C por 12 días. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

El conteo de esporas se llevó a cabo con la técnica de la cámara de Neubauer cada dos días. La determinación del pH se realizó en una muestra de 1g más 10 mL de agua destilada, filtrada y valorada con potenciómetro. El análisis de varianza indicó que los tratamientos con mayor proporción de café (4.5:5.5, 6:4, 3:7, 0:10) alcanzaron mayor producción de biomasa al octavo día. La cámara de fermentación mantuvo una temperatura controlada de 35°C, validando su eficacia en el proceso. Como resultado, se obtuvo una concentración final de ácido cítrico de 0.91 g/mL y un conteo de esporas de 8.75×10^5 esporas/mL. Este estudio confirma que el uso de bagazo de caña y residuos de café como sustratos en la fermentación sólida con *A. niger* ITV-18 es una alternativa viable y eficiente para la producción de ácido cítrico.

ABSTRACT

“EVALUATION OF FERMENTATION IN A SOLID ENVIRONMENT BY *A. NIGER*”

By: Karla Ávila Martínez

Advisor (s): PhD. Rosalía Cerecero Enríquez

PhD. José Manuel Tejero Andrade

Solid-state fermentation (SSF) is a microbiological process that occurs on the surface of solid materials capable of adsorbing and retaining water. Various microorganisms, such as fungi, yeasts, and bacteria, have been used in this process. This study focuses on the use of agro-industrial waste, such as coffee pulp and sugarcane bagasse, as substrates for citric acid production using the *Aspergillus niger* ITV-18 strain in an SSF process. Citric acid is a key compound in various industries, including food, beverages, and pharmaceuticals, and its production through fermentation has become a sustainable and economical alternative.

Preliminary tests were conducted to evaluate the adaptation of *A. niger* to different substrates. The combination of coffee pulp and sugarcane bagasse showed the best cell growth, reaching a spore concentration of 8.3×10^5 spores/mL. Through substrate characterization and analysis of different fermentation conditions, it was determined that the 60:40 ratio (coffee-bagasse) without hydrolysis or extraction treatment was the most efficient, achieving the highest citric acid yield.

The experimental process included the activation and propagation of *A. niger* ITV-18 on PDA at 35°C, acidified to pH 4.5 over five days. Spores were recovered by agitation in a 0.01% Tween 80 solution and stored at 4°C. The substrates were prepared with different proportions of coffee by-products and sugarcane bagasse, dehydrated at 30°C for four hours, ground, sieved through an 18-mesh filter, and sterilized at 121°C for 10 minutes. The samples were inoculated with an initial concentration of 1×10^5 spores/mL and incubated at 35°C for 12 days. All experiments were conducted in triplicate.

Spore counting was performed using the Neubauer chamber technique every two days. pH was determined using a 1g sample mixed with 10 mL of distilled water, filtered, and measured with a pH meter. The analysis of variance indicated that treatments with a higher coffee ratio (4.5:5.5, 6:4, 3:7, 0:10) achieved greater biomass production by the eighth day. The fermentation chamber maintained a controlled temperature of 35°C, validating its effectiveness in the process.

As a result, a final citric acid concentration of 0.91 g/mL and a spore count of 8.75×10^5 spores/mL were obtained. This study confirms that the use of sugarcane bagasse and coffee residues as substrates for solid-state fermentation with *A. niger* ITV-18 is a viable and efficient alternative for citric acid production.

INDICE

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	3
1.1 Productos agroindustriales en el estado de Veracruz	3
1.1.1 Generalidades del grano de café	3
1.1.2 Beneficio o proceso del café	5
1.2 Compuestos fenólicos	7
1.2.1 Extracción de compuestos fenólicos	9
1.3 Producción de la caña de azúcar	9
1.3.1 Procesamiento de caña de azúcar	11
1.4 Fermentación en estado sólido	12
1.4.1 Preparación del sustrato para la SSF	14
1.4.2 Componentes del sustrato	15
1.4.3 Celulosa	16
1.4.4 Hemicelulosa	16
1.4.5 Lignina	17
1.5 Fermentador en medio sólido	18
1.5.1 Tipos de biorreactores para sustrato sólido	18
1.5.2 Selección de biorreactor	19
1.6 Microorganismos en la fermentación en medio sólido	20
1.6.1 <i>Aspergillus niger</i>	20
1.7 LabView	22
1.8 Antecedentes	23
1.8.1 Avances	25
CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.1 Descripción de la metodología	28
2.2 Esterilización y acondicionamiento de la materia prima	29
2.3 Caracterización bromatológica del sustrato	30
2.3.1 Determinación de humedad	30
2.3.2 Determinación de pH	30
2.3.3 Determinación del contenido proteínas	31

2.3.4 Determinación del contenido de ceniza	31
2.3.5 Determinación del contenido de grasa	32
2.4 Microorganismo para la SSF	32
2.4.1 Activación de cepa e inóculo	32
2.4.2 Crecimiento celular	33
2.4.3 Porcentaje de acidez	33
2.4.4 Propagación y adaptación de la cepa	34
2.5 Extracción de componentes del sustrato	35
2.5.1 Rendimiento de extracción	37
2.6 Hidrólisis	37
2.7 Fermentación	38
2.7.1 Análisis de producto de la fermentación	39
2.8 Diseño de la cámara de fermentación	40
2.8.1 Adquisición de datos	42
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
3.1 Caracterización fisicoquímica	45
3.2 Adaptación de la cepa	46
3.3 Efecto del adicionamiento de nutrientes	48
3.4 Análisis de extracción de residuos	50
3.5 Extracción de polifenoles por Ultrasonido	52
3.6 Tratamiento con hidrólisis ácida	52
3.7 Fermentación	54
3.8 Validación de la cámara de fermentación	57
CONCLUSIONES	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1.1 Constitución física del grano de café	4
1.2 Etapas del beneficio del café	6
1.3 Estructura química de los principales compuestos fenólicos en el café	7
1.4 Estructura química de un tanino	8
1.5 Planta de la caña de azúcar	10
1.6 Estados productores de caña de azúcar	10
1.7 Etapas del proceso de fabricación de caña en azúcar	12
1.8 Representación del sistema de fermentación en estado sólido (SSF) (a) Arreglo de las partículas sólidas (b) Otro sistema que involucra crecimiento sobre sólido. (Mitchel <i>et al.</i> , 2006)	13
1.9 Componentes de la materia lignocelulósica (Carchi, 2014)	16
1.10 Estructura de la pared celular y microfibras de celulosa	16
1.11 Monómeros de lignina	17
1.12 Características de diseño básicas de los diversos biorreactores para la SSF	19
1.13 Diagrama de un reactor tipo charola	20
1.14 a) Conidióforos de <i>Aspergillus</i> b) Colonia de <i>A. niger</i>	21
1.15 Partes de un sistema de Adquisición de datos (DAQ)	23
2.1 Diagrama de flujo de la metodología seguida para el proceso la SSF por <i>A. niger</i> ITV 18	28
2.2 Residuos lignocelulósicos (a) bagazo de caña, (b) cascarilla de café, (c) pulpa de café	29
2.3 Muestras tratadas y almacenadas de residuos de café	29
2.4 a) Termo balanza Sartorius MA35 b) Potenciómetro Hanna Instruments	30
2.5 Digestión con ácido sulfúrico	31
2.6 <i>Aspergillus niger</i> ITV18 vista desde (a) caja Petri (b) microscopio, objetivo 40x	32
2.7 Cámara de Neubauer vista desde el microscopio 10X	33

2.8 Extracción de compuestos fenólicos por lixiviación	35
2.9 Extractos obtenidos por ultrasonido	36
2.10 Contenedor para muestras en microondas	36
2.11 Densímetro digital Anton Paar	37
2.12 Espectrofotómetro UV-vis	38
2.13 Curva blanco de ácido cítrico para el cálculo de concentración por espectrofotómetro	40
2.14 Cabina de acrílico, a) vista frontal b) vista interior	41
2.15 Módulo National Instruments para adquisición de datos	42
2.16 Interfaz de monitoreo de temperatura por LabView	43
3.1 Cinéticas de crecimiento de <i>A. niger</i> ITV18, en los sustratos en 12	46
3.2 Evolución del pH durante el crecimiento de <i>A. niger</i>	47
3.3 Valores de acidez de los sustratos a y b con adición de nutrientes	48
3.4 Análisis del efecto de la adición de nutrientes al porcentaje de acidez del sustrato	49
3.5 Interacción de las variables durante la evaluación de la adición de nutrientes	49
3.6 Identificación de a) flavonoides b) taninos	50
3.7 Extracciones de compuestos fenólicos	51
3.8 Curva de extracción de compuesto fenólicos por ultrasonido	52
3.9 Análisis de interacción de variables en la hidrólisis ácida	53
3.10 Análisis de efectos principales en hidrólisis ácidas	54
3.11 Efectos de las variables en la producción de ácido cítrico	55
3.12 Interacción entre las variables de la fermentación entre medio sólido por <i>A. niger</i>	56
3.13 a) Panel de adquisición de datos LabVIEW. b) Diagrama de bloques con LabView	57
3.14 Baño termostático	58
3.15 Crecimiento de la cepa <i>A. niger</i> ITV -18	58

LISTA DE TABLAS

Tabla	Pág.
1.1 Producción de café cereza por estado a nivel nacional 2012-1013	3
1.2 Composición de los granos de café tostado	5
1.3 Composición porcentual en residuos de café	7
1.4 Componentes del jugo de caña de azúcar	11
1.5 Aplicaciones de la fermentación en estado sólido (SSF)	14
1.6 Características microscópicas del <i>A. niger</i>	21
2.1 Diferentes porcentajes del sustrato para explorar su aplicación como soporte o nutriente	34
2.2 Composición del medio estándar para la caracterización de la cepa	34
2.3 Diseño experimental de hidrólisis ácida	38
2.4 Diseño de experimentos para fermentación	39
3.1 Composición porcentual en base seca del sustrato	45
3.2 Producción de ácido cítrico en los diferentes tratamientos de extracción	51
3.3 Resultados obtenidos de la hidrólisis ácida en el sustrato	53
3.4 Resultados obtenidos en la fermentación sólida por <i>A. niger</i>	55
3.5 Análisis de varianza por NCSS	56

INTRODUCCIÓN

El ácido cítrico es un compuesto orgánico de gran relevancia industrial, utilizado en la producción de alimentos, bebidas y productos farmacéuticos, así como en la industria cosmética y de limpieza. Su producción mediante fermentación ha cobrado especial importancia, dado que ofrece una alternativa sostenible y económicamente viable frente a métodos químicos. En este contexto, los residuos agroindustriales, como la pulpa de café y el bagazo de caña, se presentan como sustratos atractivos debido a su alta disponibilidad y valor nutricional.

La optimización de la producción de ácido cítrico se puede lograr a través de diversas estrategias, siendo el pretratamiento de sustratos uno de los factores críticos. En este trabajo, se evaluó la extracción de compuestos fenólicos mediante ultrasonido, un método conocido por su eficiencia en la ruptura de la matriz celular y la liberación de metabolitos beneficiosos. Se encontró que los sustratos extraídos por este método produjeron una mayor concentración de ácido cítrico, alcanzando un nivel de 0.73 mg/mL.

Este estudio tiene como objetivo hacer uso de nuevas tecnologías aplicadas a los residuos del café, a través de desarrollar condiciones idóneas de tratamiento. Por lo que en este trabajo se propone estudiar el efecto de las condiciones de la fermentación en estado sólido de residuos de café y bagazo de caña por *Aspergillus Niger*. tiene como objetivo explorar el impacto de la extracción por ultrasonido en la producción de ácido cítrico utilizando residuos lignocelulósicos, y proporcionar una base para el desarrollo de procesos de fermentación más eficientes y sostenibles. A través de una caracterización detallada de los sustratos y la evaluación de diferentes condiciones de fermentación, se busca contribuir al avance en la biotecnología aplicada a la producción de este importante metabolito.

CAPITULO 1

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 Productos agroindustriales en el estado de Veracruz

De acuerdo a la SAGARPA en el estado de Veracruz el 35 % de la población vive en el ámbito rural. Se estima que hay 350 mil productores activos y tienen los primeros lugares en la producción de cítricos, frutas, caña de azúcar, café, carne de bovino, cerdo y ave.

1.1.1 Generalidades del grano de café

El café es cultivado en clima tropical, producido por países en desarrollo siendo el principal rubro de exportación agrícola teniendo gran perspectiva de desarrollo en el mercado internacional. Actualmente destacan como productores de café, Honduras (50% de sus exportaciones de cafés, especiales u orgánicos), Perú (20% café orgánico), México (75%), Nicaragua (27%), Colombia (12%) y países africanos (OEEE, 2013).

El estado de Veracruz es el segundo mayor productor de café cereza a nivel nacional, como se muestra en la Tabla 1.1, generando gran cantidad de residuos, teniendo a la pulpa como el principal residuo sólido del beneficio húmedo del grano. (SAGARPA, 2013)

Tabla 1.1 Producción de café cereza por estado a nivel nacional 2012-2013

Entidad	Hectáreas sembradas	Hectáreas Cosechadas	Producción (Ton)	Valor Producción (Miles de Pesos)
Chiapas	259,315.74	253,752.79	499,105.16	2,508,647.98
Guerrero	47,190.50	47,160.50	41,784.20	284,106.31
Hidalgo	25,821.00	25,172.00	33,992.49	147,266.35
Jalisco	3,835.00	3,835.00	5,450.74	30,175.87
Nayarit	17,678.06	17,678.06	25,357.91	129,113.24
Oaxaca	142,766.07	138,236.08	129,756.01	481,807.71
Puebla	72,174.85	54,205.85	136,864.84	645,346.68
Veracruz	147,384.41	139,268.81	365,333.44	1,791,264.28

El café es una bebida que se obtiene de las semillas tostadas de las plantas del café o cafetos (*Coffea* spp). Los cafetos son arbustos de hoja perenne de la familia de las Rubiáceas, siendo las especies comerciales la arábica (*coffe arábica*) y robusta (*coffea canephora*) (Calle, 2011)

Cada fruto contiene dos granos de café, cada uno rodeado de una piel perfectamente adherida llamada piel de plata, rodeando a los dos granos aparece una segunda envoltura de color amarillento, esta vez más holgada, que recibe el nombre de pergamino, la piel más externa, de color rojizo, se conoce como cáscara, que junto con el pergamino, encierran entre medias una sustancia mucilaginosa que constituye la carne del fruto, denominada pulpa o mucílago, como se observa en la Figura 1.1 (Álvarez, 2010).

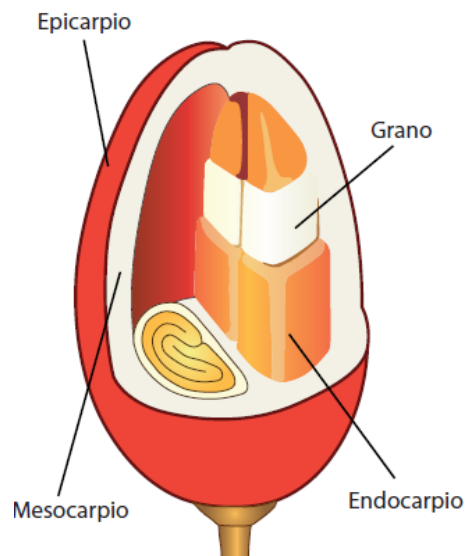


Figura 1.1 Constitución física del grano de café

Los granos de café poseen más de 2 000 sustancias diferentes (cafeína, minerales, lípidos, trigonelinas, aminoácidos proteínas, ácidos alifáticos, glicósidos y carbohidratos) de tal manera que el café no es solo cafeína (1, 3, 7-trimetilxantina) sin embargo, es el ingrediente farmacológicamente más activo.

Los granos de café crudos tienen una composición diferente entre la variedad Arábica y la Robusta, como se puede observar en la Tabla 1.2. La composición de los granos de café se altera de forma dramática por el proceso de tostado, y pierde gran cantidad de agua (posee apenas 1% a 5%), proteínas, ácidos clorogénicos y carbohidratos (Calle, 2001).

Tabla 1.2 Composición de los granos de café tostado

Componente	Variedad	
	Arábica	Robusta
Cafeína	1.3	2.4
Minerales	4.5	4.7
Lípidos	17.0	11.0
Trigonelinas	1.0	0.7
Proteínas	10	10
Ácidos alifáticos	2.4	2.5
Ácidos clorogénicos	2.7	3.1
Carbohidratos	38.0	41.5
Aromas volátiles	0.1	0.1
Melanoidinas	23.0	23.0

1.1.2 Beneficio o proceso del café

El conjunto de etapas o labores para transformar los frutos maduros de café en café almendra, constituye el proceso conocido como *beneficio del café* como se aprecia en la Figura 1.2. En México el procesado del fruto se realiza generalmente mediante el llamado “Beneficio Húmedo del Café”, donde se consumen grandes cantidades de agua y casi el 80 % del fruto se considera de poco o nulo valor económico y por consiguiente es considerado como un residuo.

El mucílago, así como las aguas del beneficio constituyen residuos de difícil manejo, generando una alta carga contaminante al ambiente. Por otra parte, la pulpa es el residuo de mayor volumen del proceso en vía húmeda, correspondiente al 40% del peso de la cereza. El grano de café seco está conformado por la almendra, la película plateada y la cascarilla o cisco (Mejía, 2010).



Figura 1.2 Etapas del beneficio del café

De las cerezas frescas solo se utiliza el 6%, siendo el 94% restante subproducto: 39% pulpa, 22% mucílago, 3% pergamino, 9.8% residuos de extracción, 20.4% agua y extractos volátiles, algunos componentes se muestran en la Tabla 1.3 (Nava, 2003).

Tabla 1.3 Composición porcentual en residuos de café

Componentes	Cascarilla	Pulpa	Granos usados
Taninos	4.5 - 5.4	1.8-2.4	1.2-1.5
Cafeína	0.8 - 1.1	0.5-0.7	0.02-0.08
Celulosa	13.2 -27.6	15.1-20.3	13.2-18.4
Proteínas	9.2 -11.3	8.5-12.1	10.3-12.2
Lípidos	2.0 - 2.3	1.5-2.0	15.2-17.9

Los granos de café que se utilizan en producción son primeramente limpiados para remover madera, hojas o algún otro tipo de materia extraña. La limpieza se realiza en un sistema de zarandas vibradoras. Luego de ser limpiados, pasan a ser almacenados en silos.

1.2 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles, son compuestos que poseen un anillo aromático, unido a uno o más grupos hidroxilo Figura 1.3 (González, 2010).

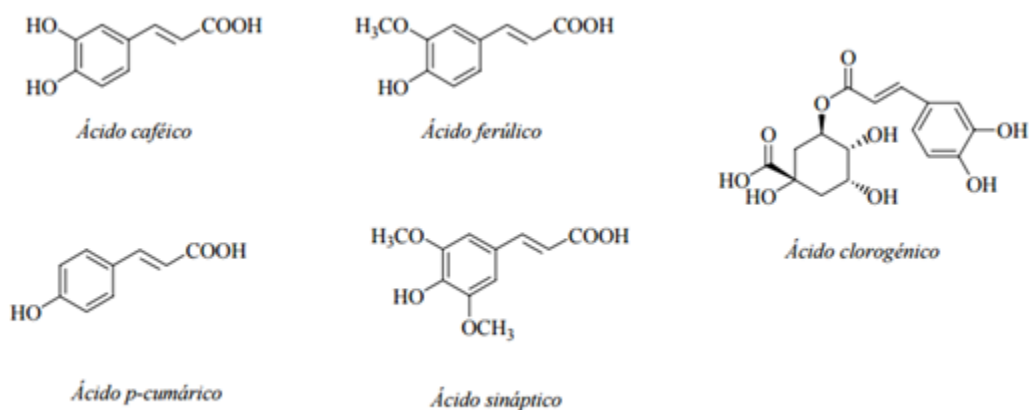


Figura 1.3 Estructura química de los principales compuestos fenólicos en el café

Los polifenoles presentes en productos alimenticios, se pueden clasificar en extraíbles y no extraíbles. Los extraíbles son compuestos de bajo peso molecular, los cuales se pueden extraer con disolventes acuosos y acuoso-orgánicos, por otro lado, los no extraíbles son compuestos con un elevado peso molecular, unidos a fibra o proteínas que se pueden encontrar en los residuos de las extracciones.

Los polifenoles extraíbles se pueden clasificar en función de su estructura química en ácidos fenólicos (como el caféico, el ferúlico, el p-cumárico y el sináptico), o esterificados (como el clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y criptoclorogénico), y flavonoides, estructuras mucho más complejas, que a su vez se subdividen en flavonas (crisina, rutina), flavonoles (quercetina, miricetina), flavanoles o catequinas (epicatequina, galato de epicatequina, epigallocatequina, galato de epigallocatequina), flavanonas (hesperidina, naringenina), antocianinas (delfinidina, malvidina, cianidina), taninos condensados con un número bajo de monómeros, etc.

Los polifenoles no extraíbles incluyen taninos hidrolizables y taninos condensados (Figura 1.4) con un elevado número de unidades en la cadena polimérica. (Larrea, 2012)

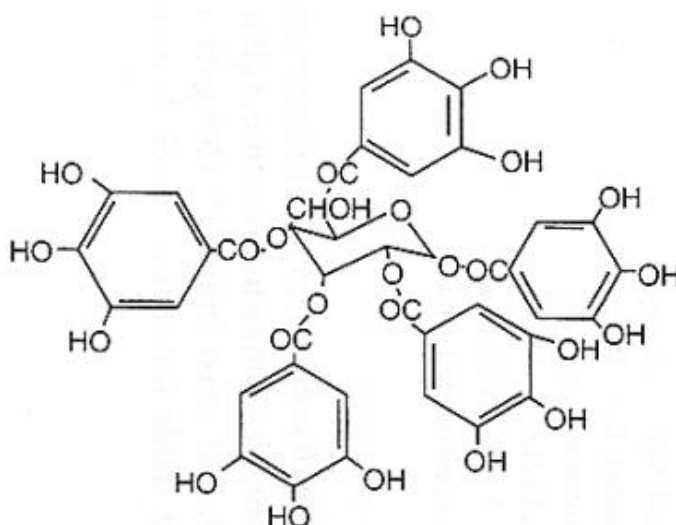


Figura 1. 4 Estructura química de un tanino

1.2.1 Extracción de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son sustancias que pueden extraerse con solventes volátiles. Las muestras secas y molidas se ponen en contacto con disolventes orgánicos como alcohol, cloroformo. Sin embargo, los solventes derivados del petróleo como éter, hexano propanol, acetatos de metilo y otros más, son tóxicos al contacto con la piel o al inhalarlos, siendo el alcohol una buena opción de disolvente.

El uso del microondas es otra alternativa para extraer compuestos fenólicos ya que ofrece ventajas, como es reducir considerablemente el tiempo y consumo de energía (Peredo *et al.*, 2009).

Por otro lado, el ultrasonido es una forma de energía mecánica de alta frecuencia, inaudible a los humanos. Estas vibraciones se desplazan en un medio material, produciendo la formación de burbujas o cavidades debido a la vaporización del fluido calentado por la disipación de la energía de la onda debido a la viscosidad (este es un fenómeno denominado *viscous heating*). La temperatura del fluido se incrementa causando la explosión de las burbujas, ya que la variación periódica de la presión de la onda de ultrasonido da lugar a una acción mecánica que agita y calienta a las burbujas, disminuyendo la tensión superficial y favoreciendo la solubilidad y penetración del solvente en el material vegetal arrastrando consigo los componentes activos por convección y difusión. El ultrasonido es una forma de extracción muy económica y simple, al menos a escala de laboratorio (Larrea, 2012).

1.3 Producción de la caña de azúcar

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una gramínea tropical, que acumula un jugo rico en sacarosa, que al ser extraído y cristalizado en el ingenio forma el azúcar (Figura 1.5).



Figura 1.5 Planta de la caña de azúcar

En el 2011 el estado de Veracruz sembró aproximadamente 264 mil hectáreas de caña de azúcar seguido por Jalisco, San Luis potosí y Oaxaca, como se muestra en la Figura 1.6 (SAGARPA, 2013). El bagazo de caña es el subproducto de la molienda de la caña de azúcar y representa entre 25 - 40% del total de masa de la materia procesada.

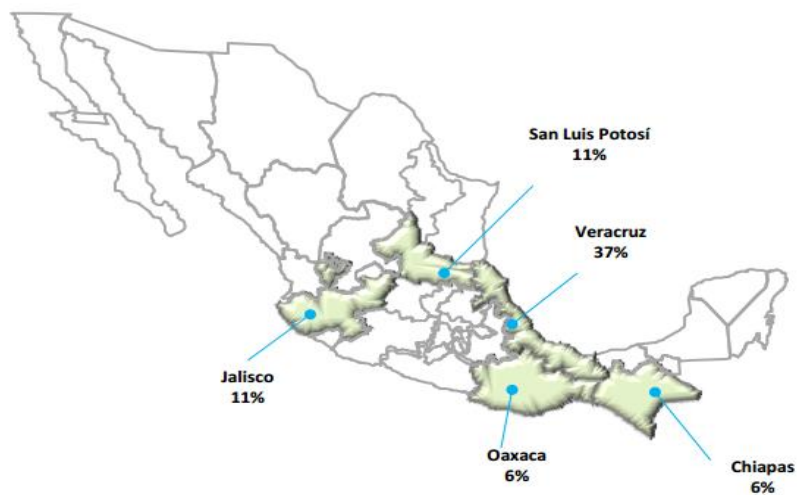


Figura 1.6 Estados productores de caña de azúcar

De acuerdo al informe por estados de la Zafra 2014/15, el estado de Veracruz se encuentra en el primer lugar como productor de azúcar. Se cosecharon 54 266 554 ton de caña de acuerdo a las cifras obtenidas de 52 ingenios en el país (Conadesuca, 2015).

El tronco de la caña de azúcar está compuesto por una parte sólida o fibra 11 al 16 % y, un aparte líquida o agua del 73 al 76 %, sacarosa 8 al 15 %. Algunos constituyentes del jugo de caña de azúcar se pueden observar en la Tabla 1.4. En el Ingenio, la sacarosa del jugo es cristalizada formando azúcar, mientras que la fibra constituye el bagazo, una vez molida la caña.

Tabla 1.4 Componentes del jugo de caña de azúcar

Sustancia	Composición (%)
Glucosa	0.2 – 0.6
Fructuosa	0.2 – 0.6
Sales	0.3 – 0.8
Ácidos orgánicos	0.1 – 0.8
Otros	0.3 – 0.8

El bagazo de caña es un material lignocelulósico constituido principalmente por 38-50% de celulosa, 17-32% de hemicelulosa. Debido a su alto contenido de carbohidratos y al bajo contenido de lignina, así como su disponibilidad, el bagazo puede ser considerado como un residuo agroindustrial con un alto potencial de azúcares fermentables (Chandler *et al.*, 2012).

1.3.1 Procesamiento de caña de azúcar

La cosecha de la caña de azúcar se realiza a los 13 meses de edad de la planta, cortándola de forma manual o mecanizada. La caña cosechada se transporta al Ingenio o fábrica donde se realizan una serie de operaciones unitarias (lavado, corte, compresión) para extraer el jugo, una vez obtenido se le realiza una desinfección y clarificación, pasando posteriormente por una evaporación, seguida de la cristalización y finalmente una centrifugación para poder obtener el producto final. Todo esto se ejemplifica en el diagrama de la Figura 1.7 (Ingenio San Carlos, 2015).

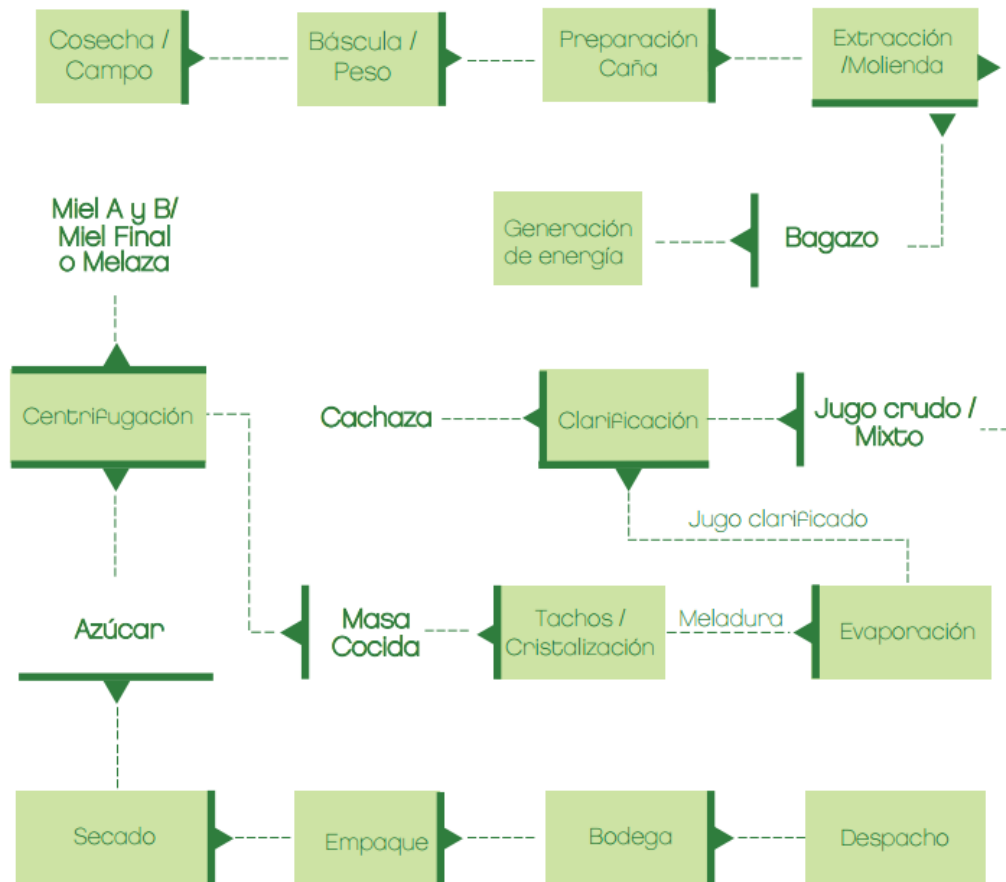


Figura 1.7 Etapas del proceso de fabricación de caña en azúcar

Teniendo como principal producto el azúcar, el bagazo de caña se genera como un subproducto de dicho proceso, siendo el de mayor volumen, el cual puede alcanzar entre un 26 % a un 29 % del peso de la caña molida. Este bagazo está constituido por agua, sólidos particulados y cantidades más pequeñas de sólidos solubles.

1.4 Fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido (SSF por sus siglas en ingles “solid-state fermentation”), consiste en el crecimiento de microorganismos sobre partículas sólidas húmedas, entre las cuales pasa un flujo de gas y hay un mínimo de agua, como se puede observar en la Figura 1.8.

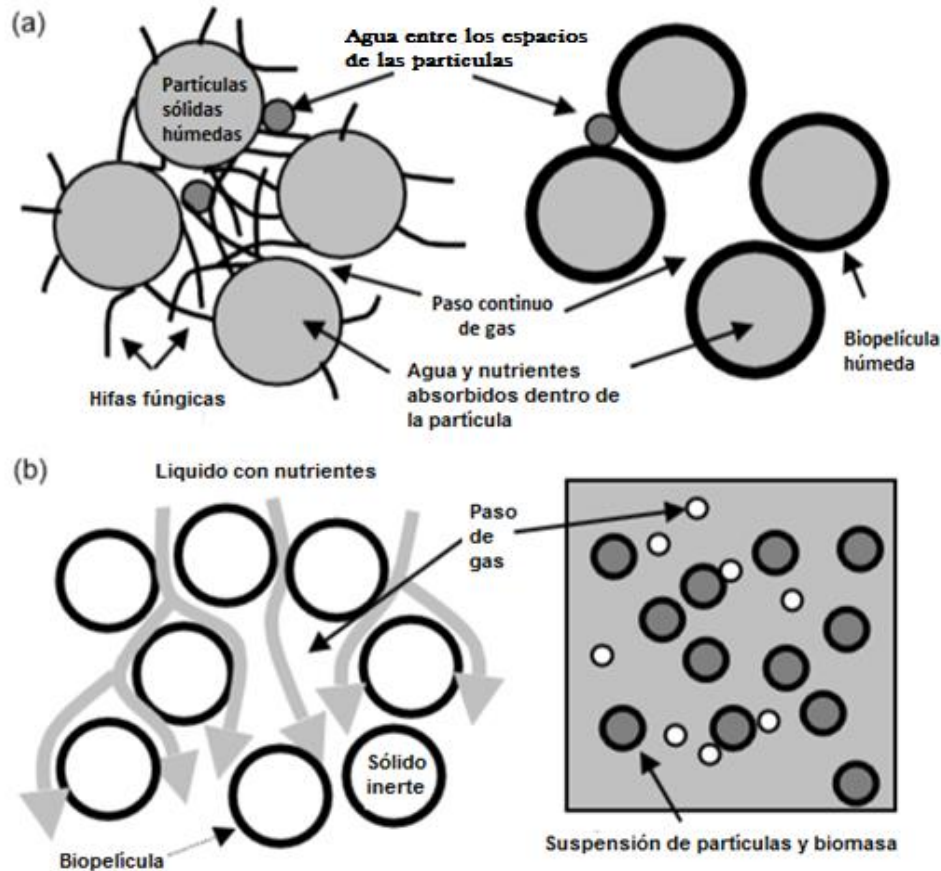


Figura 1.8 Representación del sistema de fermentación en estado sólido (SSF) (a) Arreglo de las partículas sólidas (b) Otro sistema que involucra crecimiento sobre sólido. (Mitchel *et al.*, 2006)

En la actualidad la fermentación en soporte sólido se usa con gran éxito en la producción de antibióticos, micotoxinas, surfactantes, ácidos orgánicos, compuestos aromáticos, pesticidas y enzimas (Tabla 1.5). Los sustratos utilizados en este tipo de fermentación son muy variados, destacándose cereales como trigo, centeno, arroz y maíz, también se usan desechos industriales, los cuales son considerados los mejores sustratos para la fermentación sólida. La aplicación de la SSF se ha concentrado en aumentar el valor agregado de estos residuos industriales (Pandey *et al.*, 2000).

Tabla 1.5 Aplicaciones de la fermentación en estado sólido (SSF)

Sector económico	Aplicación	Ejemplo
Industria alimentaria	Alimentos tradicionales	Koji, tempeh, quesos fermentados
	Producción de hongos	Agaricus y Pleurotus
	Aditivos alimenticios	Sabores y colorantes
Agricultura	Bioinsecticidas	
	Hormonas	
	Bioconversión de subproductos	Bagazo de caña y pulpa de café
Fermentación industrial	Enzimas	Amilasas, celulasas y proteasas
	Antibióticos	Penicilina
	Ácidos orgánicos	Ácido cítrico y fumárico

El mayor grupo de microorganismos usados en este tipo de fermentación son bacterias y hongos; estos últimos del tipo filamentosos son los más importantes, ideales y mejor adaptados (Torres, 2009), debido a sus características fisiológicas, bioquímicas y enzimáticas (Martínez, 2005).

1.4.1 Preparación del sustrato para la SSF

La selección del sustrato o soporte constituye un punto importante, en general partículas pequeñas proveen una mayor área superficial para la transferencia de calor e intercambio gaseoso. El soporte sobre el que se desarrollará el microorganismo de interés debe tener estas características: (1) Inertes, (2) Porosos con espacios libres disponibles, (3) Resistencia mecánica para ser empacados, (4) Capacidad de retención de agua y nutrientes solubles. Un sustrato crudo o natural no es adecuado para usarse directamente en la fermentación, requiere de una preparación o pre-tratamiento que puede consistir en la reducción del tamaño de partícula, complementación de nutrientes, ajuste del contenido de humedad o ajuste

de pH, cocimiento para la degradación de la estructura macromolecular o para la reducción de contaminantes. Aun lo anterior, se presentan serios problemas como consecuencia de la heterogeneidad del cultivo, el intercambio de calor o transferencia de oxígeno, en el control de gradientes de humedad, pH, nutrientes y producto. Por lo que es importante conocer el efecto de las variables ambientales en el desarrollo de un cultivo sobre un sustrato sólido.

Puede ser necesario tritura el sustrato o pre-tratarlo para aumentar la disponibilidad de nutrientes, adicionar suplementos nutricionales o agua. El soporte puede ser esterilizado fuera del biorreactor. Alternativamente, puede ser posible y preferible realizar este paso con el sustrato en el interior del biorreactor (Mitchel *et al.*, 2006).

1.4.2 Componentes del sustrato

Los sustratos generalmente contienen materiales orgánicos complejos (polisacáridos, proteínas, compuestos fenólicos, etc.). Estos materiales son propensos a transformarse por la acción del calor y pueden interactuar unos con otros para formar una gran variedad de productos. Es por esto que los materiales lignocelulósicos son los más utilizados en la fermentación en medio sólido.

La lignocelulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas y representa la fuente principal de materia orgánica renovable. La mayor parte de residuos lignocelulósicos son generados por prácticas agrícolas y forestales que se transforman en un problema ambiental (López *et al.*, 2006).

En general las paredes celulares de las plantas consisten en polisacáridos, compuestos fenólicos minoritarios (minerales, lípidos y proteínas, etc.). Los polisacáridos se clasifican en celulosa, hemicelulosa y lignina (Prinsen, 2010). La composición química de las fibras depende de su origen, pero de manera general entre 40-50 % corresponde a la Celulosa, de 10-30 % corresponde a la lignina y de 20 a 30 % hemicelulosa (Figura 1.9).

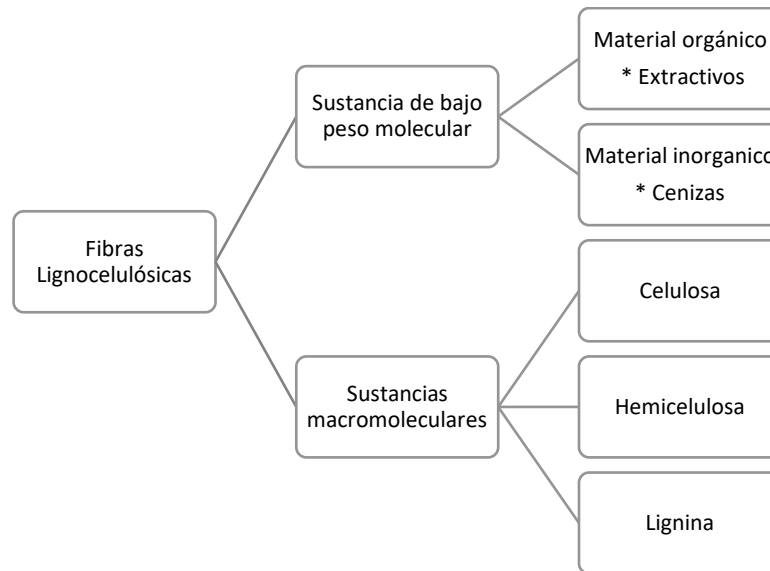


Figura 1.9 Componentes de la materia lignocelulósica (Carchi, 2014)

1.4.3 Celulosa

Los polímeros de la celulosa se presentan como estructuras ordenadas (fibras) y su función principal es asegurar la rigidez de la pared celular de la planta como se muestra en la Figura 1.10. (Pérez-Morales *et al.*, 2009)

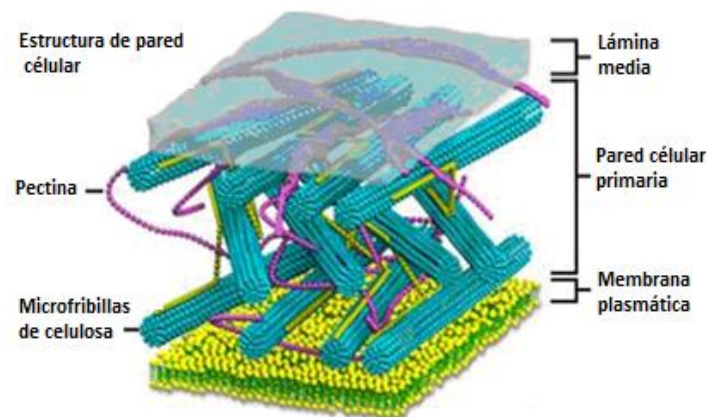


Figura 1.10 Estructura de la pared celular y microfibras de celulosa

1.4.4 Hemicelulosa

Está compuesta por diferentes grupos como pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (glucosas, manosa, galactosa), ácidos hexurónicos (ácidos glucurónico, metilglucurónico y galacturónico) y deocihexosas (ramnosa y fucosa). La cadena

principal de una poliosa puede consistir una sola unidad (homopolímero), como por ejemplo xilanos, o en dos o más unidades (heteropolímero), como los glucomananos. La naturaleza ramificada de la hemicelulosa la hace amorfa y más fácil de hidrolizar que la celulosa (Nogués *et al*, 2010).

La hemicelulosa tiene como función principal interactuar con la celulosa y lignina para proporcionar rigidez a la pared celular. Las cadenas de hemicelulosas se asocian con las microfibrillas de celulosa tras su carácter polar (puentes de hidrógeno). Su comportamiento físico-químico, principalmente su capacidad de enlace y su comportamiento visco-elástico, proporciona propiedades como grado de hinchamiento, hidratación, plasticidad, flexibilidad, rigidez, dureza, entre otras. (Prinsen, 2010).

1.4.5 Lignina

Después de la celulosa, la lignina es el polímero más abundante en el mundo vegetal y su función es proporcionar rigidez a la pared celular, asegurando protección contra la humedad, los agentes atmosféricos y el ataque de microorganismos, además de actuar como elemento de unión de fibras de celulosa (Figura 1.11). La lignina es un compuesto formado por un topo de moléculas distintas de los azúcares. Químicamente, es un polímero tridimensional amorfo, constituido a partir de unidades de fenilpropano que se unen entre sí por enlaces alquil-aril-éter o carbono-carbono.

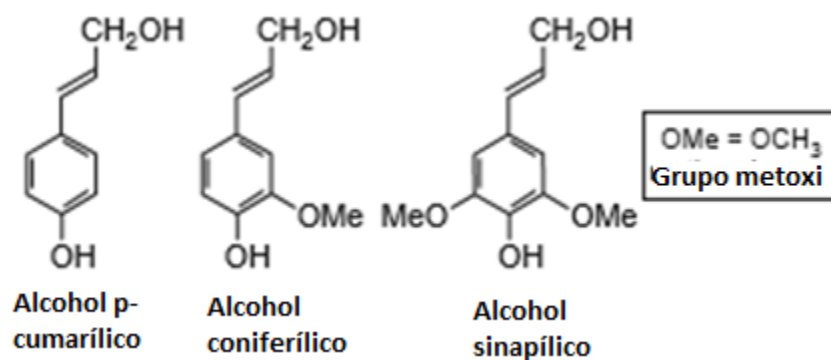


Figura 1.11 Monómeros de lignina

1.5 Fermentador en medio sólido

Los biorreactores en estado sólido son equipos utilizados para realizar cultivos, y también se les conoce como fermentadores. Es importante tener en cuenta que, para asegurar una transferencia eficiente de calor y oxígeno al sustrato, así como de las diversas variables necesarias para llevar a cabo el proceso de fermentación, el diseño debe ser tal que garantice la homogeneidad entre los diferentes componentes.

En los últimos años se han desarrollado diversos tipos de fermentadores en estado sólido, entre los tipos más estudiados han sido a nivel laboratorio (cajas Petri y matraces) y tipo bandeja, los cuales se utilizan por ser simples y no operan con agitación además de solo mantener controlada la temperatura. (Ruíz-Leza *et al.*, 2007)

1.5.1 Tipos de biorreactores para sustrato sólido

Los biorreactores se pueden clasificar en diversos grupos de acuerdo a su forma de mezclado y aeración, estos se pueden apreciar en la Figura 1.12, y se describen a continuación:

Grupo I. Consisten típicamente en una cámara que contiene bandejas individuales, apilados uno encima del otro, con orificios en el medio para el paso de aire debidamente acondicionado (es decir, con control de humedad y temperatura), el cual circula alrededor de las bandejas. Las bandejas pueden construirse de madera, bambú, metal o plástico. Normalmente están abiertos en la parte superior y tienen fondos perforados para aumentar la accesibilidad del oxígeno, aunque existen variantes en las cuales, por ejemplo, se usan bolsas de plástico micro-perforadas.

Grupo II. Biorreactores de lecho empacado, consiste en una columna cilíndrica o de sección transversal rectangular, orientada verticalmente, con una placa de base perforada en la parte inferior que soporta un lecho de sustrato. Se sopla aire a través de la placa base.

Grupo III. Biorreactores de tambor. Este tipo de reactor se llena parcialmente con un lecho de sustrato, y se sopla aire a través del espacio. En los reactores con agitación, el cuerpo del biorreactor permanece estacionario donde palas o rascadores montados sobre un eje central a lo largo giran dentro del tambor.

Grupo IV. Biorreactores mixtos. Hay varios tipos de diseño en este grupo Pueden funcionar con mezcla continua o discontinua. Biorreactores de lecho agitado son similares al lecho empacado, en ambos el sustrato se asienta sobre una placa de base perforada y se introduce aire con fuerza a través de la cama, pero en lugar de ser estático, se inserta un agitador y proporciona un mezclado continuo. (Mitchell *et al.*, 2000).

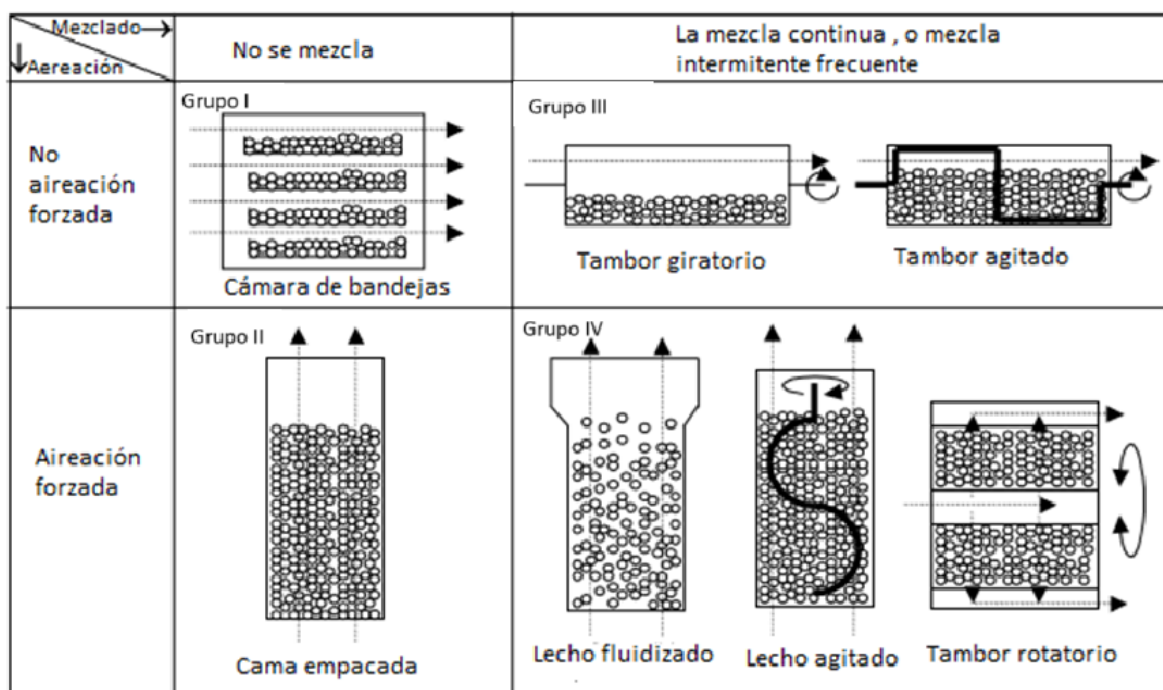


Figura 1.12 Características de diseño básicas de los diversos biorreactores para la SSF

1.5.2 Selección de biorreactor

En volúmenes pequeños es recomendable usar el reactor por charola, utilizando como bandejas materiales como bambú, madera, plásticos, y como cámara una incubadora o un cuarto monitoreado. Se puede utilizar agua como refrigerante y

puede haber partes para intercambio de calor. Algunas limitantes de este reactor pueden ser la altura del sustrato, debido a que no pueden exceder 5 cm de espesor, por consideraciones de la transferencia de calor y oxígeno como se observa la Figura 1.13. La limitación de espacio al aumentar el proceso, al querer aumentar la cantidad de sustrato se debe aumentar los tamaños de la charola y número de bandejas.

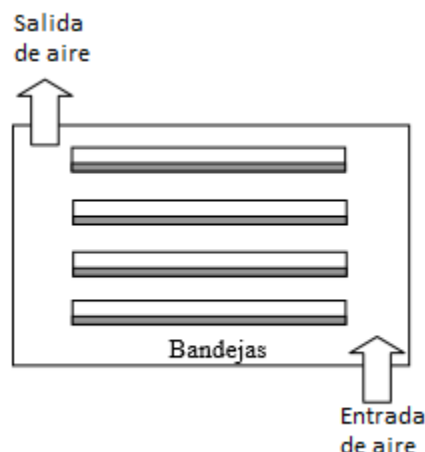


Figura 1.13 Diagrama de un reactor tipo charola

1.6 Microorganismos en la fermentación en medio sólido

Bacterias, levaduras y hongos pueden crecer en sustratos sólidos con aplicación en la SSF. Las bacterias se utilizan principalmente en composteo, ensilaje y algunos procesos de alimentos. Las levaduras pueden ser usadas en la producción de etanol y alimentos. Los hongos filamentosos es el grupo de microorganismo más importante usado en este tipo de procesos, debido a sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y enzimológicas (Martínez, 2005).

1.6.1 *Aspergillus niger*

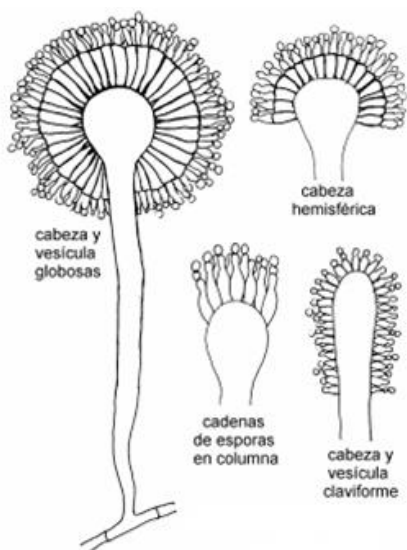
El *A. niger* se encuentra en el grupo de los *aspergilos* negros en la familia *moniliaceae*, orden *moniliales*, clase *hyphomycete*, *filum deutoromycota*. Sus características físicas (microscópicas) son cabezas conidiales de tonos negro a negro grisáceo, negro café, negro púrpura o negro carbón, son globosas, radiadas

o decididas formando columnas de cadenas de conidios irregulares o bien definidas como se puede apreciar en la Figura 1.14a (Sáez *et al.* 2002), las cuales se describen en la Tabla 1.6.

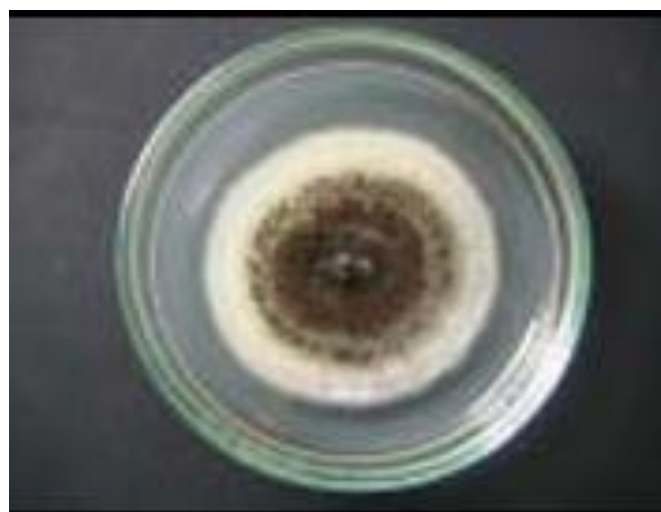
Tabla 1.6 Características microscópicas del *A. niger*

Estructura	Descripción
<i>Hifas</i>	Septadas, hialinas
<i>Conidióforo</i>	Pared lisa, hialinos, largos
<i>Vesícula</i>	Globosa grande, subesferica
<i>Fiálides</i>	Bisériadas
<i>Conidias</i>	Globosa negra, subesferica

Descripción macroscópica, son colonias al principio blancas y posteriormente negras, su textura es similar a la pimienta (Figura 1.14b), generalmente se siembra en Agar Papa Dextrosa (PDA) y Agar *Saboraud*.



a)



b)

Figura 1.14 a) Conidióforos de *Aspergillus* b) Colonia de *A. niger*

Es un agente patógeno productor de aspergilosis, causa comúnmente lesiones cavitarias en pulmones o senos paranasales. Genera alto porcentaje de casos de otomicosis. En pacientes inmunosuprimidos causa infecciones primarias cutáneas, pulmonares diseminadas (Ángel, 2006).

El *A. niger* presenta la capacidad de excretar enzimas aminolíticas para hidrolizar el almidón, hasta azúcares simples a partir de sustratos de bajo costo, tales como residuos agroindustriales (Bertsch *et al.* 2010). Es utilizado para la obtención de enzimas a nivel industrial, como la α -Amilasa, amiloglucosidasa, catalasa, celulasa, α -Galactosidasa, β -Galactosidasa, β -Gluconasa, glucoamilasa, glucosa aerodeshidrogenasa, glucosa oxidasa, α -glucosidasa, α -D-Glucosidasa, β -Glucosidasa, hemicelulasa, hesperidinas, invertasa, lipasa, pectinasa, pitasa, proteasa y tanasa (López *et al.*, 2006).

1.7 LabView

Es una plataforma de programación gráfica virtual que ayuda a ingenieros a escalar desde el diseño hasta pruebas y, desde sistemas pequeños a grandes. Ofrece integración de software y hardware al aprovechar la tecnología de la computación, ofreciendo herramientas para la resolución de problemas de control de variables. Al proporcionar las herramientas que se necesita para construir cualquier aplicación de medida o control en el menor tiempo.

El principal beneficio de desarrollar aplicaciones en **LabView**, es la naturaleza gráfica del lenguaje por lo cual se pueden solucionar los problemas dibujando un diagrama de bloques. En el programa se pueden ejecutar diversas tareas en paralelo, es decir realizar varias tareas al mismo tiempo, debido a los procesadores multinúcleo que hacen a esta una herramienta de programación favorable. **Flujo de datos** (en LabView) significa que en cualquier momento que el código posea una ramificación en un cable, o una secuencia paralela en el diagrama de bloques, el compilador subyacente trata de ejecutar el código en paralelo, debido a que el lenguaje gráfico se encarga en cierto grado del paralelismo. **Adquisición de datos** (DAQ) es el proceso de medir con una PC un fenómeno eléctrico o físico como

voltaje, corriente, temperatura, presión o sonido. Un sistema de adquisición consiste de sensores, hardware de medidas y una PC con software programable, como se observa en la Figura 1.15. Comparados con los sistemas de medidas tradicionales, los sistemas DAQ basados en PC aprovechan la potencia del procesamiento, la productividad, la visualización y las habilidades de conectividad de las PCs estándares en la industria proporcionando una solución de medidas más potente, flexible y rentable (National Instruments, 2015)



Figura 1.15 Partes de un sistema de Adquisición de datos (DAQ)

1.8 Antecedentes

Pandey *et al*, (2000) realizaron estudios para evaluar la viabilidad de la utilización de residuos de la industria del café, pulpa, cascarilla de café, hojas de café y café molido gastado como sustratos en la SSF para cultivar setas comestible de *Pleurotus*, ocho cepas de *Pleurotus ostreatus* y dos cepas de *Pleurotus sajor –caju* fueron seleccionados en un medio preparado a partir de extracto acuoso de la cáscara de café y agar. La SSF se llevó a cabo utilizando diferentes condiciones de humedad (45-75%). El contenido de humedad ideal para el crecimiento del micelio fue 60-65 % para la cascarilla de café, y 60-70 % para las hojas de café. La eficiencia biológica que indica la capacidad de fructificación del hongo para la utilización de sustrato, era mejor con la cascarilla de café, alcanza aproximadamente el 97 % después de 60 días. Cuando se utilizaron las hojas de café como el sustrato, no se observó ningún fructificación incluso en cultivo prolongado. Hubo una disminución significativa en los contenidos de cafeína y tanino (61 y 79 % respectivamente) de

la cascarilla de café después de 60 días. Los resultados mostraron la viabilidad de usar cascarilla de café como sustrato sin ningún tratamiento previo para el cultivo de hongos comestibles en fermentación sólida.

Brand *et al.* (2001), evaluaron la SSF en cascarilla de café mediante la degradación de la cafeína y los taninos presentes en ella. La fermentación se llevó a cabo por *A. niger* LPBx en un fermentador de columna de vidrio. El estudio cinético mostró que la degradación de los compuestos tóxicos se relaciona con el desarrollo de los microorganismos, su respiración y también para el consumo de los azúcares reductores presentes en la cáscara de café. Los mejores resultados en la degradación de la cafeína (90 %) y taninos (57 %) se lograron cuando la SSF se llevó a cabo con una tasa de aireación 30 mL/minuto usando cascarilla de café con un contenido de humedad inicial 55 %. La tasa de inoculación no afectó a la metabolización de los compuestos tóxicos por el cultivo de hongos. Después de la fermentación el contenido de proteína de la cascarilla se incrementó a 10.6 %, lo que era más del doble que la de la cáscara sin fermentar (5.2 %).

Gualtieri *et al.* (2007), usaron pulpa de café como sustrato para SSF con levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis*). Realizando una hidrólisis ácida de 120 a 240 minutos con soluciones de ácido sulfúrico al 1, 2 y 3% en una relación 1/10 (peso de pulpa seca/volumen de ácido). La fermentación se realizó a una temperatura de 30 °C, un pH de 4.5, con agitación y suministro de oxígeno por 8 h. Concluyendo que la hidrólisis química del residuo de la pulpa de café con ácido sulfúrico al 2% permite obtener azúcares fermentables por la *S. cerevisiae* y *Candida utilis*. Obteniendo biomasa de levaduras, con rendimientos y productividades comparables con valores reportados en la literatura.

Orozco *et al.*, (2008), utilizó *Streptomyces* para mejorar el valor nutricional de los residuos de pulpa de café en la SSF., que se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 500 ml contienen 3 y 0.5 g de pulpa de café y yuca respectivamente. Se inoculó con 10 ml del inóculo obtenido previamente para conseguir un 60-70 % de humedad. Los cultivos se incubaron durante 10 días. La pulpa de café contiene una alta cantidad de polímeros polifenólicos (por ej., taninos, lignina y ácidos clorogénicos),

así como hidratos de carbono, cafeína y cenizas. La reducción en contenido de estos compuestos fue más notable en pulpas de café transformadas por las cepas de *S. chattanoogensis*. Estos resultados pueden atribuirse a la producción de actividad de las enzimas oxidativas tales como las lacasas por las cepas ensayadas.

Pérez-Morales *et al.* (2009), obtuvieron enzimas de *Feruloil esterasa* por medio de fermentación sólida de pulpa de café usando una cepa de *Aspergillus tamarii* V12307, adicionando como medio de cultivo maltosa, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, tartrato de amonio, y KH_2PO_4 en diferentes porcentajes. Teniendo como resultado en la adición del medio de cultivo al 50% un mayor crecimiento de enzimas.

1.8.1 Avances

Matute *et al.* (2012), Realizaron una evaluación amilolítica de *A. niger* y trigo como sustrato base, en fermentación en estado sólido y sumergido, adicionando pasta de trigo húmeda, residuos de papas, almidón soluble y celulosas microcristalinas, usando concentraciones de 50 g/L. la fermentación se llevó a cabo a 37 °C con agitación de 300 rpm durante 64 horas para la fermentación sumergida y con una aireación de 2 vvm. Obteniendo mejores resultados con la fermentación en estado sólido, ofreciendo mayores ventajas en obtención de α -Amilasa y las glucoamilasas.

Aguilar-Navarro *et al.* (2014), Estudiaron el proceso de fermentación sólida con el hongo *Aspergillus niger* sobre los residuos del proceso de obtención de aceite de higuera. La fermentación se realizó en matraces Erlenmeyers de 250 mL de capacidad con 10 y 8 g de cascarilla y torta, respectivamente; se adicionaron 0.4 mL de inóculo en cada experiencia, lo que representó 2×10^7 esp/mL y el agua estéril necesaria para alcanzar el porcentaje de humedad requerido en cada caso. Durante nueve días a temperatura ambiente (28-33 °C). los resultados obtenidos en el proceso fermentativo, se observó que la cascarilla es el sustrato más apropiado para el enriquecimiento proteico mediante FES, debido a su estructura fibrosa y porosa, lo cual facilita la retención del agua (hasta aproximadamente el 50 %) y evita

la compactación, aspectos estos de crucial importancia para el crecimiento del microorganismo.

La composición química de la cascarilla es comparable con las de las cáscaras de maní, cacao y café, reportándose para este tipo de material diferentes procesos fermentativos, entre ellos, el enriquecimiento proteico y la obtención de setas comestibles.

CAPITULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Descripción de la metodología

El desarrollo experimental comprende varias etapas representadas en la Figura 2.1, en el eje central es la fermentación desde el sustrato, pretratamiento y generación de la biomasa. A la derecha desde el microorganismo hasta la generación de nutrientes. En tanto que a la izquierda diseño del prototipo de fermentador de medio sólido.

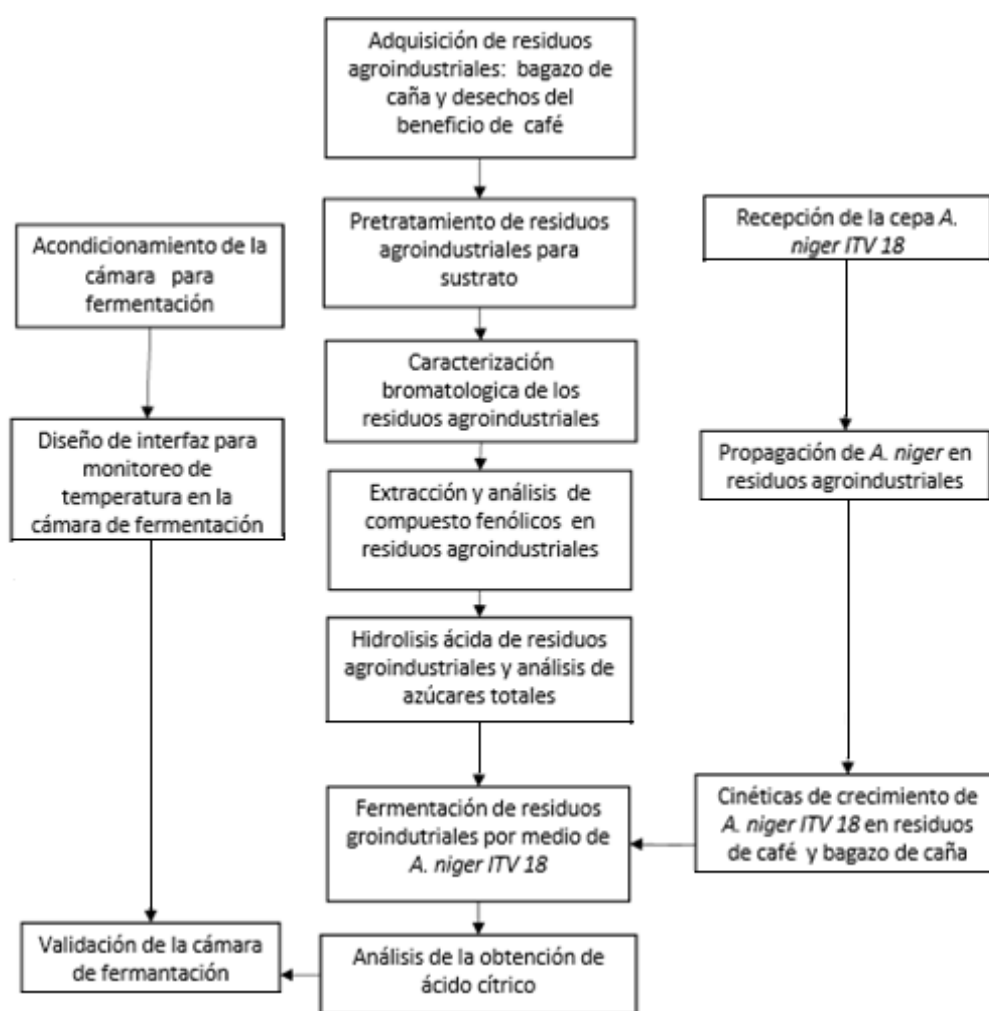


Figura 2.1 Diagrama de flujo de la metodología seguida para el proceso la SSF por *A. niger* ITV 18

2.2 Esterilización y acondicionamiento de la materia prima

Los residuos lignocelulósicos utilizados como sustratos para SSF son bagazo de caña, pulpa y cascarilla de café (Figura 2.2). Antes de realizar la caracterización de las muestras son pre-tratadas, mediante secado solar por 4 h, 30°C. Las muestras deshidratadas son trituradas en un molino manual y tamizada a malla 16 (1.18 mm).



Figura 2.2 Residuos lignocelulósicos (a) bagazo de caña, (b) cascarilla de café, (c) pulpa de café

Las muestras de residuos son esterilizadas en autoclave a 121 °C durante 10 min y se empacan al vacío en bolsas de polietileno para preservarlas (Figura 2.3).



Figura 2.3 Muestras tratadas y almacenadas de residuos de café

2.3 Caracterización bromatológica del sustrato

2.3.1 Determinación de humedad

El contenido de humedad del sustrato se determinó mediante una termo balanza Sartorius MA35 mostrada en la Figura 2.4 (a), para una muestra $<1\text{g}$. A la vez se determinó en forma analítica por el método de peso constante en una estufa por la Norma AOAC 925.10, fundamentándose en la diferencia de peso inicial y final.

2.3.2 Determinación de pH

Es una medida de acidez o alcalinidad en el sustrato. También denominado pH, que compara la actividad de iones hidrogeno expresada en log base 10. De acuerdo con la norma NOM-F-317-S-1978. Se utilizaron 2 g de muestra y es mezclada con 100 mL de agua destilada, posteriormente es filtrada para separar las partículas sólidas y realizar la medición sobre la muestra liquida, con un potenciómetro Hanna Instruments mostrado en la Figura 2.4 b).



a)



b)

Figura 2.4 a) Termo balanza Sartorius MA35 b) Potenciómetro Hanna Instruments

2.3.3 Determinación del contenido proteínas

Aplicando el método Kjeldahl, bajo la NMX-F-068- S-1980 que consiste en tomar 1 g de sustrato (bagazo de cañar, cascarilla y pulpa de café) se basa en la descomposición de los compuestos de nitrógeno orgánico por ebullición con ácido sulfúrico como se muestra en la Figura 2.5. El hidrógeno y carbón de la materia orgánica se oxidan para formar agua y dióxido de carbono. El ácido sulfúrico se transforma en SO_2 , el cual reduce el material nitrogenado a sulfato de amonio.

El amoniaco se libera después de la adición de hidróxido de sodio y se destila recibiendo en una disolución al 2% de ácido bórico. Se titula el nitrógeno amoniacal con una disolución valorada de ácido, cuya normalidad depende de la cantidad de nitrógeno que contenga la muestra. En este método de Kjeldahl-Gunning se usa el sulfato de cobre como catalizador y el sulfato de sodio para aumentar la temperatura de la mezcla y acelerar la digestión.



Figura 2.5 Digestión con ácido sulfúrico

2.3.4 Determinación del contenido de ceniza

El contenido de cenizas en un material está definido como residuo inorgánico que resta después de incinerar el sustrato por el método oficial de la AOAC 923.03. Consiste en muestrear 3 g de sustrato utilizando crisoles, previamente tarados e

incinerar en una mufla Thermo Scientific, determinando el contenido de ceniza con la ecuación (2.1).

$$\% \text{ Ceniza} = \frac{\text{peso final del crisol} - \text{peso inicial del crisol}}{\text{peso de la muestra}} \times 100 \quad (2.1)$$

2.3.5 Determinación del contenido de grasa

Se determinó el extracto etéreo (ácidos grasos) por el método Soxhlet, utilizando un sistema de extracción cíclica de los componentes solubles en éter que se encuentran en el sustrato, siguiendo la NMX-F-089-S-1978 Soxhlet.

Para realizar el cálculo del porcentaje de extracto graso, se utiliza la ecuación (2.2):

$$\% \text{ de Extracto Etéreo} = \frac{\text{Peso final del matraz} - \text{peso inicial del matraz}}{\text{Muestra}} \times 100 \quad (2.2)$$

2.4 Microorganismo para la SSF

2.4.1 Activación de cepa e inóculo

La cepa de *Aspergillus niger* ITV18 proporcionada por el Instituto Tecnológico de Veracruz (Figura 2.6) fue activada y sembrada por el método de estriado en Agar Papa Dextrosa (PDA), cultivada a 35 °C en una incubadora orbital INO-450 M.

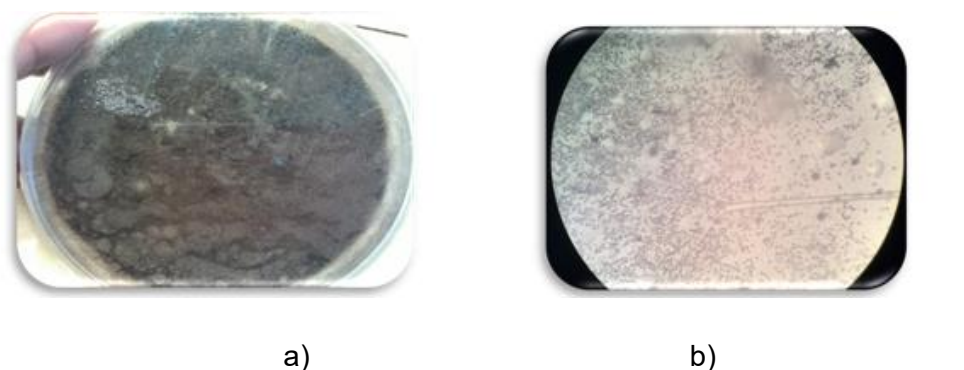


Figura 2.6 *Aspergillus niger* ITV18 vista desde (a) caja Petri (b) microscopio, objetivo 40x

Las esporas de *A. niger* se recolectaron con ayuda de un agitador magnético adicionando 10 mL de una solución de Tween 80 al 0.01%.

2.4.2 Crecimiento celular

En el conteo de esporas se utilizó la cámara de Neubauer, con ayuda del microscopio tipo binocular modelo N-117M marca Viresa, se observó que no hubiera presencia de algún microorganismo ajeno (Figura 2.7).

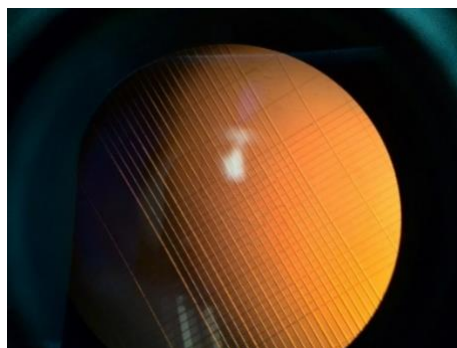


Figura 2.7 Cámara de Neubauer vista desde el microscopio 10X

Se realizó el conteo de esporas en 5 cuadros de acuerdo a la técnica de la cámara, posteriormente se calculó la concentración con la Ecuación 2.3

$$concentración = \frac{\text{número de células}}{\text{número de cuadros}} \times 10^4 \quad (2.3)$$

2.4.3 Porcentaje de acidez

La determinación de acidez se analizó titulando con NaOH al 0.1 N, teniendo como indicador 3 gotas de fenolftaleína al 10%, hasta observar el *vire* utilizando la Ecuación 2.4.

$$\% \text{ acidez} = \frac{ml * N * meq * 100}{alícuota} \quad (2.4)$$

Dónde: mL son los mililitros gastados de NaOH, N es la normalidad del NaOH, meq es el miliequivalente del ácido cítrico y la Alícuota es la muestra tomada.

2.4.4 Propagación y adaptación de la cepa

En la adaptación de la cepa, se usaron 6 combinaciones diferentes del sustrato con base en 10 g, estas proporciones se muestran en la Tabla 2.1 a 35 °C, con una concentración inicial de esporas de 1×10^5 esporas/mL. Para el monitoreo del crecimiento celular se utiliza la técnica de la cámara de Neubauer, y evolución del pH.

Tabla 2.1 Diferentes porcentajes del sustrato para explorar su aplicación como soporte o nutriente

Sustrato (%)	Número de muestra					
	1	2	3	4	5	6
Cascarilla o pulpa de café	50	90	60	100	0	3
Bagazo de caña	50	10	40	0	100	70

De acuerdo con la metodología propuesta por Sáez *et al.*, 2012, para conocer el desarrollo y crecimiento en un medio estándar, con base en almidón y sacarosa, se adicionan sales minerales de acuerdo a la Tabla 2.2

Tabla 2 2 Composición del medio estándar para la caracterización de la cepa

Medio	Muestra (g)		
	1	2	3
<i>Almidón</i>	10	50	100
<i>Sacarosa</i>	190	150	100
<i>KH₂PO₄</i>	1	1	1
<i>MgSO₄ · 7H₂O</i>	0.3	0.3	0.3

2.5 Extracción de componentes del sustrato

La formulación del sustrato para una masa de 10 g de la relación café:bagazo de caña son 60:40 y, 50:50 p/p pretratados para eliminar los componentes que puedan inhibir el crecimiento microbiano según lo reportado por Ramírez-Coronel *et al.*, 2004. Se realizaron extracciones con 100 ml de solvente con mezcla de metanol:agua (80:20), adicionando ácido acético al 0.5 % para obtener un pH ácido por 20 min., a 45 °C, y aplicando un tipo de extracción: calentamiento convectivo, ultrasónico o microondas todas las pruebas se realizaron por triplicado.

El primer tratamiento se realizó aplicando convección forzada, también conocido por lixiviación, utilizando una placa caliente que se mantiene a 45 °C (debido al bajo punto de ebullición del alcohol $\pm 65^{\circ}\text{C}$), y por sus características inflamables, con agitación constante por 20 min, posteriormente se hizo pasar por papel filtro, mostrado en la Figura 2.8.



Figura 2.8 Extracción de compuestos fenólicos por lixiviación

Para el segundo método de extracción se utilizó un equipo ultrasónico Cole Parmer, que trabaja con una frecuencia de 40 kHz, para esto se preparó la muestra

introduciendo el sustrato y el solvente en tubos de plástico (ver Figura 2.9), para posteriormente someter durante 20 min al baño sónico.

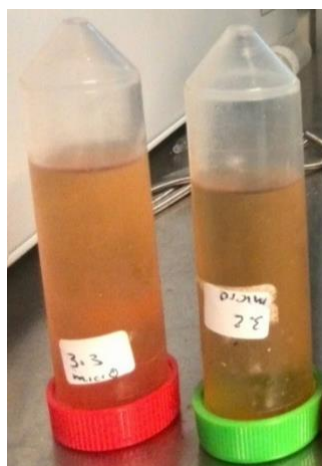


Figura 2.9 Extractos obtenidos por ultrasonido

Se utilizó finalmente un microondas comercial marca Daewoo, para realizar la extracción de compuesto polifenólicos en residuos de café (pulpa y cascarilla). Se generó un gradiente de temperatura de 45 a 60 °C en el contenedor, dada la fricción molecular que se genera en la muestra.

La técnica se montó utilizando un recipiente especial para digestión por microondas (Figura 2.10), el cual se sometió durante 2 min con una potencia de 360 Watts.



Figura 2.10 Contenedor para muestras en microondas

2.5.1 Rendimiento de extracción

Los niveles de concentración en los diferentes extractos fueron determinados por densidad, utilizando un densímetro digital marca Anton Paar (Figura 2.11), para medir el arrastre de extractos sobre el blanco (metanol-agua). Todas las muestras se llevan a temperatura de laboratorio 25 °C.

Utilizando únicamente 3 ml de cada muestra, se hace pasar por el módulo de medición de densidad DMA 4500 ME determinando la concentración o densidad de un líquido.



Figura 2.11 Densímetro digital Anton Paar

2.6 Hidrolisis

A cada 10 g de muestra se le adiciona, una solución de ácido sulfúrico a 3 diferentes concentraciones, de igual manera manejando tres diferentes relaciones ácido-sustrato, con la finalidad de obtener el mejor resultado. Al final de cada hidrólisis se determinan azúcares totales por el método Fenol-Sulfúrico, se filtró cada muestra y del sobrenadante se trató para posteriormente valorarlo en un espectrofotómetro UV-vis a 490 nm de Thermo Scientific, (Figura 2.12).



Figura 2.12 Espectrofotómetro UV-vis

Se ensayan los experimentos de acuerdo a la Tabla 2.3 donde se muestran como variables el porcentaje de solución de ácido sulfúrico en concentraciones 1, 2 y 3% V/V, y una relación sustrato-ácido de 1:3, 1:5 y 1:10 p/V.

Tabla 2.3 Diseño experimental de hidrólisis ácida

Experimento	Sol. de Ácido Sulfúrico (%)	Sustrato:Ácido
1	1	1:3
2	1	1:5
3	1	1:10
4	2	1:3
5	2	1:5
6	2	1:10
7	3	1:3
8	3	1:5
9	3	1:10

De los resultados obtenido se replicó el mejor desde el proceso hasta la fermentación.

2.7 Fermentación

Se utilizó un diseño experimental de 3 factores, con dos niveles cada uno, teniendo como variable de respuesta la concentración de ácido cítrico, por lo cual se

codificaron los experimentos como se muestran en la Tabla 2.4, con un total de 8 experimentos.

Planteando como variables dos concentraciones del sustrato de 70:30 y, 50:50 p/p café:bagazo de caña, realizando extracción de compuestos fenólicos; si (1), no (0), la realización de hidrólisis; si (1), no (0).

Tabla 2.4 Diseño de experimentos para fermentación

Experimento	Concentración	Extracción	Hidrólisis
1	1	1	1
2	1	1	0
3	1	0	1
4	1	0	0
5	2	1	1
6	2	1	0
7	2	0	1
8	2	0	0

Los sustratos, fueron esterilizadas a 121 °C durante 10 min, posteriormente se les adicionaron 10 mL de una solución mineral: sacarosa 190 g/L, 1 g/L de KH_2PO_4 , 0.3 g/L de MgSO_4 , se les ajustó a una humedad de 50-55 %, inoculadas a 1×10^5 esporas/mL e incubadas a 35 °C, durante 5 días.

2.7.1 Análisis de producto de la fermentación

Al finalizar la fermentación se extrajeron los productos obtenidos mediante el *A. niger*, para esto se realiza un filtrado de la muestra y éste se trata con 8mL de piridina y 1 mL de anhídrido acético por cada tubo con 1 mL de extracto, formando con el ácido cítrico un compuesto de color amarillo, el color obtenido se mide por espectrofotometría a 418 nm, por el método de Saffran – Densted.

En tanto la cuantificación de la producción de ácido cítrico se obtuvo una curva de calibración y que se utilizará para realizar el cálculo del producto final, esta se hizo al hacer una dilución de una solución de 400 mg de ácido cítrico en 1000 mL de agua destilada, de la solución anterior se realizaron diluciones de contengan 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mL de la solución de ácido cítrico (Figura 2.12).

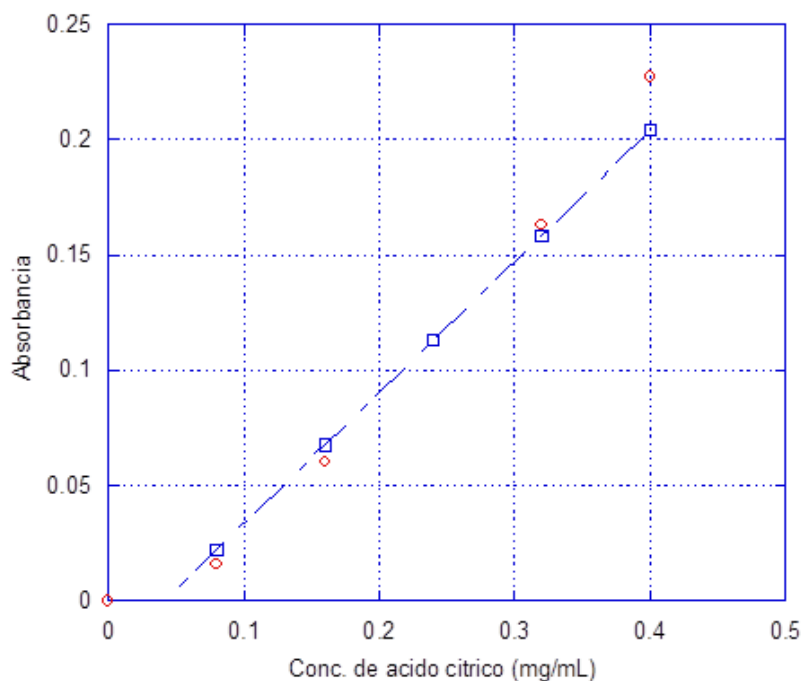


Figura 2.13 Curva blanco de ácido cítrico para el cálculo de concentración por espectrofotómetro

Con lo cual se ajustó a un polinomio de primer grado

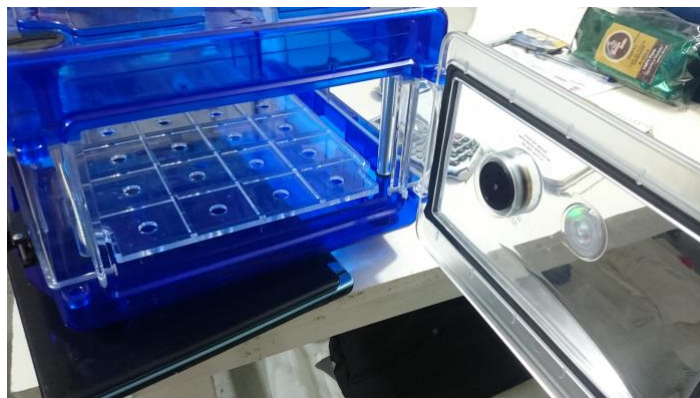
$$y = 0.57x - 0.02 \text{ con } R^2 = 0.93$$

Al obtener el ajuste de la curva se puede calcular la concentración final de ácido cítrico, en esta ecuación el valor de y representa el valor de longitud de onda (nm), mientras que el valor de x representa la concentración (mg/mL).

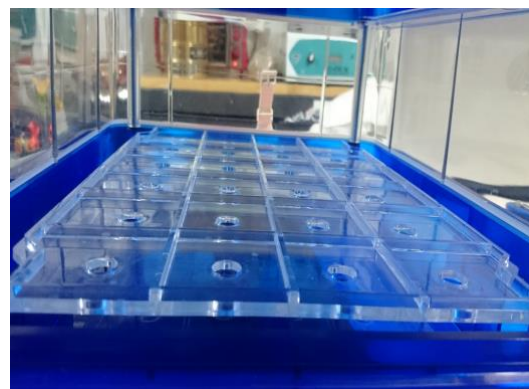
2.8 Diseño de la cámara de fermentación

De acuerdo a las condiciones de la fermentación a nivel caja Petri e incubadora y las variables a trabajar, se optó por utilizar un reactor tipo charola, de paredes de acrílico, el cual es inerte ante agente microbiológicos, siendo resistente a las variables de humedad y temperatura. Como cámara del reactor se utilizó una cabina de desecador que se muestra en la Figura 2.14, con las dimensiones de 37 cm de largo y 30 cm de ancho, para una altura de 30 cm. A la entrada de la cámara las

dimensiones son 10 x 22 cm, lo cual reduce el espacio disponible para introducir las charolas para colocar sustrato a fermentar.



a)



b)

Figura 2.14 Cabina de acrílico, a) vista frontal b) vista interior

Dentro de ésta se colocaron sensores para monitorear y ajustar las variables de temperatura y humedad. Para esto se introduce aire húmedo el exterior, previamente esterilizado, por medio de 2 filtros colocados en paralelo y utilizando una bomba para pecera.

La temperatura del aire fue controlada por un baño termostático, introduciendo los filtros de aire en el agua a una temperatura de 40 °C, de esta manera se crea una atmosfera húmeda con temperatura aproximada de ± 35 °C en la cabina. Se hicieron modificaciones a la cámara de fermentación para colocar 2 charolas de acrílico, las cuales sostienen el sustrato y son perforados para facilitar el flujo de aire a través de ellos. Cada charola tiene un área 20 x 20 cm, soportando aproximadamente 20 g de muestra estéril debido a su fácil montaje

2.8.1 Adquisición de datos

La adquisición de datos se realiza por medio de un módulo de entrada de termopares NI-9211 de National Instruments, conectado a un chasis NI-cDA 9172, usando un termopar tipo J, como se muestran en la Figura 2.15. El conjunto se conecta a un equipo de cómputo para el monitoreo de temperatura.



Figura 2.15 Módulo National Instruments para adquisición de datos

Se realizó un panel en el programa LabView, el cual registra en tiempo real la temperatura de la cámara de fermentación como se muestra en la Figura 2.16. Estos datos se almacenan en la memoria del programa y pueden ser recuperados en forma gráfica al finalizar el proceso.

En la interfaz se colocó un botón indicador, el cual se enciende al sobrepasar la temperatura indicada, esto con la finalidad de regular y mantener el rango establecido de temperatura.

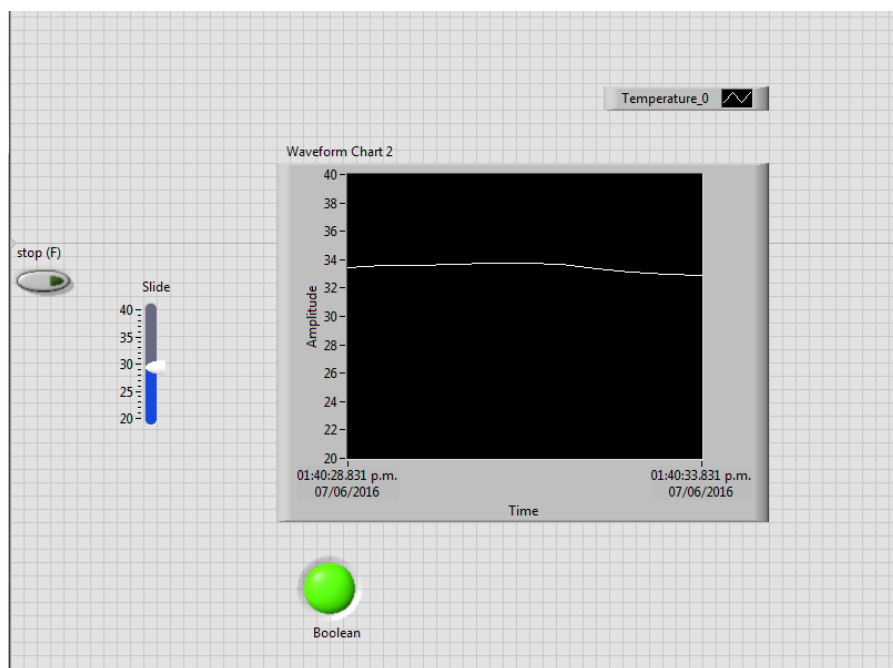


Figura 2.16 Interfaz de monitoreo de temperatura por LabView

Se realizó la calibración del termopar y se comprobó el funcionamiento del programa realizado, estableciendo un rango de 20 a 40 °C

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización fisicoquímica

El análisis fisicoquímico realizado en las muestras arrojó los resultados mostrados en la Tabla 3.1, dicho análisis se realizó en base seca, es decir, que las muestras habían sido deshidratadas previamente.

Debido al origen de los residuos de café del beneficio húmedo, presentaban un alto contenido de agua que influye en el porcentaje de humedad de las muestras tratadas.

Tabla 3.1 Composición porcentual en base seca del sustrato

Muestra	Humedad (%)	pH	Ceniza (%)	Proteína (%)	Grasas (%)
Pulpa de café	22.1	3.72	6.25	10.03	1.06
Cascarilla de café	10.84	4.54	3.56	9.56	0.74
Bagazo de caña	9.54	5.93	8.05	0.94	0.25

La pulpa de café presentó el valor más alto de humedad debido a su procedencia, mientras que el bagazo de caña al presentar grandes contenidos de azúcares se conservó con una humedad menor al 10%, dado que es fácilmente atacado por microorganismos ajenos en valores más altos al contenido de humedad. Un porcentaje de humedad bajo ayuda a cuidar la inocuidad del sustrato mientras no se utiliza e ideal para almacenamiento. Por otro lado, el pH ácido favorece la obtención de ácido cítrico para la cepa.

Los resultados de la caracterización se reflejan durante la fermentación, dado que los residuos de café tienen 50% más humedad que los residuos de caña de azúcar, esto favorece la propagación de la cepa de *A. niger*, el nivel de proteína dentro de los residuos de café son una gran influencia en la composición final del sustrato en la fermentación sólida.

3.2 Adaptación de la cepa

Se realizaron ensayos preliminares con los sustratos a fermentar para observar el crecimiento de la cepa, y valorar su adaptación a estos residuos lignocelulósicos. Por lo que, se graficó el crecimiento celular (Figura 3.1) durante 12 días, tomando muestras cada 2 días sin adicionarle ningún tipo de nutriente, es decir de manera directa al sustrato. Se inoculó con una concentración de 1×10^5 esporas/mL de *A. niger* ITV18. En cada sustrato con 6 combinaciones diferente (Tabla 2.1).

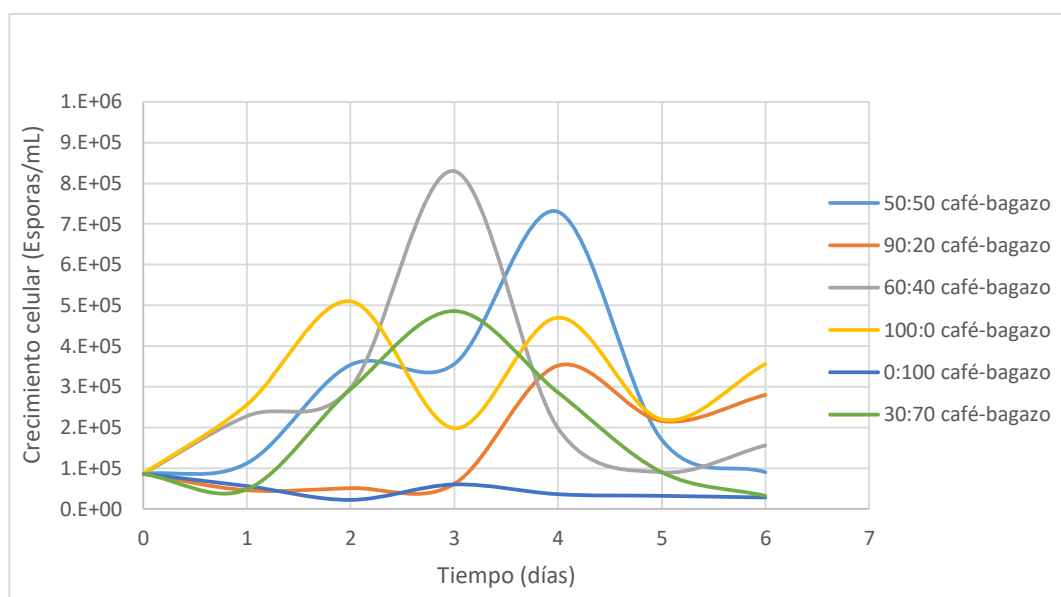


Figura 3. 1 Cinéticas de crecimiento de *A. niger* ITV18, en los sustratos en 12 días

Se observa un mejor crecimiento en la combinación 60% de residuos de café y 40 % de bagazo de caña, llegando a alcanzar una concentración de 8.3×10^5 esporas/mL, en conteo con cámara de Neubauer y obteniendo hasta 15 mL por matraz.

Observando una menor producción de esporas con 7×10^5 esporas/mL a la combinación conformada únicamente de bagazo de caña, por lo cual se puede concluir que el residuo de la caña de azúcar no beneficia el crecimiento de la cepa de *A. niger* ITV18.

El pH es una de las variables de mayor efecto durante el proceso de fermentación; para la fermentación en estado sólido su seguimiento y control es más complicado, por lo cual se obtuvo la variación del pH a lo largo del crecimiento de la cepa (Figura 3.2), donde se muestra que se mantiene entre los rangos de 5 y 7 al inicio y final del proceso, favoreciendo así la obtención de ácido cítrico.

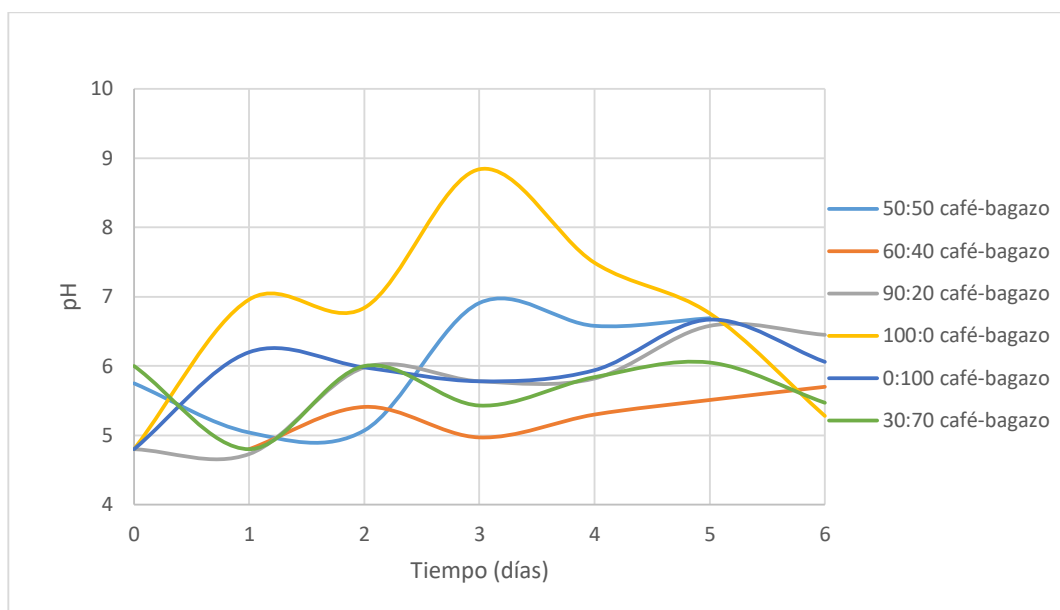


Figura 3. 2 Evolución del pH durante el crecimiento de *A. niger*

Esto muestra durante el proceso una relativa estabilidad, por lo cual en los experimentos posteriores se ajustó el pH a 4.5 al inicio del proceso para el óptimo crecimiento de la cepa.

Esto coincide con lo reportado por Sáez *et al*, (2002), donde el pH en medio decrece al producir ácido cítrico, en este proceso de adaptación de la cepa, no hay nutrientes presentes en el sustrato, solo se observa el crecimiento celular y es por ello que no se nota un cambio significativo en el pH. En tanto con los resultados obtenidos por López *et al*, (2006), se probó que el pH de 4 al inicio de la fermentación en comparación con los demás evaluados, se favoreció la producción de ácido cítrico. Por esta razón se optó por ajustar pH ácido en el sustrato para la fermentación.

Como resultado de la adaptación se obtuvo que el sustrato (50:50) y (60:40) residuos de café y bagazo de caña, presentaron concentraciones alrededor de 8.3×10^5 esporas/mL, ocho veces más que la concentración inicial. Por lo anterior se propuso trabajar con esas mismas combinaciones de sustrato para los experimentos posteriores.

3.3 Efecto del adicionamiento de nutrientes

Como se mencionó anteriormente el *A. niger* al producir ácido cítrico disminuye el pH del medio, es decir aumenta el porcentaje de acidez en el sustrato, por lo cual se midió el porcentaje de acidez volumétricamente (Figura 3.3), durante el proceso de crecimiento de la cepa. Para favorecer el crecimiento del *A. niger* y por lo tanto la producción de ácido cítrico, se añaden nutrientes a los sustratos que presentaron una mayor concentración de esporas al finalizar la etapa anterior, (a (50:50) y b (60:40) de residuos de café y bagazo de caña).

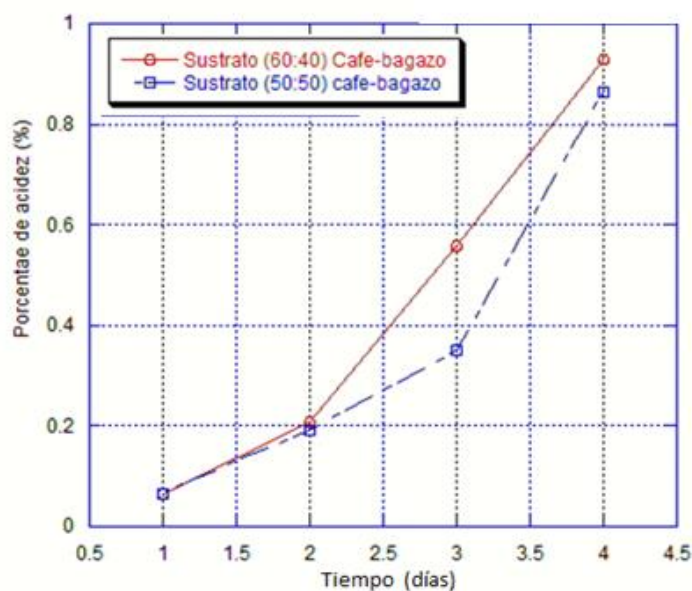


Figura 3. 3 Valores de acidez de los sustratos a y b con adición de nutrientes

Con lo anterior se observa que la combinación b (60:40 café-bagazo) es la que mayor porcentaje de acidez logra alcanzar, deduciendo un porcentaje mayor de ácido cítrico. Para analizar de mejor manera los efectos que tiene la adición de

nutrientes al sustrato, se compararon los resultados de esta etapa con los obtenidos en la etapa anterior en el software Minitab (Figura 3.4).

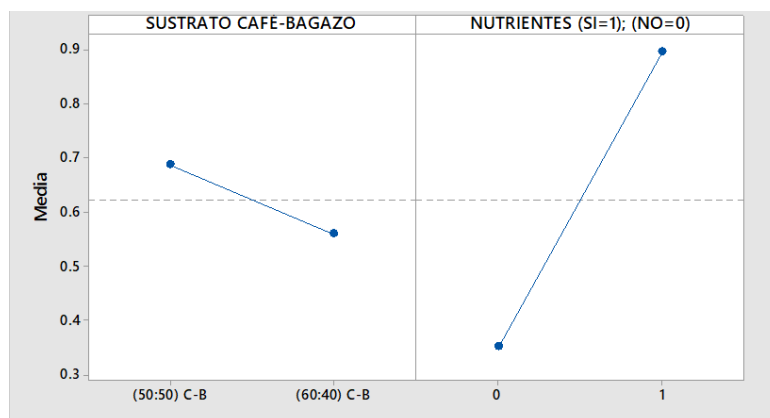


Figura 3. 4 Análisis del efecto de la adición de nutrientes al porcentaje de acidez del sustrato

Se puede observar que el tipo de sustrato no tiene un efecto significativo en el porcentaje de acidez final, ambos sustratos se encuentran cerca de la media de acidez, mientras que la adición de nutrientes muestra un efecto de manera significativa, lo cual se observa mejor en el gráfico de interacción de las variables que se encuentra en la Figura 3.5

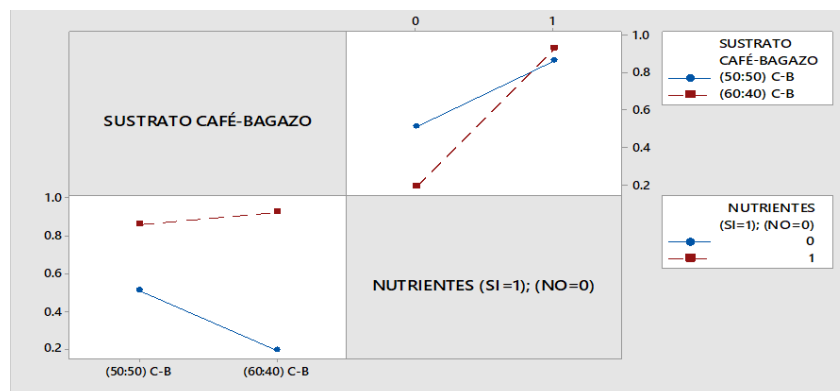


Figura 3. 5 Interacción de las variables durante la evaluación de la adición de nutrientes

En el análisis de nutrientes no existe interacción entre las variables, debido a que al adicionarlos se aumentó el porcentaje de acidez en el sustrato, de forma contraria al analizar los sustratos, en el cual no se generó una variación significativa entre ambos.

Por lo anterior se propone utilizar la solución de nutrientes en la fermentación, debido a que su mejoramiento en la producción de ácido, es significativo y siendo útil no despreciarlo.

3.4 Análisis de extracción de residuos

En cada extracto hubo presencia de taninos y flavonoides (Figura 3.6), en los cuales se observa precipitación de color café-rojo, y de taninos un color azul-verdoso.



Figura 3. 6 Identificación de a) flavonoides b) taninos

Se puede observar cómo los precipitados, de color correspondiente a cada metabolito, van disminuyendo al pasar las extracciones, cabe destacar que se hicieron mediciones de densidad con un densímetro digital Anton Paar DMA4500, el cual arrojó que extracto contenía mayor cantidad de metabolito en el solvente, Figura 3.6, esta medición se dio en g/ml, con lo cual se obtuvo el mejor proceso de extracción de polifenoles.

A partir de la Figura 3.7 se observa el comportamiento de la extracción por lixiviado, microondas y ultrasonido, siendo esta ultima la que muestra un mejor comportamiento, siendo que este tiende a disminuir su densidad de manera gradual al realizarse las extracciones consecutivas, de esta forma se midieron los extractos en cada uno de los procesos, sin embargo, lo que se necesita observar es el comportamiento de la cepa de *Aspergillus*, en cada sustrato

pretratado, es por eso que se llevó a fermentar y medir su actividad en la producción de ácido cítrico.

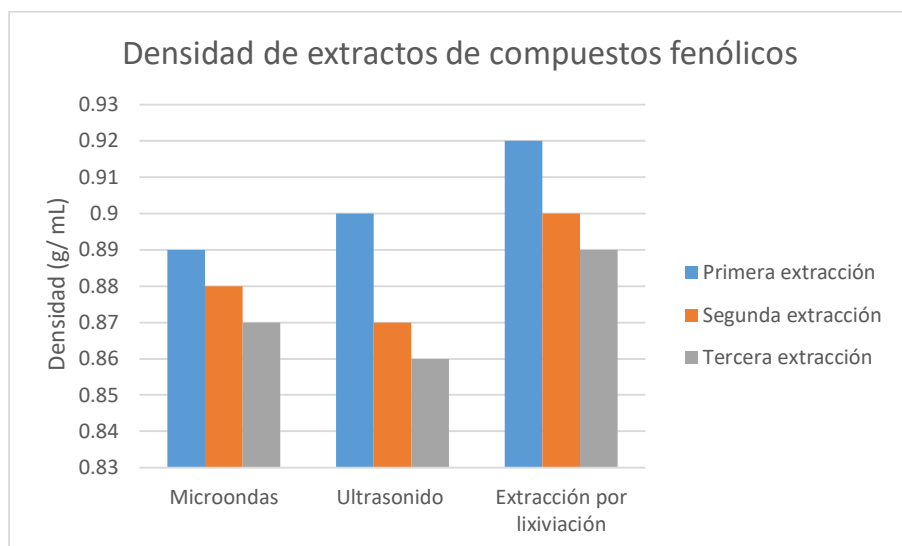


Figura 3. 7 Extracciones de compuestos fenólicos

Los sustratos tratados con los diferentes procesos de extracción se inocularon con 1×10^5 esporas/mL, adicionando 10 mL de una solución mineral: sacarosa 190 g/L, 1 g/L de KH_2PO_4 , 0.3 g/L de MgSO_4 , ajustando una humedad de 50-55 %, e incubadas a 35 °C, durante 5 días. A término se cuantificó la producción de ácido cítrico en cada uno de los sustratos, arrojando los datos mostrados en la Tabla 3.2.

Tabla 3. 2 Producción de ácido cítrico en los diferentes tratamientos de extracción

Tratamiento	Ácido cítrico (mg/mL)
Microondas	0.16
Extracción por lixiviación	0.24
Ultrasonido	0.73

De esta forma se optó por repetir el proceso de extracción por ultrasonido, debido a la mayor producción de ácido cítrico de la cepa *A. niger*, siendo este el objetivo principal del proceso.

3.5 Extracción de polifenoles por Ultrasonido

Con el fin de obtener el mejor tiempo para la extracción de metabolitos secundarios se realizaron diversos ensayos a diferentes tiempos con un tratamiento ultrasónico, el cual se puede observar en la Figura 3.8.

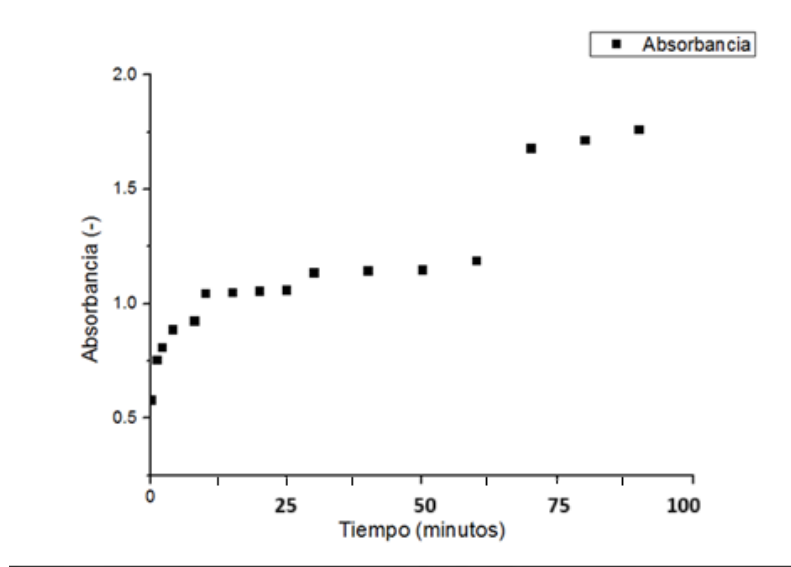


Figura 3. 8 Curva de extracción de compuesto fenólicos por ultrasonido

Se puede observar un incremento del arrastre de polifenoles, conforme avanza el tiempo, con lo cual se propone utilizar hasta el minuto 100, dentro del ultrasonido como pretratamiento de muestra para la futura fermentación.

3.6 Tratamiento con hidrólisis ácida

Uno de los factores importantes dentro de una fermentación es la adición o desdoblamiento de nutrientes en el sustrato, para esto se ha propuesto realizar la hidrólisis ácida al sustrato con un diseño experimental 3^2 , dando como resultado lo observado en la Tabla 3.3.

Tabla 3. 3 Resultados obtenidos de la hidrólisis ácida en el sustrato

Experimento	Solución de ácido sulfúrico (%)	Relación sustrato:ácido	Azúcares (g/L)
1	1	1:3	14.51
2	1	1:5	14.93
3	1	1:10	16.21
4	2	1:3	20.23
5	2	1:5	13.92
6	2	1:10	14.73
7	3	1:3	18.81
8	3	1:5	19.88
9	3	1:10	15.47

Analizando por Minitab, en la Figura 3.9 se pueden observar las diferentes variables en la hidrólisis como porcentaje de ácido y la relación ácido sustrato, observando que el porcentaje de azúcares se ve elevado en relación 1:3, donde alcanza el nivel más alto. Se observa que el nivel más alto en relación a porciento de acidez se encuentra al 3 %

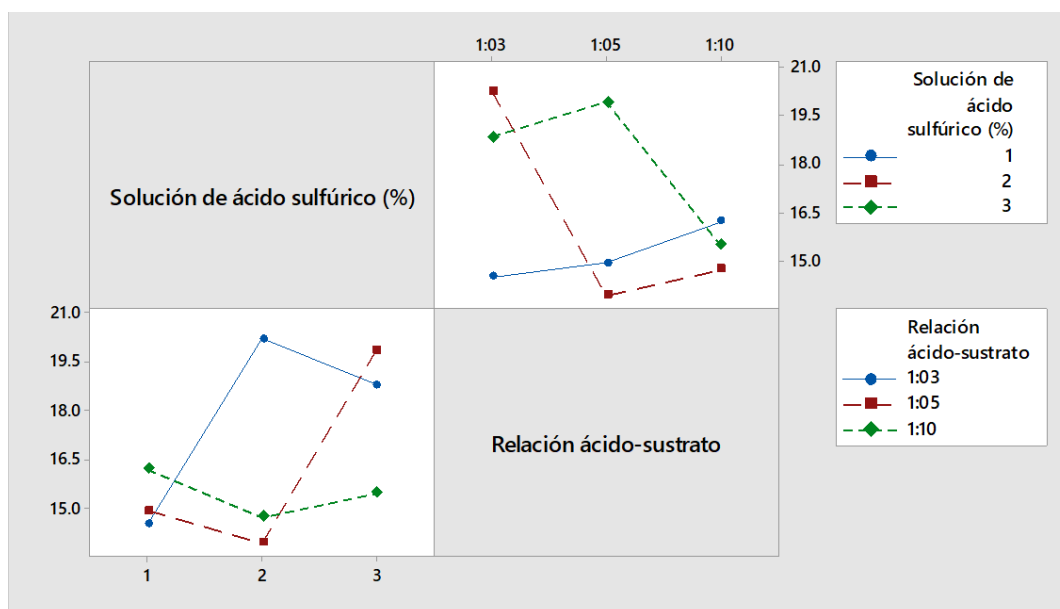


Figura 3. 9 Análisis de interacción de variables en la hidrólisis ácida

Al analizar las variables por separado en la Figura 3.10 se observa la como variable significativa el porcentaje de acidez al 3% y la relación 1:3 ácido-sustrato los cuales se encuentran muy por encima de la media.

Sugiriendo por tal motivo replicar estas condiciones para la fermentación, al obtener una mayor cantidad de azúcares totales, se espera que la cepa *A. niger* obtenga un óptimo crecimiento a estas condiciones.

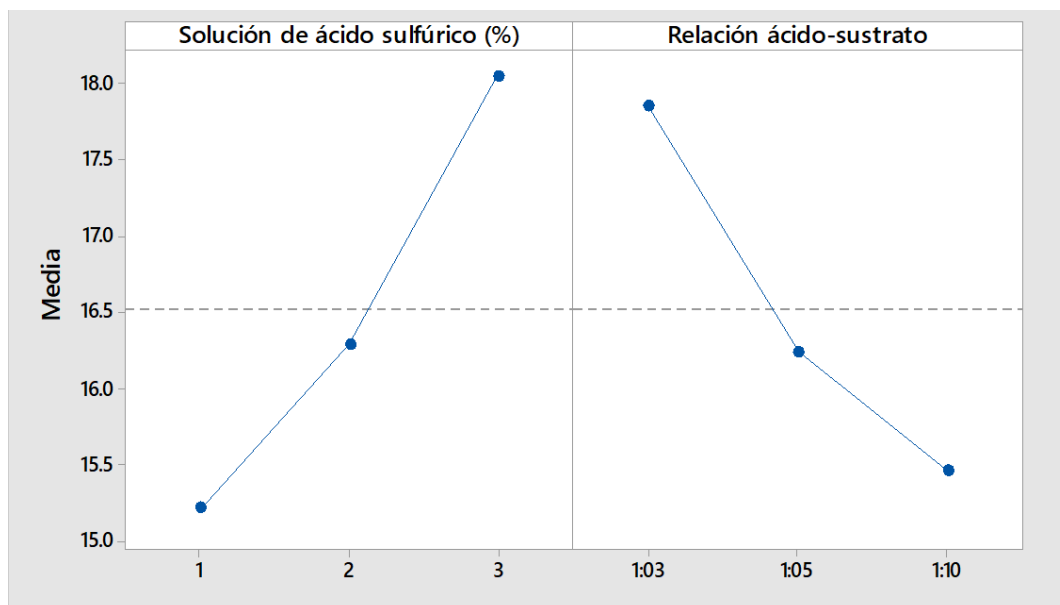


Figura 3. 10 Análisis de efectos principales en hidrólisis ácidas

3.7 Fermentación

La primera parte de la fermentación se llevó a cabo con el diseño experimental propuesto en la sección 2.7, (Tabla 2.4), teniendo como variables la concentración de sustrato, la extracción de compuestos fenólicos por Ultrasonido y la realización de hidrólisis.

Dichos resultados se expresan a continuación y a partir del mejor se repetirán las condiciones en el reactor de charolas, para poder realizar la comparación de resultados en la Tabla 3.4.

Cabe destacar que los resultados obtenidos se deben a la concentración final de ácido cítrico en 10 g de sustrato, con las condiciones iniciales propuestas anteriormente.

Tabla 3. 4 Resultados obtenidos en la fermentación sólida por *A. niger*

Experimento	Concentración	Extracción	Hidrólisis	Ac. cítrico g/mL
1	1	1	1	0.15
2	1	1	0	0.23
3	1	0	1	0.13
4	1	0	0	0.72
5	2	1	1	0.19
6	2	1	0	0.18
7	2	0	1	0.16
8	2	0	0	0.89

Analizando los resultados en el programa Minitab se observa en la Figura 3.12, que al variar el sustrato en concentraciones de café y bagazo de caña tienen un comportamiento poco significativo, es decir no distan de la media de producción de ácido cítrico, en cambio al analizar el factor de extracción en los sustratos , se muestran efectos favorables en los que no se les dio dicho tratamiento y de igual manera a las muestras que no se sometieron al proceso de hidrolisis tuvieron u efecto positivo en la producción de ácido cítrico y crecimiento optimo de la cepa.

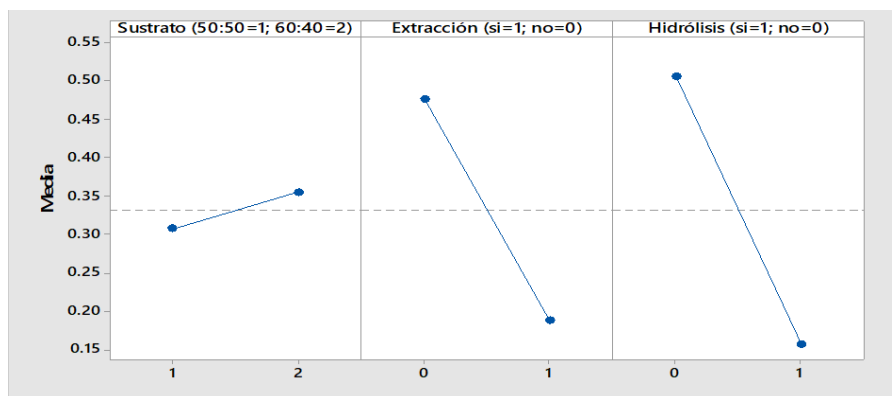


Figura 3. 11 Efectos de las variables en la producción de ácido cítrico

Al analizar la interacción de los factores, la Figura 3.12 muestra que, al utilizar ambos tipos de concentraciones de sustrato, la producción de ácido cítrico es similar. Sin embargo, el sustrato con una mezcla de 60:40 presenta la mayor

producción. Por otro lado, las muestras que no recibieron tratamiento de hidrólisis o extracción mostraron una mayor concentración de ácido cítrico al finalizar el proceso de fermentación.

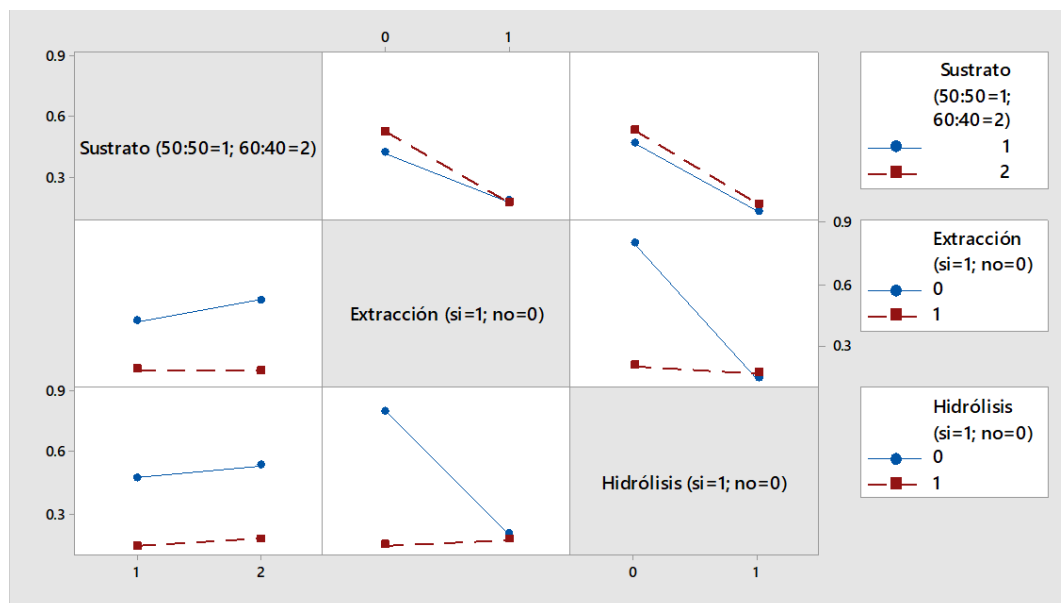


Figura 3. 12 Interacción entre las variables de la fermentación entre medio sólido por *A. niger*

Para poder comprobar dichos datos se realizó un ANOVA en el programa NCSS, el cual arrojó los resultados mostrados en la Tabla 3.4.

Tabla 3.5 Análisis de varianza por NCSS

Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: Conc_	1	0.0045125	0.004512	0.68	0.560448	0.066075
B: Extracción	1	0.1653125	0.1653125	25.00	0.125666	0.305160
AB	1	0.0055125	0.0055125	0.83	0.528917	0.069409
C: Hidrolisis	1	0.2415125	0.2415125	36.52	0.104394	0.364618
AC	1	0.0003125	0.0003125	0.05	0.863725	0.051172
BC	1	0.1953125	0.1953125	29.54	0.115842	0.330190
S	1	0.0066125	0.0066125			
Total (Adjusted)	7	0.6190875				
Total	8					

* Term significant at alpha = 0.05

Dichos resultados muestran que hay diferencias significativas en las interacciones y efectos de los factores evaluados. En particular, el factor de Extracción (B) que, aunque mostró una tendencia a tener un efecto en la producción de ácido cítrico al finalizar la fermentación, este efecto no es lo suficientemente fuerte como para considerarlo estadísticamente significativo,

esto quiere decir que, aunque hay indicios de que el factor podría ser importante, no se puede concluir con confianza que realmente tenga un impacto significativo en el resultado sin realizar más estudios.

Asimismo, el factor de Hidrolisis (C) sugiere una tendencia notable, parece ser relevante, pero se necesita más investigación para verificar su efecto de manera concluyente. Las interacciones entre los factores (AB, AC, BC) no mostraron significancia, reflejando un p mayor que 0.05, lo que indica que su efecto conjunto no es suficientemente fuerte para ser considerado significativo en este análisis.

3.8 Validación de la cámara de fermentación

La cámara de fermentación demostró ser adecuada para llevar a cabo el proceso de fermentación con la combinación de sustratos que obtuvo los mejores resultados en el análisis previo.

Esta combinación fue sometida a fermentación en la cámara durante un período de 5 días, durante los cuales se monitoreó la temperatura de la cámara. Para el monitoreo de la temperatura, se utilizó un termopar conectado a un software LabVIEW, que permitió capturar los datos en tiempo real, como se muestra en la Figura 3.13.

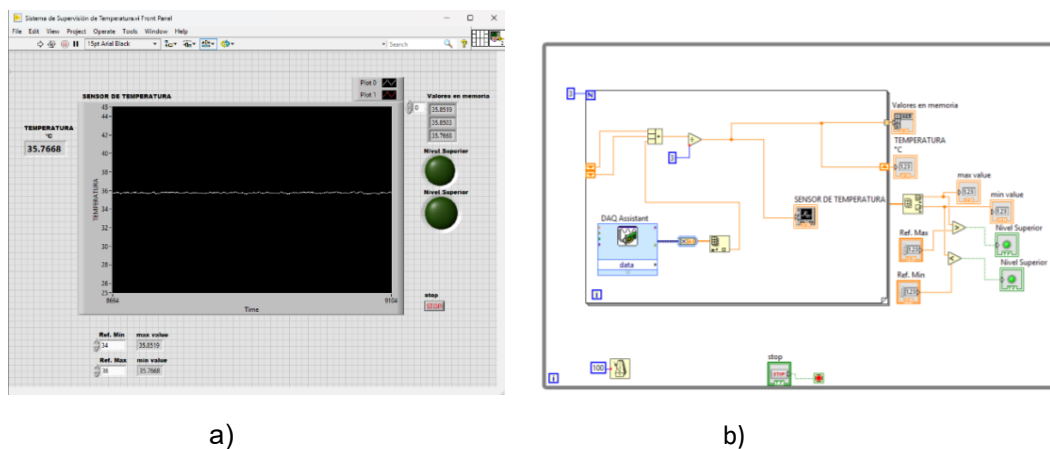


Figura 3.13 a) Panel de adquisición de datos LabVIEW. b) Diagrama de bloques con LabView

El proceso de fermentación se llevó a cabo bajo condiciones de temperatura controlada, utilizando un baño termostático para la introducción de aire caliente a la cabina de fermentación. El baño termostático, mostrado en la Figura 3.14,

fue programado a 40°C para mantener una temperatura dentro de la cabina de aproximadamente 35°C.



Figura 3. 14 Baño termostático

Este control de temperatura fue crucial para el desarrollo adecuado de la fermentación. En ese sentido, se colocó una muestra de 10 g de sustrato, con una concentración de 60:40 entre café y bagazo de caña, sin ningún tratamiento de hidrólisis ni extracción, siguiendo los datos obtenidos en el apartado anterior.

Al finalizar el proceso de fermentación, se procedió a contabilizar la cantidad de esporas, lo que resultó en una concentración de 8.75×10^5 esporas/mL y una concentración final de ácido cítrico de 0.91 g/mL.

Como se observa en la Figura 3.15, el crecimiento de la cepa *Aspergillus niger* ITV-18 en la cámara de fermentación fue óptimo, logrando el mejor rendimiento en cuanto a la concentración de ácido cítrico al finalizar el proceso de fermentación.



Figura 3. 15 Crecimiento de la cepa *A. niger* ITV -18

CONCLUSIONES

La caracterización fisicoquímica de los sustratos mostró que la pulpa de café retiene el mayor contenido de humedad, lo que, favoreció la adaptación de la cepa y proliferación. Por el contrario, el bagazo de caña, con menor humedad, resultó menos eficaz para el crecimiento de *A. niger*. Se estableció que el pH ácido de los sustratos es un factor crucial para la producción de ácido cítrico, corroborando la importancia del ajuste inicial del pH a 4.5. Esto correspondió con la combinación de sustrato con la proporción de pulpa de café (60:40) alcanzando mayores concentraciones de esporas significativamente. Esto confirma una selección adecuada de sustratos del proceso de fermentación para *A. niger*.

La inclusión de nutrientes en los sustratos mejoró el rendimiento de ácido cítrico, evidenciando que, aunque el tipo de sustrato no mostró variaciones significativas en la acidez final, sí la adición de nutrientes con un impacto positivo. Esto sugiere que la optimización en la nutrición de los sustratos puede ser fundamental para maximizar el rendimiento de producción. U otras combinaciones, dado que los sustratos fueron residuos agrícolas de alta producción en la región y sin costos significativos.

La extracción por ultrasonido resultó ser la más eficiente, incrementando significativamente la producción de ácido cítrico (0.73 mg/mL). Esto resalta la importancia de los métodos de extracción para la disponibilidad del sustrato para la fermentación del microorganismo. La densidad de los extractos fue disminuyendo conforme se realizaron las extracciones, lo cual comprueba la teoría de que entre más denso hay mayor cantidad de taninos y flavonoides entre los extractos. La concentración de metabolitos se reduce al realizar las extracciones, se puede observar que la coloración se reduce en la identificación de estos. Se obtuvo una concentración mayor de ácido cítrico en el tratamiento con Ultrasonido, superior al de 0.16 mg/mL obtenido en el tratamiento con Microondas

El tratamiento de hidrólisis ácida mostró resultados prometedores, particularmente con relaciones sustrato-ácido de 1:3 y una concentración de ácido sulfúrico del 3%. Estos hallazgos sugieren que la hidrólisis adecuada puede incrementar la disponibilidad de azúcares fermentables, mejorando así el crecimiento de la cepa. Los experimentos demostraron que, a pesar de las variaciones en la concentración de sustrato y tratamientos previos, el sustrato que combinaba 60:40 mostró la mayor producción de ácido cítrico.

La validación en la cámara de fermentación mostró una mejora significativa en el crecimiento de *A. niger* en comparación con los métodos anteriores, sugiriendo que el diseño del fermentador puede influir en los resultados de producción.

RECOMENDACIONES

Finalmente, estos resultados subrayan la importancia de la selección y adecuación de sustratos, validación de la formulación de nutrientes y de los métodos de pretratamiento en la fermentación en medio sólido para la producción de ácido cítrico, proponiendo profundizar en estos hallazgos mediante una optimización general del proceso. En general, la fermentación en medio sólido va depender de las variables como tipo de sustrato o soporte, extracción de productos, concentración de nutrientes, sinergia en la combinación de microorganismos, así como, la capacidad de los medios de fermentación, para un mayor rendimiento de productos de valor económico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar-Navarro, B., Camacho-Pozo, M., & Serrat-Díaz, M. de J. (2014). Enriquecimiento proteico de residuales agroindustriales mediante fermentación sólida con el hongo filamentoso *Aspergillus niger*. *Revista Cubana de Química*, 26(1), 17-25. Universidad de Oriente.

Álvarez H. J. R. (2010). Programa aseguramiento del café en la finca. Fundación Manuel Mejía. Colombia.

Bertsch, A., Domínguez, G. de J., de Basilio, V. A., Mazzani, C. B., Luzón, O. del V., & Testi, H. (s.f.). Caracterización de aditivos enzimáticos obtenidos por monocultivo (*Aspergillus niger*) y cocultivo (*Aspergillus niger-Saccharomyces cerevisiae*) y su efecto sobre el comportamiento productivo de pollos de engorde. Universidad Central de Venezuela.

Calle Aznar, S. (2011). Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales (Trabajo de Fin de Carrera, *Universitat Politècnica de Catalunya*).

Carchi, D. (2014). Aprovechamiento de los residuos agrícolas provenientes del cultivo de banano para obtener nanocelulosa. Cuenca, Ecuador.

Chandler, C., Villalobos, N., González, E., Arenas, E., Mármol, Z., Ríos, J., & Aiello Mazzarri, C. (2012). Hidrólisis ácida diluida en dos etapas de bagazo de caña de azúcar para la producción de azúcares fermentables. *Multiciencias*, 12(3), 245-253. Universidad del Zulia.

Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar (CONADESUCA). (2015). Informe estadístico del sector agroindustrial de la caña de azúcar: Zafras 2008/09 – 2014/15 [Informe completo]. CONADESUCA.

Díaz, S. A. B. (2009). Reciclado del orujo de uva como medio sólido de fermentación para la producción de enzimas hidrolíticas de interés industrial. *Tesis de doctorado*, Universidad de Cádiz.

González, R., Ballester, I., López-Posadas, R., Suárez, M. D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin, O., & Sánchez De Medina, F. (2010). Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), 331-362. <https://doi.org/10.1080/10408390903584094>

Gualteri, A. J. M., Villalta, R. C., Díaz, T. L. E., Medina, G., Lapenna, E., & Rendon, M. E. (2007). Producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis* usando residuos de pulpa de *Coffea arabica* L. *Revista del Instituto Nacional de Higiene*, 38(2).

Instituto Mexicano de Normalización y Certificación (IMNC). (1978). NMX-F-089-S-1978: Método para la determinación de grasa en productos alimenticios por el método Soxhlet. Instituto Mexicano de Normalización y Certificación.

Larrea Posadas, J. (2012). Obtención de extractos polifenólicos a partir de uva para uso alimentario (Trabajo de Fin de Máster, *Universidad Pública de Navarra*).

López, A., Lopretti, M., Tomasso, M., & Duarte, G. (2009). Evaluación de residuos de la industria forestal por un sistema de FSS de presacarificación con fines a la producción de alcohol. *Revista del Laboratorio Tecnológico de Uruguay*, 4.

López R. C. A., Zuluaga, M. A., Herrera, P. S. N., Ruiz, C. A. A., & Medina de P. V. I. (2006). Producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger* NRRL 2270 a partir de suero de leche. *Red de revistas científicas de América latina, el Caribe, España y Portugal*, 150, 39-57.

Martínez R. J. A. (2005). Hidrolisis de sacarosa en un reactor de lecho empacado con invertasa y *Aspergillus niger* inmovilizados en el cultivo sólido. *Tesis de maestría*, Universidad Autónoma Metropolitana.

Matute, L., Bertsch, A., & Díaz, I. (s.f.). Evaluación de la actividad amilolítica de *Aspergillus niger* ANM-1 en fermentaciones en estado sólido y sumergido para la obtención y caracterización de aditivos enzimáticos. Universidad Central de Venezuela.

Mitchell, D.A., Berovič, M., & Krieger, N. (2006). Introduction to solid-state fermentation bioreactors. In D.A. Mitchell, M. Berovič, & N. Krieger (Eds.), *Solid-*

State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation (pp. 33-44). Springer Berlin Heidelberg.

Nava, V. J. I. (2003). Fermentación de pulpa de café con *Penicillium Commune* a nivel laboratorio y semi piloto. *Tesis de Maestría*, Universidad Autónoma Metropolitana.

National Instruments. (2015). *LabVIEW*. Recuperado de <http://www.ni.com/es-mx/shop/labview.html>

Orozco, A. L., Perez, M. I., Guevara, O., Rodríguez, J., Hernández, M., González-Villa, F. J., Polvillo, O., Arias, M. E. (2008). *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 81, 247-252.

Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Brand, D., Mohan, R., Roussos, S. (2000). Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, 6, 153-162.

Peredo, H. A., Palou, E., & Lopez, A. (2009). Aceites esenciales: Métodos de extracción. *Ing. Alm.*, pp. 24–32.

Pérez-Morales, G. G., Ramírez, C. A., & Saucedo, C. G. (2009). XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. México DF.

Prinsen, P. (2010). Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas. *Memoria de proyecto*, Universidad de Sevilla.

Ruiz-Leza, E. A. (2007). Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 33-40.

Sáez, V. A., Flórez, V. L., & Cadavid, R. A. (2002). Caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus niger* y evaluación de la producción de ácido láctico. *Revista*.

Nogués F., S., García Galindo, D., & Rezeau, A. (2010). *Energía de la biomasa* (Vol. 1). Presas Universitarias de Zaragoza.

Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. (1980). Norma Oficial Mexicana NOM-F-68-S-1980: Alimentos. Determinación de proteínas (DOF: 04/08/1980). *Diario Oficial de la Federación*.

Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. (1978). Norma Oficial Mexicana NOM-F-317-S-1978: Determinación de pH en alimentos. *Diario Oficial de la Federación*.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2013). Available at: <http://www.sagarpa.gob.mx>. Accessed 21 March 2013.

Torres, M. M. A. (2009). Obtención de enzimas hidrolíticas a partir de una cepa del hongo *Aspergillus ficuum* mediante fermentación en medio sólido. *Tesis de licenciatura*, Valdivia-Chile.