

**OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE YACÓN MEDIANTE  
FERMENTACIÓN UTILIZANDO LA CEPA DE *Aspergillus niger* CMPUJH002**

**NATALIA ANGEL ROSARIO  
ANGELA PATRICIA CUESTAS LOPEZ**

**Proyecto integral de grado para optar el título de  
INGENIERO QUIMICO**

**Director  
DIANA MILENA MORALES FONSECA  
Microbióloga MSc**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA  
FACULTAD DE INGENIERÍAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BOGOTÁ D.C**

**2021**

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

---

---

---

---

Nombre  
Firma del Director

---

Nombre  
Firma del Presidente jurado

---

Nombre  
Firma del Jurado

---

Nombre  
Firma del Jurado

Bogotá D.C. Julio de 2021

## **DIRECTIVOS DE LA UNIVERSIDAD**

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. Mario Posada García Peña

Consejero Institucional

Dr. Luis Jaime Posada García Peña

Vicerrectora Académica y de Investigación

Dra. Alexandra Mejía Guzmán

Vicerrector Administrativo y Financiero

Dr. Ricardo Alfonso Peñaranda Castro

Secretaría General

Dr. José Luis Macías Rodríguez

Decano Facultad de Ingeniería

Ing. Julio César Fuentes Arismendi

Directora Programa de Ingeniería Química

Ing. Nubia Liliana Becerra Ospina

## **AGRADECIMIENTOS**

Principalmente agradezco el apoyo por parte de mi familia durante mi proceso de formación universitario, agradezco a nuestra directora Diana quien nos ayudó a desarrollar esta tesis de grado junto con la universidad que nos brindó los laboratorios, a mi compañera de tesis, sin ella este proyecto no habría sido posible. Finalmente, a Paula Ávila quien apoyó de inicio a fin este proceso.

Agradezco a todas las personas que estuvieron presentes durante mi periodo académico y quienes me acompañaron hasta el final, ellos me brindaron todo el apoyo y la fuerza para poder obtener este logro; agradezco a mi familia por depositar su confianza en mis capacidades y hacer todo lo posible para que yo pudiera aprovechar al máximo este proceso de aprendizaje; agradezco a todos los docentes que contribuyeron en la realización de este documento y a la universidad por brindarnos los implementos necesarios. Finalmente, agradezco a mis amigas, quienes estuvieron tanto en mi desarrollo académico como en mi desarrollo personal y son una gran motivación para seguir adelante en los nuevos retos que se presenten.

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

## TABLA DE CONTENIDO

	pág.
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	12
1. MARCO TEÓRICO	14
1.1. Generalidades del yacón	14
<i>1.1.1. Botánica</i>	14
<i>1.1.2. Raíces</i>	14
<i>1.1.3. Composición general del yacón</i>	15
<i>1.1.4. Fructooligosacáridos</i>	16
1.2. Producción de yacón	17
1.3. Hidrólisis	19
<i>1.3.1. Hidrólisis ácida</i>	19
<i>1.3.2. Hidrólisis enzimática</i>	19
1.4. Ácido cítrico	20
1.5. <i>Aspergillus.</i>	21
<i>1.5.1. Aspergillus niger</i>	22
<i>1.5.2. Metabolismo Aspergillus niger</i>	23
2. METODOLOGÍA	26
2.1. Caracterización propiedades del yacón	26
<i>2.1.1. Determinación de humedad</i>	26
<i>2.1.2. Determinación del porcentaje de cenizas</i>	27
<i>2.1.3. Determinación de densidad</i>	28
<i>2.1.4. Determinación de pH</i>	29
<i>2.1.5. Determinación de FOS (fructooligosacáridos)</i>	30
<i>2.1.6. Composición nutricional</i>	31
2.2. Propiedades del yacón como sustrato para la fermentación con <i>Aspergillus niger</i>	32
<i>2.2.1. Condiciones óptimas de fermentación</i>	32
<i>2.2.2. Fuentes de nitrógeno</i>	33
<i>2.2.3. Fuente de carbono</i>	34

2.2.4. Fuentes de fósforo	34
2.2.5. Pre - tratamiento del yacón	34
2.2.6. Cuantificación de azúcares reductores	42
2.2.7. Obtención de la cepa <i>Aspergillus niger</i>	43
2.2.8. Preparación del caldo Sabouraud (blanco)	44
2.2.9. Fermentación	44
2.3. Determinación de los rendimientos de producción de ácido cítrico	46
2.3.1. Cuantificación de ácido cítrico	46
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	50
3.1. Resultados extracto de yacón	50
3.2. Hidrólisis	54
3.1. Fermentación	58
3.1.1. pH	62
3.1.2. Biomasa	68
4. CONCLUSIONES	74
BIBLIOGRAFÍA	75
ANEXOS	82

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Comparación del contenido de azúcares.	15
Figura 2. Estructura química de la inulina	17
Figura 3. Exportaciones del producto yacón según sus principales mercados en el 2017	18
Figura 4. Estructura química del ácido cítrico.	21
Figura 5. Conidióforos de <i>Aspergillus</i>	22
Figura 6. Red metabólica simplificada de <i>Aspergillus niger</i>	24
Figura 7. Yacón pelado y sin pelar	35
Figura 8. Yacón posterior al proceso de blanqueado	36
Figura 9. Tratamientos primarios del yacón	38
Figura 10. Materia prima posterior al proceso de hidrolizado	39
Figura 11. Tratamientos secundarios del yacón	41
Figura 12. Desarrollo experimental curva de calibración de azúcares	42
Figura 13. Imagen microscópica de <i>Aspergillus niger</i>	43
Figura 14. Hifas, conidióforo y esporas de <i>Aspergillus niger</i>	44
Figura 15. Preparación de medios de cultivo antes de la fermentación.	46
Figura 16. Desarrollo experimental de la curva de calibración de ácido cítrico.	47
Figura 17. Diagrama de flujo del proceso de fermentación	48
Figura 18. Desviación estándar del pH del extracto de yacón	54
Figura 19. Curva de calibración técnica de DNS	55
Figura 20. Curva de calibración de ácido cítrico	58
Figura 21. Desviación estándar del caldo Sabouraud previo a fermentación	63
Figura 22. Desviación estándar de las réplicas previo a fermentación	64
Figura 23. Desviación estándar del caldo Sabouraud posterior a fermentación	65
Figura 24. Desviación estándar posterior a fermentación en la Replica 1	66
Figura 25. Desviación estándar posterior a fermentación en la Replica 2	66
Figura 26. Desviación estándar posterior a fermentación en la Replica 3	67
Figura 27. Biomasa del caldo Sabouraud después de la fermentación	70
Figura 28. Biomasa de posterior a la fermentación	71



## LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Comparación de porcentajes de composición del yacón según distintos artículos	16
Tabla 2. Comparación de resultados de la prueba de humedad entre el trabajo base y diferentes estudios realizados al yacón.	27
Tabla 3. Comparación de resultados de la prueba de cenizas entre diferentes estudios realizados al yacón	28
Tabla 4. Comparación de resultados de la prueba de densidad entre una muestra de yacón fresco y una muestra pre tratada	29
Tabla 5. Comparación de resultados de la prueba de pH entre diferentes estudios del yacón	30
Tabla 6. Comparación de resultados de la prueba de FOS entre diferentes estudios del yacón en una base de 100 gr	31
Tabla 7. Composición nutricional del yacón	31
Tabla 8. Condiciones generales para fermentar con <i>Aspergillus niger</i> .	33
Tabla 9. Peso y porcentajes de los tratamientos primarios	50
Tabla 10. Resultados del proceso de extracto de yacón	51
Tabla 11. Rendimientos del proceso de extracto de yacón	52
Tabla 12. pH del extracto de yacón	53
Tabla 13. Resultados azúcares reductores	56
Tabla 14. Rendimientos de hidrolizado	57
Tabla 15. Ácido cítrico presente en cada muestra	59
Tabla 16. Azúcares presentes después de la fermentación	60
Tabla 17. Comparación entre producción de ácido cítrico y azúcares añadidos	61
Tabla 18. Relación producto/sustrato consumido.	62
Tabla 19. Datos de pH previo a la fermentación	63
Tabla 20. Datos de pH posterior a la fermentación	65
Tabla 21. Datos de biomasa	69
Tabla 22. Rendimientos de sustrato y producto en relación a la biomasa	73
Tabla 23. Tomas de absorbancia de muestras de glucosa	84
Tabla 24. Datos de absorbancia de las muestras de ácido cítrico	86

## RESUMEN

El yacón es una raíz rica en fructooligosacáridos junto con azúcares simples (sacarosa, fructosa, glucosa), sin embargo, su uso ha estado limitado al consumo local gastronómico razón por la cual se desaprovecha sus posibles usos industriales, por esta razón en este estudio se evaluaron algunas de las variables de proceso para su uso como posible sustrato para la obtención de ácido cítrico por medio de la fermentación con *Aspergillus niger*.

Teniendo en cuenta el tipo de carbohidratos presentes en el yacón, el desarrollo del proyecto se dividió en tres partes: 1. La obtención y caracterización del extracto de yacón donde se realizaron una serie de tratamientos adaptando el tubérculo a las condiciones requeridas, 2. La hidrólisis del yacón en la cual se cuantificó el contenido de azúcares reductores presentes susceptibles al proceso de fermentación y finalmente 3. El proceso de fermentación del hidrolizado de yacón con *Aspergillus niger*; sobre cada una de las fases experimentales se analizaron los rendimientos, encontrando así que la cantidad de azúcares reductores por medio del proceso de hidrólisis fue de 12.185g/L para el hidrolizado de extracto fresco y del 8.165g/L para el hidrolizado de extracto madurado. Se utilizó el hidrolizado del yacón fresco ya que los azúcares reductores finales eran considerablemente mayores.

Por último, se realizaron 3 réplicas de fermentación de *Aspergillus niger* en hidrolizado de yacón, de las cuales se obtuvieron 0.0055 mg/L, 0.0066mg/L, 0.0077mg/L de ácido respectivamente, con estos resultados se confirmó la posibilidad de producción de ácido cítrico por medio del aprovechamiento de los azúcares presentes en el yacón.

Como parte de los resultados finales, se calculó el rendimiento de la producción de ácido cítrico que se obtuvo en la fermentación teniendo en cuenta los azúcares reductores consumidos durante el proceso, así mismo se muestra la relación entre crecimiento del microorganismo con respecto a los azúcares consumidos y el ácido cítrico producido, todo ello para dar una estimación del comportamiento de la fermentación con *Aspergillus niger* y los posibles flujos de carbono dentro del proceso.

## INTRODUCCIÓN

En Colombia el ácido cítrico se emplea principalmente por la industria farmacéutica, la cual abarca un gran porcentaje de este en los procesos de manufactura. Para la implementación de ácido cítrico en la industria se utilizan diferentes métodos de fermentación junto con diferentes tipos de sustratos, como material orgánico hidrolizado; en este caso el yacón, sustrato óptimo por su alto contenido de fructooligosacáridos [1].

La fermentación es el proceso metabólico requerido para desarrollar el proceso de obtención de ácido cítrico [1]. El presente proyecto pretende abrir la posibilidad de una evaluación técnica del uso de yacón como sustrato en la fermentación con *Aspergillus niger* para la obtención de ácido cítrico, con el cual se propone una adaptación de las propiedades del yacón para ser usado como un sustrato viable para la fermentación, esto se realiza mediante tratamientos físicos que permitan la obtención del extracto de yacón, seguido de un proceso de hidrólisis con HCl y neutralización con NaOH que se realiza con el fin de concentrar los azúcares reductores presentes.

Esta metodología evalúa otras condiciones de fermentación requeridas para la producción de ácido cítrico, tales como: pH, humedad y azúcares reductores presentes; este último se cuantifica por medio de curvas de calibración las cuales se determinan por medio de espectrofotometría [16].

Con el fin de producir ácido cítrico utilizando una nueva fuente de glucosa este trabajo planteó como objetivo general **Evaluar el uso de yacón para la obtención de ácido cítrico por medio de fermentación con *Aspergillus Niger***. Lo que permite determinar si el yacón es una alternativa viable de uso como sustrato, para dar cumplimiento a este objetivo la investigación se delimita mediante los objetivos específicos que se presentan en el orden correspondiente:

- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas y nutricionales del yacón.
- Evaluar las propiedades del yacón como sustrato para la fermentación con *Aspergillus niger*.
- Determinar los rendimientos del ácido cítrico obtenidos de la fermentación con *Aspergillus niger* a partir de yacón como sustrato.

Con el cumplimiento del objetivo general junto con los específicos se logra la determinación de uso de yacón como sustrato en la fermentación con *Aspergillus niger* para la producción de ácido cítrico, como una alternativa viable de sustratos para la industria.

En términos generales el proyecto de grado se conforma por un total de (4) capítulos los cuales corresponden a: Marco teórico, donde se verá reflejado las características generales de la composición fisicoquímica del yacón y su botánica, propiedades de la morfología del hongo y tipos de procesos de hidrólisis; en el segundo capítulo se refleja la caracterización del yacón según las normas NTC y AOAC [6], además se determina el método de cuantificación de azúcares reductores, el proceso de fermentación y el método de cuantificación de ácido cítrico; en el tercer capítulo se ven reflejados los resultados obtenidos en cada uno de los procesos realizados anteriormente en el segundo capítulo; finalmente se realizará un análisis de los resultados obtenidos junto con las conclusiones.

## 1. MARCO TEÓRICO

Este capítulo corresponde al marco de referencia conceptual en el que se desarrolla y se consolida la información teórica que sustenta la presente investigación. La cual es el fundamento para comprender los conceptos utilizados a lo largo del trabajo actual. Además, son importantes para entender el proceso de selección de sustrato, junto con el desarrollo del proceso de fermentación, objetivo principal de este proyecto.

En las siguientes secciones, se muestra una breve descripción de las generalidades del yacón y la producción de ácido cítrico, en donde se tiene en cuenta la botánica, la producción y las propiedades del yacón, así como la importancia del ácido cítrico en la industria.

### 1.1. Generalidades del yacón

El yacón es un tubérculo originario de la región Andina que durante siglos se cultivaba de forma casera para consumo local, recientemente se popularizó ya que presenta propiedades promisorias y un alto valor nutricional. Las plantas presentan su característica raíz la cual se puede consumir de manera cruda a pesar de ser esta un familiar del camote y la yuca. [4]

#### 1.1.1. Botánica

1.1.1.a. La planta. “La planta del yacón es herbácea perenne la cual mide de 1 a 2.5 m de alto, si la planta proviene de una sola semilla, este consta de un solo tallo a veces ramificado desde la base o solo con ramas pequeñas en la parte superior, pero si la planta proviene de semillas vegetativas consta de varios tallos los cuales pueden ser de color verde a púrpura de forma cilíndrica.” [4]

1.1.1.b. Flores. “Se pueden encontrar dos tipos de flores la femenina y masculina, donde la flor femenina presenta fusión cinco pétalos y se marchita mucho antes que las flores masculinas ya que este abre sus pétalos en serie. El yacón presenta entre 14 a 16 flores femeninas y entre 80 a 90 flores masculinas.” [4]

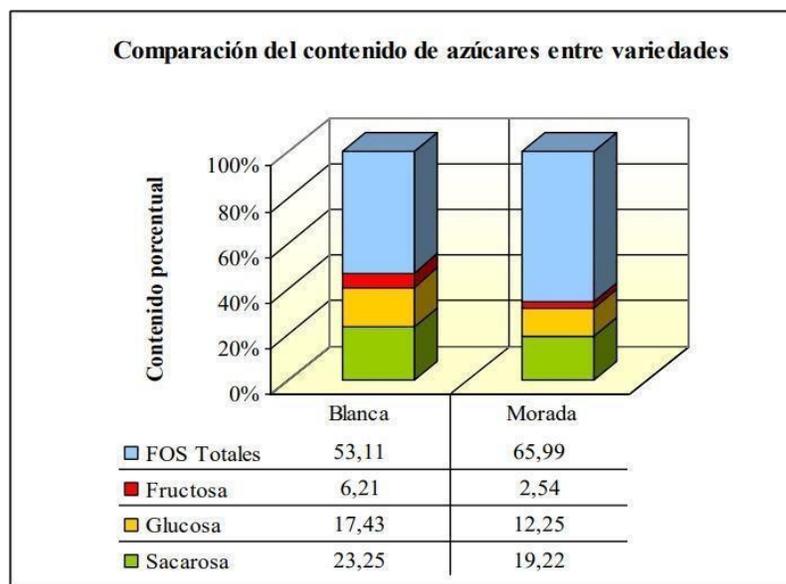
#### 1.1.2. Raíces

La planta cuenta con dos tipos de raíces, raíces fibrosas y raíces recervantes diferenciándose por sus funciones; las raíces fibrosas se fijan al sustrato y absorben nutrientes, son de aspecto alargado y delgado, mientras que las raíces recervantes son de forma elipsoidal con sus extremidades más estrechas que el centro, se presentan de color blanco, o con manchas púrpuras, este tipo de raíces también pueden ser encontradas en otros tubérculos como el camote [4]; existen

diferencias de composición dependiendo del color del yacón, a continuación se muestran las composiciones porcentuales según algunas variedades en la **Figura 1**. [9]

**Figura 1.**

*Comparación del contenido de azúcares.*



**Nota.** Contenido porcentual de los principales carbohidratos solubles en la raíz del yacón para variedades blanca y morada. Tomado de DL. López Torrez “Valorización de la raíz de yacón: obtención de un jarabe rico en fructooligosacáridos”, *UPB desarrollo & investigación*, vol. 1, no. 7, pp. 88-99, Sep, 2007 . [En línea]. Disponible en :<https://www.upb.edu/revista-investigacion-desarrollo/index.php/id/article/view/99/262> [acceso: 11 jun, 2021].

El porcentaje de los azúcares fermentables presentes en las raíces es menor frente al de los fructooligosacáridos como se muestra en la **Figura 1**, sin embargo, por medio de un tratamiento de lisis estructural de los mismos, es posible concentrar los azúcares fermentables presentes en el yacón para su uso como sustrato.

### **1.1.3. Composición general del yacón**

El tubérculo se caracteriza por su sabor dulce, razón por la cual se puede consumir crudo, esto se debe a que las raíces acumulan en su mayoría agua y carbohidratos; entre un 40 y un 70%

del peso seco se encuentra en forma de fructooligosacáridos, mientras que los azúcares simples como sacarosa, fructosa y glucosa se encuentra entre un 15 y 40%. [10]. Los porcentajes de humedad, carbohidratos, proteínas y azúcares del yacón, pueden variar como se muestra en la

**Tabla 1.**

**Tabla 1.**

*Comparación de porcentajes de composición del yacón según distintos artículos*

Artículo	Cenizas	Humedad	Grasas	Carbohidratos	Fibra cruda	Proteínas totales
Muñoz <sup>43</sup>	3,40%	87,7%	0,05%	92,04%	0,4%	4,52%
Fernández <sup>44</sup>	-	91,25%	-	86,88%	-	-
López <sup>45</sup>	5,10%	83,56%	0,99%	71,80%	16,91%	2,59%
González <sup>46</sup>	0,3-2,0%	93%-70%	-	-	0,3%-1,7%	0,4%-2,0%
Coronado <sup>47</sup>	3,04%	81,8%	-	89,95%	4,08%	2,69%

*Nota.* Diferentes rangos porcentuales en los resultados de caracterización de varios autores. Tomado de V. M. Barreto, “Desarrollo de una propuesta para el diseño conceptual de la producción de un edulcorante a base de yacón”, Proyecto de grado, Bogotá D.C, Fundación U. América, Bogotá D.C, 2019. [ En línea]. Disponible en: <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7372/1/6122859-2019-1-IQ.pdf> , [11 de junio 2021].

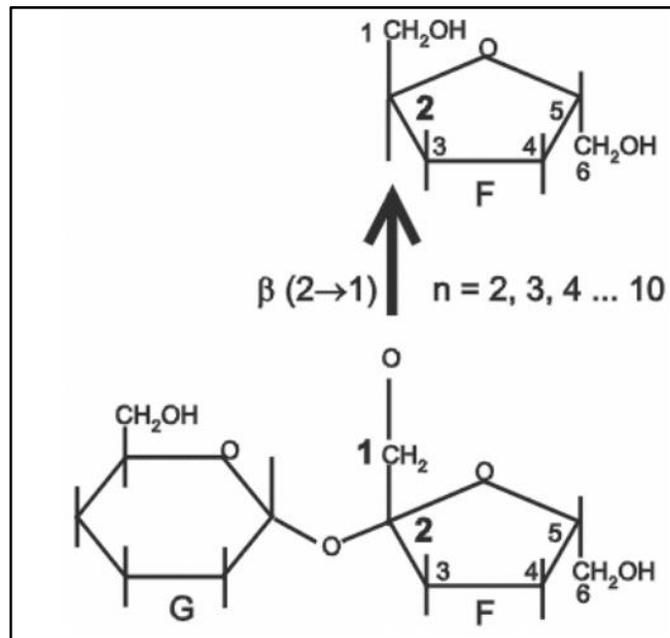
El porcentaje de carbohidratos que presenta el yacón permiten la posibilidad de evaluarlo para el uso de sustrato en la fermentación con *A.niger* ya que el hongo requiere una alta concentración de azúcares fermentables como fuente de carbono para su crecimiento.

#### **1.1.4. Fructooligosacáridos**

Los fructooligosacáridos son uno de los componentes más abundantes e importantes en el yacón, estos pertenecen al grupo de los fructanos, los cuales se presentan de acuerdo a su tipo de enlace, los tipos inulina son los más conocidos y comunes, son de cadena lineal donde las unidades de fructosa están unidas por enlace  $\beta$  (2-1) fructosil fructosa, tal como se muestra en la **Figura 2**

**Figura 2.**

*Estructura química de la inulina*



*Nota.* Estructura química de la inulina. Tomado de: *El yacón. Fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio.* Seminario J, Valderrama M & Manrique.2003. El yacón: fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio. Centro Internacional de la papa (CIP), Universidad Nacional de Cajamarca, Agencia Suiza para el desarrollo y la Cooperación (COSUDE), Lima, Perú, 60 p. [E n línea]. Disponible en: [http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/07/Yacon\\_Fundamentos\\_pass\\_word.pdf](http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/07/Yacon_Fundamentos_pass_word.pdf), [ 11 de junio 2021]

## 1.2. Producción de yacón

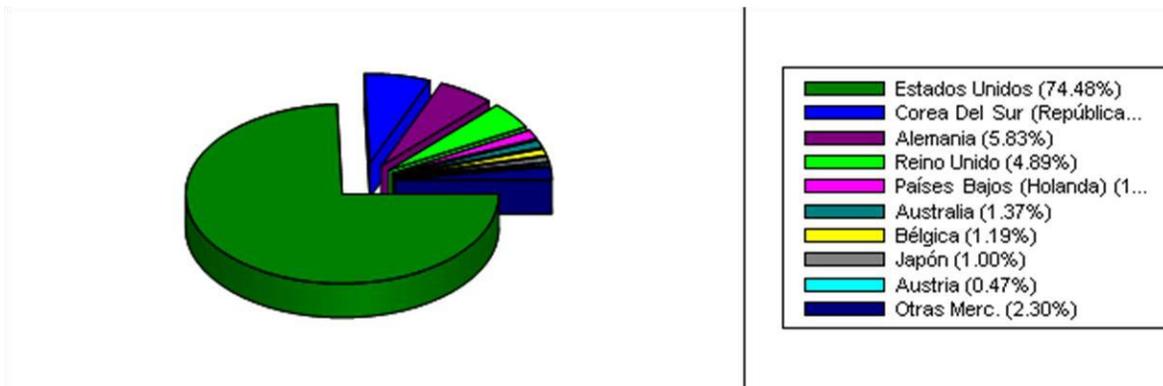
El yacón hace parte de las raíces y tubérculos Andinos (RTA) que son muy poco conocidos y muy poco aprovechados en la agroindustria, como su clasificación indica, es originario de la cordillera de los Andes y es conocido por el nombre científico de *Smallanthus sonchifolius*. Se cultivaba principalmente en las zonas de Argentina, Bolivia, Ecuador y Perú. [4]

<<En Colombia la producción de yacón se encuentra en el sector hortofrutícola cuya producción no se encuentra destinada a fines comerciales provocando de esta manera una desorganización, lo que causa desinformación en los datos de la producción de yacón en Colombia, sin embargo, se encuentran los cultivos transitorios de hortalizas en el que se encuentra incluido el yacón donde han disminuido un 5,9% en el 2015 pasando de 8,9 millones de toneladas en 2014 a 8,6 millones de toneladas en 2015. La producción de yacón se lleva a cabo en los departamentos de Caldas, Cauca, Nariño, Huila, Risaralda, Quindío, Cundinamarca, Boyacá, Tolima, Valle del Cauca; debido al poco conocimiento de esta especie los agricultores no le prestan la debida atención a este tubérculo y sus beneficios. >> [6]

El yacón es un tubérculo proveniente de los Andes, sin embargo, dado sus propiedades benéficas y su popularización entre otras culturas, su cultivo se ha ido expandiendo hacia otros continentes [15], según el estudio realizado por la FAO, los principales productores de yacón son: Estados Unidos, Reino Unido, Australia y Chile; algunos de estos se han mantenido constantes en el mercado, tal como se muestra en la **Figura 3** la cual ilustra el mercado del yacón a nivel internacional en el 2017.

**Figura 3.**

*Exportaciones del producto yacón según sus principales mercados en el 2017*



**Nota.** Gráfica de comercialización internacional del yacón, el orden de los principales comercializadores se ha mantenido constante hasta el 2020. Tomado de sistema Integral de Información de Comercio Exterior. “Exportación del producto yacón según sus principales mercados en us\$ 2016 – 2021”. [En línea]. <https://www.siicex.gob.pe/siicex/apb/ReporteProducto.aspx?psector=1025&preporte=prodmerc &pvalor=1953> [Acceso: junio 10, 2021]

<<Bajo las necesidades y el aprovechamiento del yacón como producto de consumo, se hace necesario estandarizar características en común según los países que lo comercializan, esta normalización permite hacer una selección del tubérculo acorde a su calidad y dentro de las propiedades que se especifican están las siguientes:

- Valor nutritivo
- Inocuidad
- Sanidad e higiene

“El yacón según su clasificación de peso y diámetro se puede seccionar en 3 calibres, todos los calibres pueden tener forma oval, fusiforme, aovada e irregular. Algunos cultivos de yacón tienden a formar un número mayor de raíces lisas y simétricas que otros”>>. [15]

### **1.3. Hidrólisis**

La hidrólisis consiste en la ruptura de la estructura química por efecto del agua, donde esta se divide para formar otra especie química en la cual el ácido, base o enzima catalizan el rompimiento de la estructura para obtener el producto de interés. [6]

#### ***1.3.1. Hidrólisis ácida***

La hidrólisis ácida busca romper la estructura química del yacón a partir de un compuesto químico con un pH inferior a 7 y producir una ruptura en los de enlace  $\beta$  (2-1) para el caso de los fructooligosacáridos.

<<El método por hidrólisis consiste primero extraer la muestra con agua hirviendo, cuantificar los azúcares libres antes del proceso, luego hidrolizar los fructanos tipo inulina-FOS (enzimática o química), cuantificar los azúcares liberados, restar la cantidad de azúcares que se obtuvieron previamente y luego determinar el grado de polimerización promedio basado en la ratio glucosa - fructuosa. Básicamente este es el procedimiento general que siguen los métodos que se basan en la hidrólisis de FOS e inulina.>> [11]

#### **1.3.2. Hidrólisis enzimática**

Las enzimas necesarias que permiten romper los enlaces  $\beta$  (2-1), son la inulinasa y la invertasa logrando acelerar el proceso de ruptura de la estructura consiguiendo de esta manera que el sustrato se transforme en el producto deseado.

#### 1.4. Ácido cítrico

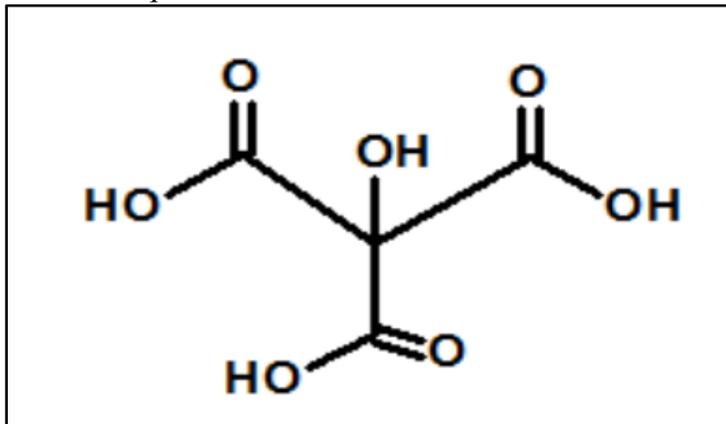
<<El ácido cítrico es un ácido orgánico que puede ser considerado natural, sin embargo, también puede ser sintetizado vía laboratorio, se encuentra en casi todos los tejidos animales y vegetales, se presenta en forma de ácido de frutas en el limón, mandarina, lima, toronja, naranja, piña, ciruela, guisantes, melocotón, así como en los huesos, músculos y sangre de animales. Físicamente es un polvo cristalino blanco que puede presentarse de manera anhidra o como mono hidrató, considerado un triácido carboxílico. >> [1]

“El ácido cítrico es ampliamente utilizado en la industria de alimentos, bebidas, química y farmacéutica, entre otras. Es empleado como agente acidificante, resaltador del sabor, antioxidante para prevenir la rancidez de grasas y aceites, amortiguador en mermeladas, y estabilizante en gran variedad de alimentos. La industria farmacéutica emplea alrededor del 16% de la producción de este ácido.” [3]

“La obtención industrial de ácido cítrico se lleva a cabo empleando el hongo *Aspergillus niger* en medios ricos en carbohidratos como las melazas de caña y de remolacha. También se utiliza sacarosa, almidón de papa, hidrolizados de almidón y jarabes de glucosa” [3] su estructura química se presente en la **Figura 4**.

**Figura 4.**

*Estructura química del ácido cítrico.*



*Nota.* Estructura química de ácido cítrico Tomado de A Muñoz. et al.” Ácido Cítrico: Compuesto Interesante”, *Rev. Científica de la U. A de Coahuila*, vol. 6. No 12, 2014. [En línea]. Disponible en: <http://www.actaquimicamexicana.uadec.mx/articulos/12-4%20citricos.pdf> [11 Jun 2021].

<<Para revisar la bioquímica de la formación de ácido cítrico se puede decir que el exceso de producción requiere una combinación única de las condiciones nutricionales inusuales (exceso de fuente de carbono, iones de hidrógeno y el oxígeno disuelto, y altas concentraciones de ciertos metales traza y de fosfato), que influyen sinérgicamente el rendimiento de fermentación.

El ácido cítrico es un intermediario en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) o ciclo de Krebs. Las funciones de este ciclo son generar energía en forma de ATP en conjunción con la fosforilación oxidativa durante el metabolismo aeróbico de carbohidratos y crear precursores de otros ciclos biosintéticos como aminoácidos.>> [1]

### **1.5. *Aspergillus.***

“*Aspergillus* es un hongo filamentoso hialino, saprofito, perteneciente al filo *Ascomycota*. Se encuentra formado por hifas hialinas septadas y puede tener reproducción sexual (con formación de ascosporas en el interior de asca).” [8]

### 1.5.1. *Aspergillus niger*

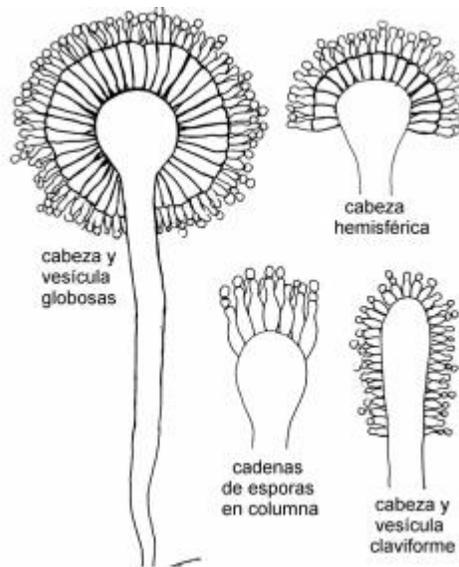
“La categoría de *A. niger* se caracteriza por sus tonalidades negruzcas, conidios globosos y ornamentaciones más o menos marcadas.” [13]

“El estudio de la morfología microscópica sobre laminocultivo en medio de Czapek es el sistema indicado para la identificación de diversas especies de *Aspergillus*. Las cabezas conidiales se presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme.” [13]

En la **Figura 5** se observa la taxonomía general de *Aspergillus* en las cuales se representa la cabeza hemisférica, las cadenas de esporas y la vesícula claviforme, las cuales son las características más predominantes en la taxonomía del género *Aspergillus*.

**Figura 5.**

*Conidióforos de Aspergillus*



**Nota.** Se muestran cada una de las partes de *Aspergillus*. Tomado de Sociedad estudiantil de ciencias UPCH. Ciclo del ácido cítrico [Archivo de Video]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=Cwi7wfZ-Ykw> , [10 de junio 2021].

“Los componentes y las aplicaciones de la sección *nigri* son de las de mayor importancia a nivel industrial para el género *Aspergillus*, se utilizan en la elaboración de alimentos y bebidas típicas principalmente en el medio oriente junto con ácidos y enzimas a nivel industrial. Se aíslan con facilidad en semillas, granos, forrajes, frutas, verduras, entre otros.” [13]

### ***1.5.2. Metabolismo Aspergillus niger***

Los procesos metabólicos de los microorganismos se han modelado a partir del uso de términos de ecuaciones, sin embargo, los resultados no han sido completamente acertados y han fallado en generar un modelo predictivo del desarrollo metabólico de *Aspergillus niger*; dentro de los modelos más simples se encuentra el de estrategia de ensamble que permiten generar familias de modelos para describir redes de metabolismo más complejas [22] así como se presenta en el **Figura 6.**



<<El modelo presentado reúne en un solo compartimento al proceso de glicólisis (ruta de Embden- Meyerhof- Parnas o EMP), y a la ruta de las pentosas-fosfato (PF), y se conectan, a través del transporte transmembrana mitocondrial, con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT), contribuyendo todas estas rutas a la producción de biomasa, que se describe de forma muy reducida.>> [22]

La **Figura 6** estudia las rutas metabólicas que presentó la fermentación de *A. niger* usando glucosa, ácido oxálico, ácido cítrico, y glicerol como sustrato, a partir de esta cadena de rutas metabólicas se puede estimar la dirección a tomar por *A.niger* en los procesos de fermentación dependiendo del tipo de sustrato y el manejo de las condiciones durante esta. Las rutas metabólicas se tienen en cuenta para entender el proceso que ocurre en el transporte de membrana citoplasmática, esta se encarga de mantener el equilibrio de pH, el cual cambia dependiendo del comportamiento del medio y de los requerimientos energéticos de la célula.

## 2. METODOLOGÍA

Con el fin de determinar el funcionamiento del yacón como sustrato para la fermentación con el hongo *Aspergillus niger*, fue necesario establecer las condiciones en las cuales el hongo ha demostrado una producción de ácido cítrico, de esta forma evaluar el yacón con respecto a estas condiciones necesarias para la producción del metabolito de interés, centrándose principalmente en sus características más aprovechables.

### 2.1. Caracterización propiedades del yacón

Inicialmente se realizó una búsqueda bibliográfica de documentos en los que se caracterizaron los frutos de yacón tomando como referencia principal el proyecto “Desarrollo de una propuesta para el diseño conceptual de la producción de un edulcorante a base de yacón” de la Fundación Universidad de América realizado por Verónica Marcela Barrero Vargas del año 2019 donde se realizó la caracterización bajo las normas NTC (Normativa técnica colombiana) y AOAC (association of official analytical chemists) [6]; la cuales se explican según la propiedad a evaluar. Adicionalmente se tomaron en cuenta diferentes proyectos de caracterización de yacón que se referencian más adelante, esta búsqueda bibliográfica permitió la realización de tablas comparativas las cuales permitieron visualizar las principales propiedades que se estudian del tubérculo y la importancia de su estudio.

Previo a las pruebas de caracterización se realizó un pretratamiento al yacón puesto que este tiende a oxidarse con bastante rapidez, el yacón al tener propiedades reductoras convierte sus moléculas en azúcares reductores con el tiempo.

#### 2.1.1. Determinación de humedad

Como se establece en el capítulo anterior, el yacón presenta una humedad relativamente alta en comparación a otros tubérculos; los métodos de análisis de esta propiedad son similares entre autores debido a que manejan la misma norma de calidad (AOAC), en la cual se requiere realizar un secado previo de las capsulas y tapas donde se colocará el tubérculo, esto se hace en una estufa durante una hora, posterior a ello se llevan al desecador por un tiempo de 30 a 45 min, después se realiza el pesaje de las capsulas y las tapas, una vez obtenido el peso de los recipientes se procede a tomar la muestra de tubérculo y se realiza una medición de su pesaje inicial, se somete a 5 horas de secado en la estufa para luego ser llevado a un desecador de 30 a 45 min y se realiza la respectiva medición de pesaje final.[6]. La humedad se calcula mediante la

siguiente ecuación, por medio de la diferencia entre la masa inicial representada como  $m_1$  y la masa final posterior al secado representado como  $m_2$ :

$$\%Humedad = \frac{m_1 - m_2}{m_1} * 100$$

El resumen de resultados según el documento base se presentan en la **Tabla 2**

**Tabla 2.**

*Comparación de resultados de la prueba de humedad entre el trabajo base y diferentes estudios realizados al yacón.*

<b>Referencia</b>	<b>%Humedad</b>
V. M. Barreto <sup>[6]</sup>	85.35 - 87.85
DL. López Torrez <sup>[9]</sup>	83.56
I. Maquez <sup>[10]</sup>	85- 90
D. Salvatierra <sup>[11]</sup>	83.53
Organización mundial de la salud <sup>[15]</sup>	90.247

**Nota.** Resumen de resultados de humedad de diferentes estudios referenciados en el presente proyecto los cuales fueron realizados entre Colombia y Perú principalmente.

Al ser el yacón un fruto con un alto contenido de agua, esta propiedad es una de las más importantes a tener en cuenta en el proceso de caracterización del yacón para la fermentación con *A.niger*, por lo tanto se rectificó por medio de los resultados de los tratamientos primarios realizados al fruto los cuales se especifican en la sección 2.2.5. a tratamientos primarios del presente proyecto.

### **2.1.2. Determinación del porcentaje de cenizas**

La determinación de cenizas se calcula por medio de la norma AOAC, en la cual inicialmente se requiere hacer un secado de las capsulas y tapas a utilizar para evitar mediciones inexactas, esto se realiza en una estufa durante 15 minutos y en un desecador por otros 15 minutos,

una vez preparados, los recipientes son pesados y se procede a colocar las muestras de tubérculo sobre ellas, se realiza la medición de pesaje inicial y luego se lleva a una mufla a 550°C por 8 horas, se realiza un pre enfriamiento en la mufla y finalmente se lleva a un desecador por 30 min, el resultante final es pesado para su posterior análisis. [6]. El porcentaje de cenizas permite evaluar la cantidad de materia inorgánica presente en el yacón. Este porcentaje se determina por medio de la ecuación que se presenta a continuación, donde se tomaron en cuenta 3 diferentes pesos siendo  $m_0$  la masa de la capsula vacía,  $m_1$  el peso de la cápsula con la muestra inicial y  $m_2$  el peso de la cápsula posterior al procedimiento de horneado.

$$\%Cenizas = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} * 100$$

Los resultados obtenidos para el porcentaje de cenizas se resumen en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.**

*Comparación de resultados de la prueba de cenizas entre diferentes estudios realizados al yacón*

Referencias	%Cenizas
V. M. Barreto <sup>[6]</sup>	0.5132- 3.367
DL. López Torrez <sup>[9]</sup>	5.1
D. Salvatierra <sup>[11]</sup>	2.03
J.C. Salazar <sup>[14]</sup>	1.072

*Nota.* Diferentes resultados en estudios realizados al yacón los cuales fueron referenciados en el presente proyecto.

De acuerdo a estos resultados se tomó en cuenta el rango presentado en el trabajo base, donde se acobijan los resultados del resto de estudios realizados, por lo tanto, el porcentaje de cenizas del yacón oscila entre 0.5132- 3.367 %.

### **2.1.3. Determinación de densidad**

Esta prueba se determina con los estándares de la norma NTC 926 “Almidón de maíz y alimentos” por medio del método de diferencia de volúmenes; para ello se toma una muestra de tubérculo con el fin de realizar su respectivo pesaje, posteriormente se afora una probeta a partir de 80 ml de agua destilada, luego se coloca la muestra dentro de la probeta y se determina la

diferencia de volumen que se produce [6]; una vez obtenido el dato de peso y de volumen de la muestra se determina el dato por medio de la fórmula de densidad presentada a continuación:

$$\rho = \frac{m}{V}$$

El promedio de los resultados junto con su análisis estadístico se muestra en la **Tabla 4**.

**Tabla 4.**

*Comparación de resultados de la prueba de densidad entre una muestra de yacón fresco y una muestra pre tratada*

	Promedio	Desviación	Error
<b>Densidad yacón fresco</b>	1,0076	0,0030	0,015
<b>Densidad yacón pretratado</b>	1,0132	0,0076	0,004

*Nota.* Resultados de la prueba de densidad. Tomado de: Desarrollo de una propuesta para el diseño conceptual de la producción de un edulcorante a base de yacón. [6]

Como mencionado al inicio del capítulo, el yacón pre tratado en este proyecto hace referencia a un yacón que se sometió a un proceso de blanqueado y secado para realizar las pruebas de caracterización, y comparar los comportamientos de estas dos muestras.

“Se determinan los intervalos de el análisis estadístico del yacón fresco y pre tratado así mismo como sus intervalos de confianza los cuales son [0,998-1,208], [1,0017- 1,01348] y [1,006-1,021], [0,978-1,037] respectivamente.” [6]

#### **2.1.4. Determinación de pH**

Se comparó la determinación de pH de diferentes trabajos con los cuales se estableció un rango de pH del yacón. En el trabajo base se utilizó el estándar de calidad de la norma NTC 4592 “productos de frutas y verduras determinación de pH” en el cual se realiza la medición a partir de un pH-metro debidamente calibrado a una muestra homogenizada de peso conocido y se realiza una toma de datos directa. [6].

Los diferentes rangos y resultados obtenidos de esta propiedad se muestran en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.**

*Comparación de resultados de la prueba de pH entre diferentes estudios del yacón*

<b>Referencia</b>	<b>pH</b>
V. M. Barreto <sup>[6]</sup>	6.072 - 6.725
D. Salvatierra <sup>[11]</sup>	6.14
J.C. Salazar <sup>[14]</sup>	6.1

*Nota.* Comparación entre tomas de pH del yacón en diferentes estudios referenciados en el presente proyecto.

De acuerdo a estos resultados se tomó en cuenta el rango principal del trabajo base, donde se acobijan los resultados del resto de estudios realizados, por lo tanto, el pH del yacón oscila entre 6.072- 6.725. El pH se rectificó por medio de los resultados de los tratamientos primarios realizados al fruto en el presente proyecto con el fin de rectificar la información de la **Tabla 5**.

#### **2.1.5. Determinación de FOS (fructooligosacáridos)**

La prueba de determinación de fructanos de tipo inulina presentes en el yacón varía entre trabajos puesto que se sometió al fruto a varias pruebas para una caracterización más específica respecto al contenido de azúcares. El método principal de determinación es el método de Miller [16] donde se miden los azúcares presentes en el fruto antes y después de un proceso de hidrólisis y de esta manera calibrar el contenido de FOS. Para el cálculo en el trabajo base se realizó una curva de calibración de azúcares reductores puesto que este método requiere de una lectura en espectrofotómetro, esto se hizo a partir de la ecuación que se muestra a continuación en la cual se representan los azúcares reductores (ADR) posterior y previo al proceso de hidrólisis.

$$FOS = ADR_{final} - ADR_{inicial}$$

En la **Tabla 6** se comparan los resultados de contenidos de FOS presentes en el yacón donde se rectifica que este factor puede variar con facilidad.

**Tabla 6.**

*Comparación de resultados de la prueba de FOS entre diferentes estudios del yacón en una base de 100 gr*

Referencias	FOS
V. M. Barreto <sup>[6]</sup>	36.7- 55.3 (g/mL)
D. Salvatierra <sup>[11]</sup>	65.33%

*Nota.* Resultados de pruebas de Miller para la determinación de FOS en diferentes estudios referenciados en el presente proyecto.

Estas pruebas en ambos trabajos se ven modificadas por el tiempo de almacenamiento del fruto puesto que, como se menciona anteriormente, cuando el yacón se empieza a degradar sus componentes se reducen, este valor varía dependiendo al tiempo de almacenamiento y el estado del fruto, además el proceso de hidrólisis afecta significativamente la concentración de azúcares presentes, ya que depende del método seleccionado (hidrólisis ácida o enzimática) y su precisión al ser ejecutado, por lo tanto, los intervalos se amplían y en este caso, oscilan entre 36.7 y 65.33.

### **2.1.6. Composición nutricional**

Adicional a las características fisicoquímicas anteriormente mencionadas, se realizó una búsqueda bibliográfica de las propiedades nutricionales del yacón dando una estimación de rangos de las principales propiedades acordes a las referencias mencionadas como se describe en la **Tabla 7**.

**Tabla 7**

*Composición nutricional del yacón*

Referencia	Propiedad					
	Carbohidratos	Proteínas	Grasa	Fibra	Calcio	Fosforo
Seminario J <sup>[4]</sup>	89-127 (g/kg)	2.7- 4.9 (g/kg)	112-464 (mg/kg)	3.1- 4.1 (g/kg)	56-131 (mg/kg)	182-309 (mg/kg)
DL. López Torrez <sup>[9]</sup>	12.5 (g/100g)	0.4- 2 (g/100g)	0.1-0.3 (g/100g)	0.3- 1.7 (g/100g)	23 (mg/100g)	21 (mg/100g)
J.C. Salazar <sup>[14]</sup>	12.5 (g/100g)	0.3 (g/100g)	0.3 (g/100g)	0.5 (g/100g)	23 (mg/100g)	21 (mg/100g)

*Nota.* Se presentan las principales propiedades nutricionales del yacón junto con los rangos en los que se encuentra.

El fruto presenta un bajo contenido de grasas, vitaminas, proteínas y minerales como se aprecia en la **Tabla 7**, sin embargo, como mencionado anteriormente presenta la mayoría de su peso en agua y carbohidratos en forma de fructooligosacáridos dando un rango entre 89- 127 g/kg, razón por la cual se le atribuye el mejoramiento de las funciones fisiológicas y la disminución del riesgo de enfermedades en los humanos. Además de las propiedades presentadas en la **Tabla 7**, la raíz acumula cantidades importantes de potasio, compuestos polifenólicos, sustancias antioxidantes.

## **2.2. Propiedades del yacón como sustrato para la fermentación con *Aspergillus niger***

En los procesos de fermentación hay que tener en cuenta la naturaleza del agente fermentador, (es decir el que realiza el proceso metabólico), por lo tanto, es importante conocer las condiciones en las cuales este logra reproducirse y logra producir el metabolito de interés. En esta sección se describen las condiciones de fermentación con *Aspergillus niger*.

### **2.2.1. Condiciones óptimas de fermentación**

La producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger* requiere de condiciones específicas para que esta se efectúe, entre estas se encuentra la temperatura, el pH, la aireación, y la presentación de las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo. La temperatura y el pH son dos factores cruciales en el desarrollo del cultivo del hongo ya que es un organismo mesófilo y neutrófilo. Estudios previos indicaron un crecimiento óptimo a los 30°C y en pH entre 5-7. En la **Tabla 8** se encuentra un resumen de las condiciones de fermentación según diferentes estudios.

**Tabla 8.***Condiciones generales para fermentar con Aspergillus niger.*

Propiedad	Referencia				
	J.A. Velásquez [2]	O. Sanchez [3]	M.B Rosas [5]	A. Sáez Vega [13]	J. S. Alvarez [19]
Temperatura	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C
Ph	4.0-6.0	5	-	2,2	-
Fuente de carbono	Hidrólisis de cáscara de plátano	Hidrolizado de suero de leche	Hidrólisis de Cachaza	Sacarosa	Sacarosa
Fuente de nitrógeno	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
Fuente de fósforo	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Agitación	350rpm	180rpm	-	-	200rpm

**Nota.** Rangos permisibles de las propiedades fundamentales para la fermentación tomadas de distintos estudios referenciados en el presente proyecto.

A partir de la **Tabla 8** se determinaron las propiedades más importantes al momento de fermentar con *A. niger* para la producción de ácido cítrico, de estas propiedades se resalta que la temperatura, la fuente de nitrógeno y la fuente de potasio se mantienen constantes en todas las referencias. La temperatura se mantiene a 30°C, la fuente de nitrógeno es nitrato de amonio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) y la fuente de potasio es fosfato di potásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>); el pH es una de las propiedades que presenta mayor cambio entre referencias, siendo esta una de las más estudiadas, obteniendo un rango óptimo entre 4-6. Finalmente, la propiedad de agitación no es una propiedad indispensable, sin embargo, estimula el crecimiento de biomasa presentado en la fermentación, dando rangos de 180rpm a 350rpm.

### 2.2.2. Fuentes de nitrógeno

Según las referencias [2], [3] y [5] para la obtención de ácido cítrico por medio de fermentación con *Aspergillus niger*, se requiere una fuente de nitrógeno la cual se ha presentado en su mayoría como nitrato de amonio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) en concentraciones entre 2.3 – 2.5 g/l.

### **2.2.3. Fuente de carbono**

Acorde con las referencias [13] y [19], el hongo *Aspergillus niger* es capaz de producir altas cantidades de ácido cítrico cuando su medio de cultivo cuenta con una considerable fuente de azúcares; convencionalmente es utilizado melaza proveniente de caña de azúcar para proporcionar los carbohidratos necesarios, sin embargo, se siguen realizando múltiples estudios con otros sustratos que sustituyan la melaza y cumplan la misma función, siempre y cuando estos sustratos cuenten con una alta cantidad de azúcares fermentables para que los rendimientos no se vean afectados.

### **2.2.4. Fuentes de fósforo**

Acorde con la referencia [18], la presencia de fósforo es indispensable para las fosforilaciones del sustrato, la producción de ATP/ADP y la síntesis de ADN/ ARN de células en crecimiento, sin embargo, los rendimientos de ácido cítrico aumentan bajo concentraciones mínimas del micronutriente, por lo que su composición dentro del cultivo es la más baja. El compuesto que más se utiliza para suplemento de fósforo es el fosfato di potásico ( $K_2HPO_4$ ); este también cumple una función de amortiguador de pH dentro de la fermentación.

### **2.2.5. Pre - tratamiento del yacón**

Con la anterior información se procedió a adaptar el yacón para su uso como sustrato con la finalidad de modificar su estructura molecular y concentrar los azúcares fermentables presentes en este.

2.2.5.a Tratamientos primarios. Primero se seleccionó el tubérculo según sus características organolépticas como: aroma dulce, textura lisa, crujiente y tamaño aproximado entre 10 y 15 cm. Este se obtuvo de la plaza de Paloquemao la cual se abastece de la ciudad de Ibagué, a continuación, en la **Figura 7** se presenta el yacón seleccionado.

**Figura 7.**

*Yacón pelado y sin pelar*



*Nota.* Foto tomada durante el proceso experimental de laboratorio posterior al proceso de lavado y pelado.

Una vez terminado el proceso de selección, la materia prima se sometió a un proceso de lavado y pelado tal como se aprecia en la **Figura 7**. Donde se retiró cualquier agente contaminante o residuo indeseado producto de su cosecha, la materia prima obtenida se cortó en pedazos pequeños y se pesó en una báscula para determinar la masa inicial de materia prima y calcular posteriormente pérdidas de masa en el proceso.

El producto obtenido fue llevado a un blanqueamiento con agua destilada a 78°C por 6 minutos, esto se hace con el fin de evitar que la materia prima se oscurezca y pierda textura bloqueando las enzimas interiores que se liberan al realizar el proceso de lavado y pelado, a continuación, en la **Figura 8** se presenta el producto final posterior al blanqueado.

### **Figura 8.**

*Yacón posterior al proceso de blanqueado*



*Nota.* Se aprecia al yacón posterior al blanqueado para finalizar la remoción de impurezas e inhabilitar enzimas responsables de degradación.

Una vez el proceso de blanqueo, el yacón obtiene una coloración más clara evidenciándose la remoción de impurezas tal como se aprecia en la **Figura 8**. Posteriormente se realizó un proceso de secado en una mufla a 100°C por 8 horas, con el fin de reducir porcentaje de humedad y concentrar azúcares totales, el resultado final fue pesado y molido para la posterior obtención del extracto.

Los datos referentes al peso de la materia prima antes y después de los tratamientos primarios fueron organizados en tablas para posteriormente utilizarlos en el cálculo del porcentaje de humedad presente en el yacón.

Para la producción del extracto se realizó un licuado a la mezcla en relación 1:30 entre agua destilada y yacón, después se centrifuga a 1000 rpm por 30 minutos y se almacenó en un recipiente plástico sellado, a 4°C para evitar su descomposición.

Finalmente se calculó el rendimiento global de este primer pretratamiento para tener un dato aproximado de la cantidad de extracto obtenido a partir de la materia prima ingresada al

proceso, el rendimiento de la remoción de humedad se calcula con la ecuación de rendimiento en la cual se representa  $P_i$  como la materia prima previo al proceso y  $P_f$  como el producto resultante posterior al proceso.

$$R = \frac{p_i - p_f}{p_i} \times 100\%$$

A continuación, se presenta el resumen de los procesos realizados los tratamientos primarios del yacón en la **Figura 9**.

**Figura 9.**  
*Tratamientos primarios del yacón*



*Nota.* Diagrama de flujo del proceso de extracción de azúcares del yacón.

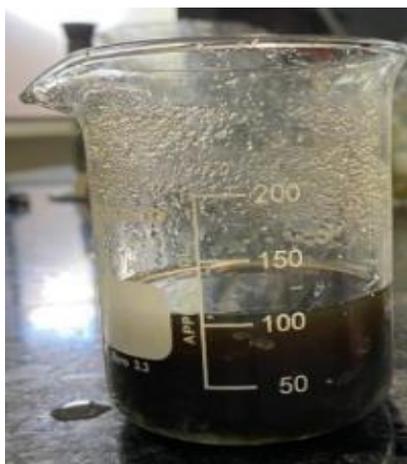
En el tratamiento primario se destacan los procesos de secado y centrifugado; el secado permite un cálculo del agua removida y la cantidad de humedad presente en el yacón, lo que rectifico la información encontrada en la búsqueda bibliográfica, por otra parte, el producto final del centrifugado fue el punto de interés de estos tratamientos primarios puesto que este contiene un extracto el cual concentra los azúcares presentes en el yacón.

2.2.5.b Tratamientos secundarios. Una vez obtenido el extracto de yacón se requiere reducir el tamaño molecular de sus carbohidratos, esto se realizó a partir de una hidrólisis ácida para la cual se tomó el extracto obtenido y se calentó a baño maría hasta alcanzar los 70°C, una vez se alcanzada la temperatura deseada se adicionó HCl al 37% en proporción 1:1 con el extracto, manteniendo la temperatura constante, esta mezcla se dejó reaccionar durante 20 minutos para que alcance una mayor concentración de azúcares reductores.

El producto resultante se neutralizó a partir de NaOH al 15%, este proceso se realizó bajo mediciones de pH constante para evitar saltos extremos de ácido-base y que el hidrolizado funcione como un ambiente óptimo para el microorganismo; finalmente y con el fin de conservar el producto final, el hidrolizado se almacenó en un recipiente sellado herméticamente y se llevó a congelación para controlar actividad enzimática y microbiana. En la **Figura 10** se presenta el sustrato final obtenido.

**Figura 10.**

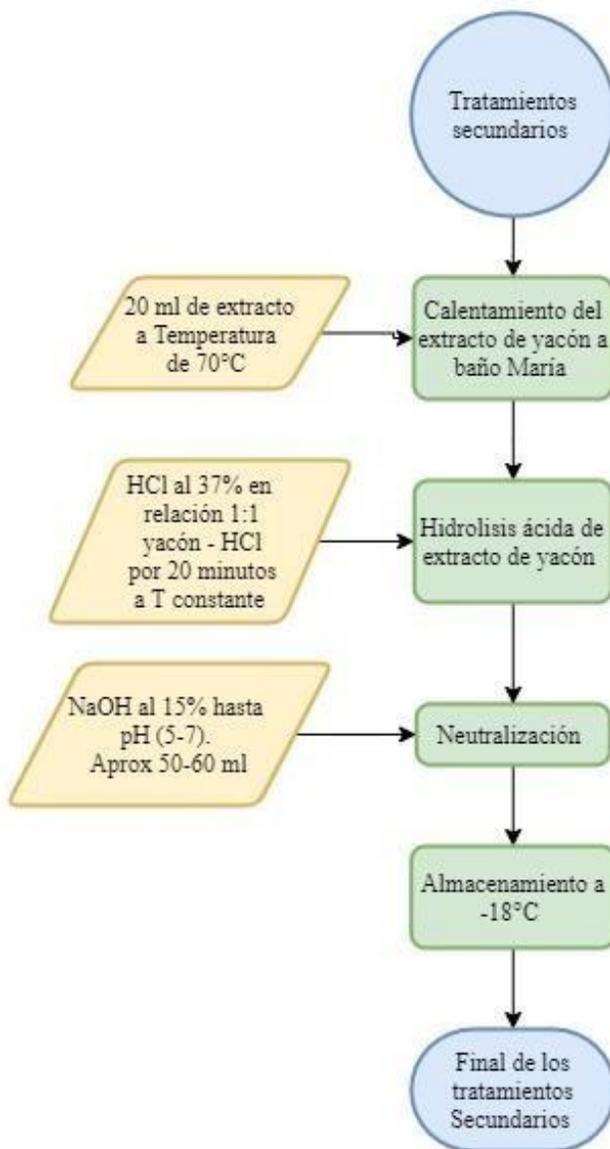
*Materia prima posterior al proceso de hidrolizado*



**Nota.** Resultante del tratamiento secundario (hidrólisis ácida).

El hidrolizado obtenido se realizó a partir de 30 ml de extracto de yacón y 30 ml de HCl, por lo que la cantidad sobrante corresponde a la cantidad de hidróxido de sodio que se añadió para el proceso de neutralización, obteniendo así aproximadamente 100 ml de extracto hidrolizado tal y como se observa en la **Figura 10**, en la cual también se evidencia un cambio de coloración de la materia prima debido a una degradación de las moléculas de yacón que se produjo durante la hidrólisis, obteniendo una coloración negra característica de la presencia de cadenas más cortas de moléculas de carbohidratos [36]. A continuación, se presenta el resumen de los procesos realizados en el tratamiento secundario del yacón en la **Figura 11**.

**Figura 11.**  
*Tratamientos secundarios del yacón*



**Nota.** Diagrama de flujo que se siguió para el proceso de hidrólisis del extracto de yacón junto con especificaciones de temperaturas y tiempos a seguir.

En el tratamiento secundario realizado al yacón se destaca el proceso de hidrólisis, el cual es un proceso sensible a la temperatura, razón por la cual es necesario mantener la muestra aislada del medio ambiente mientras que se completa la reacción; por otra parte, el proceso de neutralización debe hacerse bajo mediciones continuas de pH, ya que este mismo cambia drásticamente sin un debido control del hidróxido de sodio que se adiciona, por lo cual este

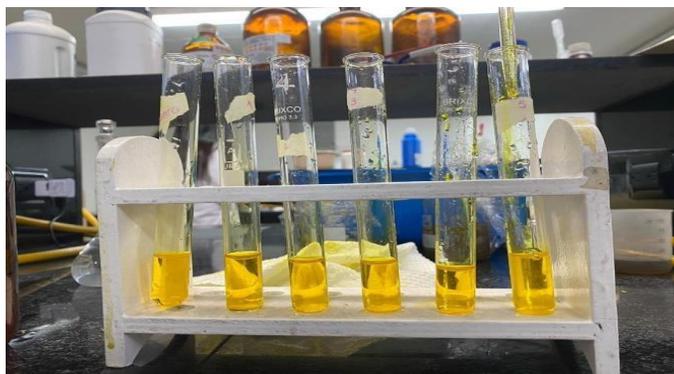
proceso debe hacerse por goteo hasta alcanzar un pH adecuado para el crecimiento del microorganismo.

### **2.2.6. Cuantificación de azúcares reductores**

El método utilizado para cuantificar los azúcares reductores presentes en el sustrato es el de Miller [16], el cual determina los azúcares reductores presentes a partir de espectrofotometría a una longitud de onda de 540nm, para ello fue necesario realizar una curva de calibración a partir de una disolución de concentraciones conocidas de glucosa junto con el reactivo DNS (ácido 3,5dinitrosalicílico), el cual presenta una tonalidad amarilla. Este, al reaccionar con los azúcares reductores presentes forma moléculas de ANS las cuales se caracterizan por su tonalidad rojiza, en la **Figura 12** se observa el desarrollo experimental de la curva de calibración para la cuantificación de azúcares, la descripción de esta se puede encontrar de forma explícita en el **Anexo A**.

**Figura 12.**

*Desarrollo experimental curva de calibración de azúcares*



**Nota.** Muestras de glucosa en distintas concentraciones (0 ml; 0,4 ml; 0,8 ml; 1,2 ml; 1,6 ml; 2 ml) que fueron posteriormente cuantificadas por espectrofotometría como se especifica en el **Anexo 1**.

Una vez obtenida la curva de calibración se tomaron los datos de absorbancia tanto del extracto obtenido en el tratamiento primario como del neutralizado obtenido en el tratamiento

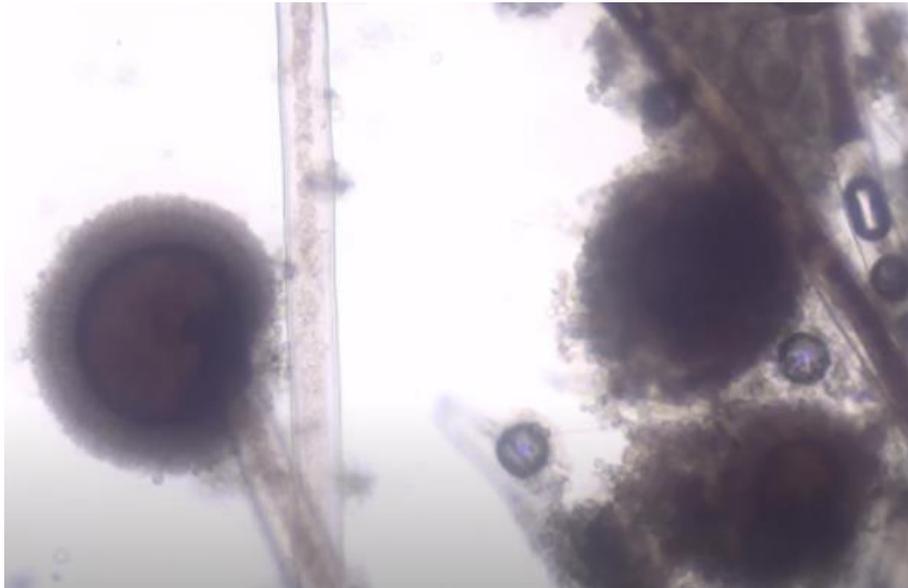
secundario y se registraron los datos de concentración de azúcar a través de la fórmula obtenida al construir la curva de calibración.

### **2.2.7. Obtención de la cepa *Aspergillus niger***

Para la obtención del microorganismo se contactó al cepario de la Pontificia Universidad Javeriana la cual cuenta con la cepa *Aspergillus niger* CMPUJH002 la cual se mantuvo aislada y en refrigeración a 4°C. A continuación, en la **Figura 13** y la **Figura 14** se presenta la caracterización microscópica realizada en laboratorio de la cepa en montaje en fresco a 40x, estas imágenes muestran algunas partes de la taxonomía del género *Aspergillus* explicada en el marco teórico del presente proyecto.

#### **Figura 13.**

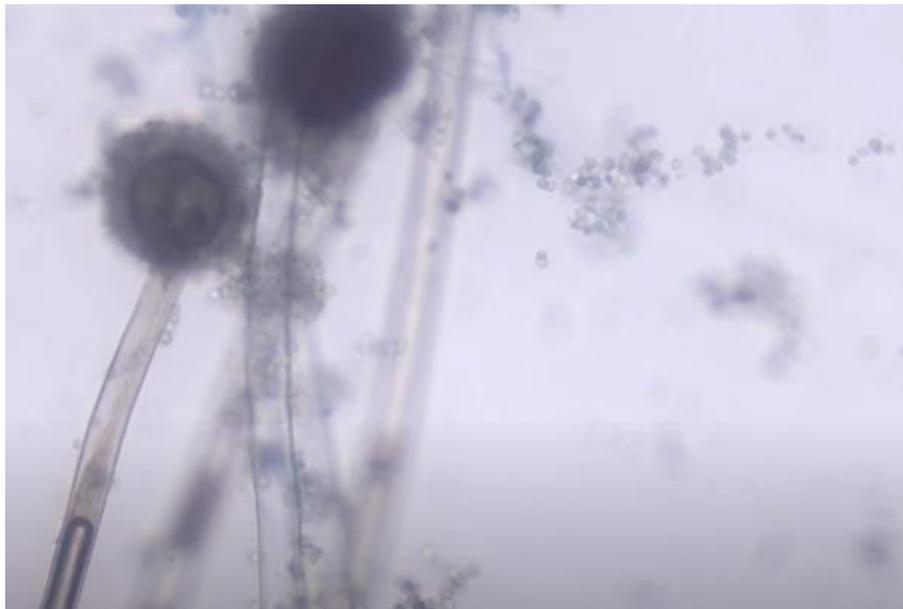
*Imagen microscópica de Aspergillus niger*



**Nota.** Formación de hifas y conidios de *Aspergillus niger* 40X.

## Figura 14

*Hifas, conidióforo y esporas de Aspergillus niger*



**Nota.** Formación de hifas y conidios junto con formaciones de esporas 40X.

### 2.2.8. Preparación del caldo Sabouraud (blanco)

Con el fin de tener un punto de referencia experimental se preparó el caldo Sabouraud, el cual se utiliza como blanco ya que este es un medio de cultivo estándar para este tipo de microorganismos acidúricos, este se compone principalmente de dextrosa el cual funciona como carbohidrato fermentable, además vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales junto con una mezcla de peptonas las cuales proporcionan el nitrógeno necesario. [23]

Para la fermentación se prepararon 75 ml de caldo Sabouraud en un Erlenmeyer de 250ml, el cual se selló con un tapón de algodón envuelto en gasa y se cubrió la boquilla con aluminio, este fue posteriormente esterilizado a 121°C, 15 psi, durante 15 min.

### 2.2.9. Fermentación

El Procedimiento de fermentación se basó en la tesis “Production of citric acid by *Aspergillus niger* using molasses as substrate” [12]. La cual realiza una fermentación escala laboratorio usando melazas como sustrato.

El proceso de fermentación es muy sensible ante cualquier agente contaminante, por lo tanto, este se dividió en tres partes las cuales constituyen etapas críticas en el proceso de

producción de ácido cítrico; para la primera parte, se preparó un caldo de fermentación, para esto se tomaron tres Erlenmeyer de 100ml y en cada uno se añadió 30 ml de hidrolizado, adicionalmente se agregaron.

0.23gr de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  con el fin de asegurar una fuente de nitrógeno al microorganismo, junto con 0.1gr de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  el cual funcionó como una fuente de fósforo y un amortiguador de pH. Una vez se obtuvo la solución, se tomaron los datos iniciales de pH de cada uno de los Erlenmeyer, posteriormente se sellaron cuidadosamente con un tapón de algodón envuelto en gasa y se cubrió la boquilla con aluminio.

Para la segunda parte de la fermentación, los 4 Erlenmeyer ya sellados fueron marcados cada uno con cinta indicadora y se sometieron a esterilización en autoclave a  $121^\circ\text{C}$ , 15 psi, durante 15 min, junto con todos los implementos a usar para inocular cada una de las unidades experimentales (2 asas, 2 paquetes de 3 puntas azueles, entre otros). Una vez terminado el proceso de esterilización en autoclave, se espera a que la temperatura descienda alrededor de  $30^\circ\text{C}$  para realizar el proceso de inoculación.

Por último, en la cabina de flujo laminar debidamente desinfectada, se añadieron 3 discos de agar con cultivo crecido de *Aspergillus niger* en cada una de las unidades experimentales, estas muestras se llevaron a incubación a  $30^\circ\text{C}$  sin agitación por 8 días. A continuación, en la **Figura 15**, se presenta el resultado de esta última parte experimental antes y después de la fermentación respectivamente.

### Figura 15.

*Preparación de medios de cultivo antes de la fermentación.*



**Nota.** Medios de cultivo, de los cuales 3 son réplicas del hidrolizado de yacón y una muestra utilizada como blanco, compuesta por una solución de caldo Sabouraud.

### 2.3. Determinación de los rendimientos de producción de ácido cítrico

La determinación de ácido cítrico se realizó a partir de la fermentación con *Aspergillus niger* usando el extracto hidrolizado de yacón como sustrato. Esta determinación sigue la metodología descrita en “Obtención de ácido cítrico por medio de fermentación sumergida a partir de *Aspergillus niger* ATCC 16404 utilizando suero de leche como medio de cultivo de fermentación” [20]. Se tomaron los datos de pH en las muestras previo y posterior a la fermentación, seguido de esto se realizó una curva de calibración de ácido cítrico para determinar la producción de este mediante espectrofotometría.

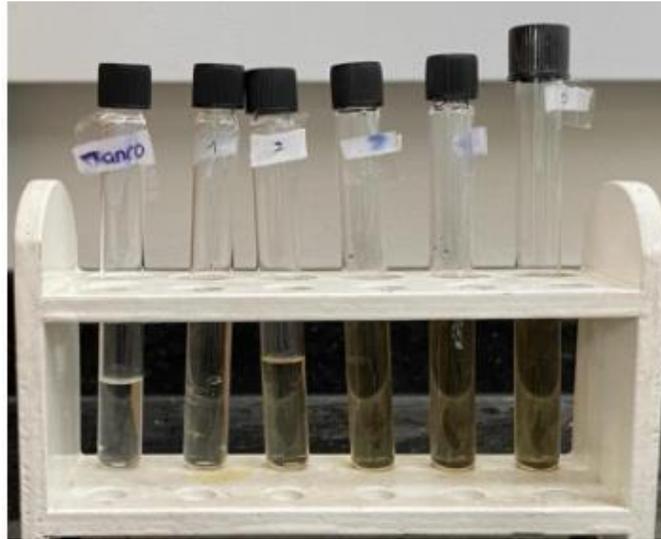
#### 2.3.1. Cuantificación de ácido cítrico

El método utilizado para cuantificar el ácido cítrico presente después de la fermentación fue el método de Saffran - Densted [20], el cual determina el ácido cítrico presente a partir de espectrofotometría a una longitud de onda de 518nm, para ello es necesario realizar una curva de calibración a partir de una disolución de concentraciones conocidas de ácido cítrico junto con anhídrido acético y piridina los cuales presentan una tonalidad amarilla opaca en presencia de ácido cítrico; en la **Figura 16**, se observa el desarrollo experimental de la curva de calibración para

la cuantificación de ácido cítrico, la descripción de esta se puede encontrar de forma detallada en el **Anexo B**.

**Figura 16.**

*Desarrollo experimental de la curva de calibración de ácido cítrico.*

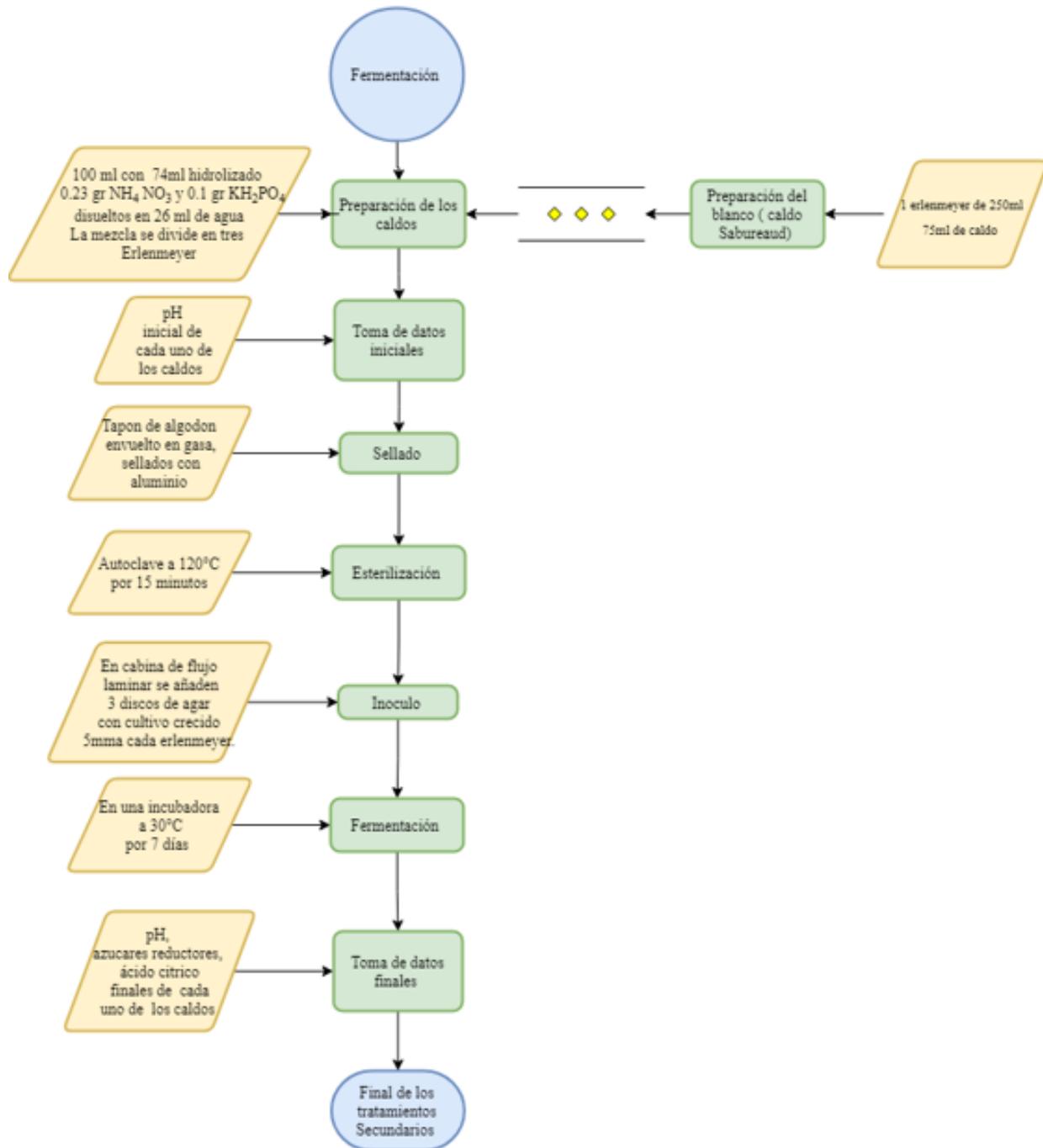


**Nota.** Muestras de ácido cítrico en distintas concentraciones (0 ml; 0,2 ml; 0,4 ml; 0,6 ml; 0,8 ml; 1 ml) que fueron posteriormente cuantificadas por espectrofotometría como se especifica en el **Anexo 1**.

Una vez obtenida la curva de calibración, las muestras de hidrolizados fermentados fueron procesadas junto con anhídrido acético y piridina y se registraron los datos de concentración de ácido cítrico a través de la fórmula obtenida al construir la curva de calibración. En la **Figura 17** se presenta el diagrama de flujo para el proceso de fermentación.

**Figura 17.**

*Diagrama de flujo del proceso de fermentación*



**Nota.** La figura muestra el proceso realizado en el proceso de fermentación, diagrama realizado por creación propia.

Durante el proceso de fermentación la esterilización de los equipos y materiales a usar es de vital importancia ya que *A. niger* es un hongo bastante contaminante y sensible a contaminación, por lo que, sin una adecuada manipulación, los resultados de fermentación se verían seriamente afectados por la presencia de otros microorganismos indeseados, así mismo esto podría afectar cualquier otro proceso que se esté llevando a cabo en laboratorio.

### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Una vez identificada y recopilada toda la información necesaria para el desarrollo del objetivo experimental, comienza la etapa de desarrollo a escala laboratorio. Esta etapa inicia con el proceso de selección de materia prima (yacón) para someterlo a extracción por medio del método utilizado en el artículo [21], posteriormente el extracto de yacón se hidrolizó con ácido clorhídrico al 37% como se muestra en la **Figura 10**. Por último, se realizó una fermentación con *Aspergillus niger* usando el hidrolizado de extracto de yacón fresco como sustrato. Con esto se calculó la cantidad de ácido cítrico producido en la fermentación, mediante el método Saffran Densted.

#### 3.1. Resultados extracto de yacón

Para los resultados del tratamiento primario de la materia prima se realizaron 3 principales tablas que contienen las mediciones de pesajes realizadas en el laboratorio, así como los cálculos obtenidos de algunas propiedades las cuales fueron necesarias para obtener un rendimiento global del proceso. La primera tabla se muestra a continuación como **Tabla 9** y muestra la medición obtenida de los pesajes de la materia prima al ingresar al sistema (denominada como “peso húmedo”) y los pesajes de la materia prima después del proceso de secado (denominada como “peso seco”).

**Tabla 9.**

*Peso y porcentajes de los tratamientos primarios*

Muestra	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	Agua removida (g)	%Humedad
Fresco	515.78	40.7	475.08	92.109
madurado 1 semana	388.32	42.14	346.18	89.148

*Nota.* Cálculo de la cantidad de agua presente en el yacón con el fin de calcular porcentaje de humedad removida.

A partir de la diferencia entre el peso húmedo y peso seco se obtuvo la cantidad de agua que fue removida del yacón en el proceso de secado, así mismo se obtuvo el porcentaje de humedad el cual tiene un valor de 92.10% y 89.14% para las muestras de yacón fresco y de yacón madurado respectivamente; estos valores obtenidos son acordes a la **Tabla 2** presentada en el inciso de

caracterización del yacón, la cual describe los rangos de humedad del yacón según la bibliografía referenciada, los datos obtenidos experimentalmente en esta primera tabla corroboran la información teórica suministrada y también acentúan una de las principales características del tubérculo la cuál es su alta cantidad de agua.

La segunda tabla la cual se presenta como **Tabla 10** expone la medición de pesaje de la materia prima posterior al proceso de molienda, esto con el fin de calcular las pérdidas de los tratamientos primarios que se dieron por transferencia de masa entre equipos; adicionalmente se muestra la cantidad de extracto obtenido (denominada como “peso centrifugado”) para cada una de las muestras, el cual es el producto de interés de este primer tratamiento.

**Tabla 10.**

*Resultados del proceso de extracto de yacón*

<b>Muestra</b>	<b>Peso posterior a molienda (g)</b>	<b>Agua agregada de licuado (ml)</b>	<b>Peso centrifugado (g)</b>	<b>%Perdidas</b>
Fresco	37.55	1100	127.716	7.740
madurado 1 semana	39.72	1200	153.384	5.743

*Nota.* Cálculo de las pérdidas por molienda y la cantidad de extracto obtenido el cual se representa en la tabla como “peso centrifugado”.

Durante los tratamientos primarios se registraron pérdidas de entre 5,743 y 7,740%, estas se dan durante las transferencias de masa entre equipos ya que, el yacón una vez secado, se torna de una consistencia pegajosa lo cual dificulta la manipulación de este y la selección de recipientes a utilizar. El cálculo de las pérdidas durante el proceso es de gran importancia ya que puede ser un factor a tener en cuenta al realizar el análisis de la cantidad de extracto obtenido y el rendimiento global calculado, en este caso las pérdidas no son considerablemente altas y no se consideran un factor trascendental al analizar la cantidad de extracto producido.

Finalmente se logró obtener un porcentaje de rendimiento global para este tratamiento primario, esto se realizó a partir de la materia prima inicial ingresada al sistema la cual se representa en la **Tabla 9** como “peso húmedo” ( $P_h$ ) y el extracto final obtenido representado en la

**Tabla 10** como “peso centrifugado” ( $P_c$ ), el porcentaje de rendimientos se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$R = \frac{p_h - p_c}{p_h} \times 100\%$$

El resultado de los cálculos realizados se encuentra a continuación en la **Tabla 11**.

**Tabla 11.**

*Rendimientos del proceso de extracto de yacón*

<b>Extracto del yacón</b>	<b>% Rendimiento entre peso húmedo y peso centrifugado</b>
Fresco	24,76
Madurado 1 semana	39,50

*Nota.* Diferentes rendimientos del proceso de extracto de yacón teniendo en cuenta la masa inicial.

En la **Tabla 11** se muestra el rendimiento de la cantidad de extracto que se logra obtener con respecto a la materia prima ingresada; el yacón, al ser un tubérculo que contiene aproximadamente el 90% de su peso en agua, presenta una disminución considerable de materia una vez que se finaliza el proceso de secado, por lo cual los rendimientos globales obtenidos son acordes a la alta cantidad de agua removida al yacón ingresado.

Adicionalmente se realizó una medición por triplicado de pH en el extracto de yacón obtenido, esto con el fin de tener un registro de las condiciones iniciales del yacón previo a los tratamientos químicos a realizar (hidrólisis), estos datos se encuentran a continuación en la **Tabla 12**.

**Tabla 12.**

*pH del extracto de yacón*

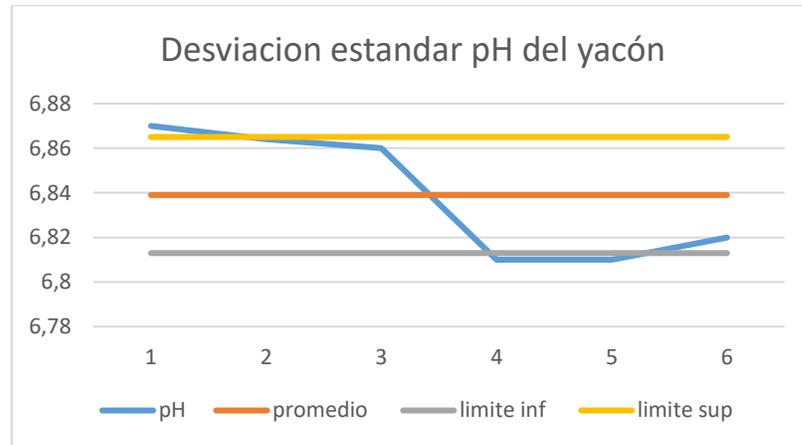
<b>pH del extracto de yacón</b>		
<b>Propiedad a evaluar</b>	<b>pH Yacón fresco</b>	<b>pH Yacón Madurado</b>
Ensayo 1	6.87	6.81
Ensayo 2	6.86	6.81
Ensayo 3	6.86	6.82
<b>Promedio</b>	6.865	6.813
<b>Varianza</b>	0.000	0.000
<b>Desviación estándar</b>	0.005	0.006

*Nota.* Ensayos de la toma de pH junto con el cálculo de varianza y desviación estándar.

El pH se determinó a partir de un medidor de pH digital SI Analytics, obteniendo resultados de 6.865 y 6.813 en sus respectivas muestras, estos datos son acordes a la **Tabla 6** presentada en el inciso de caracterización del yacón, la cual describe los rangos de pH del yacón según la bibliografía referenciada, los datos obtenidos experimentalmente en la **Tabla 12** corroboran la información teórica suministrada. Confirmando la neutralidad del yacón en su pH. A continuación, en la **Figura 18** se presenta la gráfica de los datos estadísticos calculados para las muestras de pH, esto con el fin de visualizar el error de las mediciones experimentales.

**Figura 18**

*Desviación estándar del pH del extracto de yacón*



**Nota.** Gráfica de la desviación estándar del pH del extracto de yacón con los límites en los que los datos se encuentran.

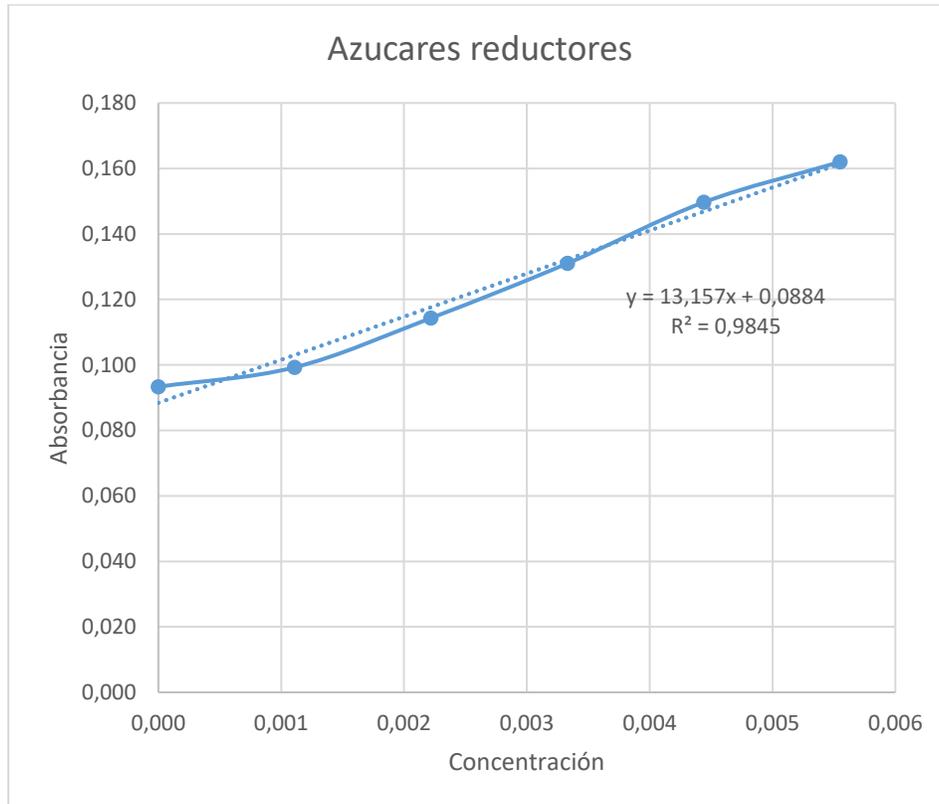
Los datos registrados se encuentran en un rango seguro de confianza, respaldados en la gráfica estadística de desviación estándar, donde se evidencia una mínima diferencia entre los datos experimentales de pH, no obstante, al ser estos 6 datos, son sensibles a cualquier diferencial entre ellos, como se ve en la **Figura 18** el primer dato encuentra fuera del límite superior junto con dos que se encuentran cerca del rango inferior.

### **3.2. Hidrólisis**

Se comprobó la efectividad del proceso de hidrólisis cuantificando los azúcares reductores obtenidos, esto se hizo a partir de la comparación entre la concentración de azúcares simples que se cuantificaron posterior a la hidrólisis realizada (tanto para la muestra fresca como para la muestra madurada) con respecto a la concentración de azúcares reductores presentes en las dos muestras previo al tratamiento químico. Esta cuantificación se realizó a partir del método de DNS el cual se especifica en el **Anexo A**. A continuación, se presenta la curva de calibración obtenida en la **Figura 19**.

**Figura 19.**

*Curva de calibración técnica de DNS*



**Nota.** Gráfica entre absorbancia y concentración de glucosa junto con la ecuación que representa la recta formada.

El desarrollo de esta gráfica fue de vital importancia ya que esta permitió la obtención de la ecuación lineal tal como se observa en la **Figura 19**, esta ecuación fue la que se utilizó para el cálculo de azúcares reductores presentes en cada una de las muestras; a continuación, se presenta en la **Tabla 13** la cuantificación de azúcares reductores obtenida para las unidades experimentales (previo y posterior a la hidrólisis), así como para el caldo Sabouraud (blanco).

**Tabla 13.**  
*Resultados azúcares reductores*

<b>Muestra</b>	<b>Promedio de toma de absorbancia 540nm</b>	<b>Azúcares reductores (g/l)</b>
Caldo Sabouraud	1.410	17.591
Extracto fresco	0.857	10.239
Extracto madurado	0.432	4.589
Hidrólisis extracto fresco	1.003	12.185
Hidrólisis extracto madurado	0.701	8.165

*Nota.* Resultados de absorbancia y concentración de azúcares reductores presentes en las muestras.

A partir de la **Tabla 13** se logró hacer una comparación entre la concentración de azúcares reductores en el extracto fresco y la del extracto madurado, observando así, que la concentración del extracto fresco es considerablemente mayor, obteniendo un valor de 10.239g/L, hay que tener en cuenta que esta muestra se sometió inmediatamente a un proceso de blanqueamiento para inactivar sus enzimas y así evitar el proceso de oxidación de manera oportuna, lo que se vio evidenciado en una mejor conservación de sus azúcares reductores, mientras que el extracto madurado estuvo almacenado una semana previo al proceso de blanqueamiento, afectando la concentración de sus azúcares reductores, obteniendo un valor de 4.589 g/L.

En cuanto a la efectividad de la hidrólisis para las dos muestras, se evidenció que la hidrólisis del extracto para la muestra madurada tuvo un mejor alcance, aumentando la concentración de azúcares de un 4.589 g/L a un 8.165 g/L, esto se debe a que la temperatura se mantuvo más constante, ya que se realizaron menos intervenciones de medición, mientras que para el extracto fresco, si hubo una mayor intervención para realizar mediciones, lo que se vio reflejado en su rendimiento, no obstante, la hidrólisis que mayor concentración de azúcares reductores presentó fue de la muestra de extracto fresco, ya que los azúcares iniciales son mayores con respecto al de la muestra madurada.

Los resultados de azúcares reductores presentes en el caldo Sabouraud son de 17.591 g/L siendo un caldo rico en glucosa y otros nutrientes adecuados para *A. niger* lo cual se evidencia en su actividad fermentativa en términos de producción de ácido cítrico.

Finalmente se hizo un cálculo del rendimiento para el proceso; en la **Tabla 14**, se muestran los porcentajes de efectividad los cuales se calcularon a partir de la cantidad de azúcares reductores concentrados en los hidrolizados que se realizaron (denominado como  $AR_h$ ), y haciendo una comparación con respecto a los azúcares reductores presentes en las dos muestras de extracto (denominado como  $AR_e$ ). La ecuación utilizada para el cálculo se presenta a continuación.

$$R = \frac{AR_e - AR_h}{AR_e} \times 100\%$$

**Tabla 14.**

*Rendimientos de hidrolizado*

<b>Hidrolizado</b>	<b>% Rendimiento</b>
	<b>gramos azúcares obtenidos gramos azúcares extracto</b>
Hidrólisis del extracto fresco	19.00
Hidrólisis del extracto madurado	77.76

**Nota.** Cálculo del rendimiento con la ecuación de rendimiento.

Los datos presentados en la **Tabla 14** corroboran lo dicho anteriormente, pues se alcanzó un mayor rendimiento en el hidrolizado del extracto madurado, obteniendo un 77.76% de efectividad, sin embargo, el hidrolizado escogido para el proceso de fermentación fue el de la muestra de extracto fresco, ya que en este se realizó una mejor conservación de azucares iniciales a partir de un oportuno proceso de blanqueamiento, por lo que el hidrolizado del extracto fresco fue el que mayor concentración de azúcares reductores obtuvo y el que más se asemeja al del caldo Sabouraud.

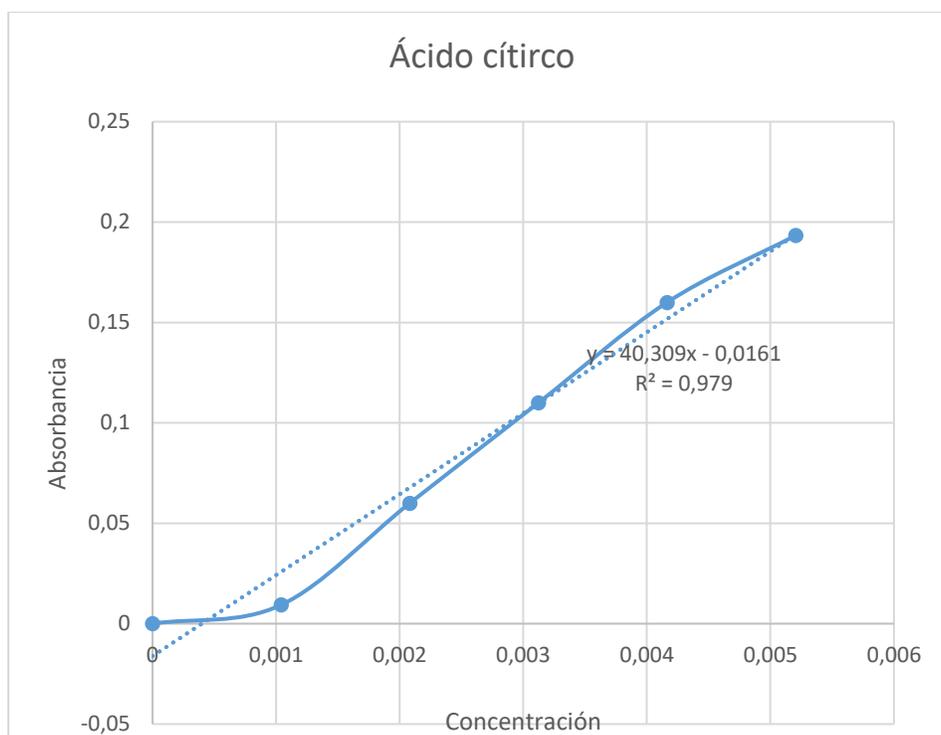
Cabe resaltar que en el proceso de hidrólisis no se separaron las sales remanentes producidas en la neutralización, afectando la concentración de azúcares reductores presentes finales en las dos muestras, esta separación no se realizó debido a la limitación de equipos.

### 3.1. Fermentación

Finalmente se comprobó la producción de ácido cítrico a partir de hidrolizado de yacón cuantificando la cantidad del metabolito obtenido para cada una de las unidades experimentales a partir del método de Saffran-Densted [20]. A continuación, se presenta la curva de calibración obtenida en la **Figura 20**. La construcción de la gráfica se describe en el **Anexo B**.

**Figura 20.**

Curva de calibración de ácido cítrico



**Nota.** Gráfica que se genera entre absorbancia y concentración de ácido cítrico junto con la ecuación que representa la recta formada.

Este método es similar al método de Miller utilizado anteriormente para la cuantificación de azúcares, obteniendo una ecuación lineal a partir de la curva graficada; a partir de esta ecuación se calculó la concentración de ácido cítrico presente en cada una de las muestras como se presenta en la **Tabla 15**.

**Tabla 15.**

*Ácido cítrico presente en cada muestra*

<b>Muestra</b>	<b>Promedio de toma de absorbancia</b>	<b>Ácido cítrico (mg/L)</b>
Caldo Sabouraud	0,144	0,017
Replica 1	0,058	0,005
Replica 2	0,067	0,006
Replica 3	0,076	0,007

*Nota.* Promedio de las tomas triplicadas de cada una de las muestras post fermentación.

En los resultados obtenidos en la **Tabla 15** se observa que la concentración de ácido cítrico en el caldo Sabouraud es considerablemente mayor con respecto a las tres unidades experimentales a estudiar, obteniendo un total de 0,0165 mg/L, este resultado destaca el hecho de que el caldo contenía una composición importante de nutrientes las cuales permitieron un mejor desarrollo en el metabolismo del microorganismo, mientras que las réplicas contenían apenas los nutrientes y fuentes de carbono ofrecidas por el hidrolizado más los dos compuestos agregados como amortiguador y fuente de nitrógeno, por lo que la cantidad de ácido cítrico obtenido es acorde a los nutrientes suministrados inicialmente para cada una de las unidades experimentales; sin embargo, se destaca la existencia de ácido cítrico en las muestras en las que se utilizó hidrolizado de yacón como sustrato, lo que comprueba que la finalidad general de esta primera parte de la fermentación se logró satisfactoriamente.

Los hidrolizados fermentados mostraron una concentración similar de ácido cítrico entre sí, sin embargo, se refleja una mínima diferencia debido a que las muestras pueden presentar pequeñas variaciones en la cantidad de hidrolizado añadido, causadas por pérdidas de masa en la transferencia de materia entre los recipientes utilizados, así mismo se le atribuyen leves cambios de temperatura.

Por otra parte, se tomaron los datos de los azúcares una vez finalizada la fermentación, con el fin de establecer una relación entre la fuente de carbono consumida con respecto a la producción del metabolito de interés, estos datos fueron registrados en la **Tabla 16** como se presenta a continuación.

**Tabla 16.***Azúcares presentes después de la fermentación*

<b>Azúcares presentes después de la fermentación</b>					
<b>Muestra</b>	<b>Azúcares reductores iniciales (g/l)</b>	<b>Promedio de toma de absorbancia</b>	<b>Azúcares reductores (g/l)</b>	<b>Azúcares consumidos</b>	<b>% Azúcares consumidos</b>
Caldo Sabouraud	17,591	0,361	3,645	13,946	79,280
Replica 1	12,185	0,129	0,565	11,620	95,363
Replica 2	12,185	0,124	0,503	11,682	95,872
Replica 3	12,185	0,128	0,556	11,628	95,436

**Nota.** Concentraciones de azúcares finales presentes al final del proceso en el blanco y los hidrolizados fermentados, tomados a partir de espectrofotometría.

Acorde con los datos obtenidos en la **Tabla 16**, los azúcares reductores en las réplicas fueron altamente aprovechados, obteniendo un porcentaje de azúcares consumidos para las unidades experimentales de entre 95.363% y 95.872% , mientras que el caldo Sabouraud (blanco) presenta un porcentaje de consumo del 79.280%; esto debido a que el caldo Sabouraud contenía una mejor proporción de nutrientes y no fue necesario para el microorganismo consumir la fuente de carbono en su totalidad para su mantenimiento celular, mientras que en las réplicas si le fue necesario un mayor consumo de carbohidratos para sobrevivir y poder llevar a cabo la producción de ácido cítrico en su metabolismo.

Acorde con Reyes [22], una excesiva concentración de glucosa puede ser contraproducente en el crecimiento de biomasa, ya que puede producir estrés osmótico y este genera un mayor gasto energético para mantenimiento celular, lo cual se ve reflejado en el no aumento de población; por otro lado, una fuente considerable de azúcares reductores en el proceso fermentativo trae consigo un aumento de ácido cítrico producido durante el mismo, lo cual conlleva a una disminución de ATP y por lo mismo una afectación en el crecimiento celular, de modo que, es necesario mantener una cantidad de glucosa adecuada en el proceso. En este caso, tal como se refleja en la **Tabla 13**, los azúcares presentes en el hidrolizado no llegan a ser lo suficientemente elevados para llegar a este equilibrio metabólico y generar cantidades significativas de ácido cítrico, reflejándose en los valores obtenidos de la **Tabla 16**.

Tal y como se expresa en el párrafo anterior, es importante una cantidad significativa de azúcares para poder obtener un mejor rendimiento en el ácido cítrico producido, en este caso la cantidad de azúcares simples al inicio de la fermentación es de 12.185 g/L para las réplicas y de 17,591g/L para el caldo Sabouraud, esto no se considera una cantidad significativa y da como resultado una producción de ácido cítrico muy bajo, por lo que se puede decir que los valores obtenidos son acordes a la cantidad de azúcares presentes en el proceso; esto se ve respaldado al realizar una comparación de los valores obtenidos en el presente proyecto con respecto a otros estudios realizados, a continuación en la **Tabla 17** se presentan los resultados obtenidos en algunos estudios referenciados.

**Tabla 17**

*Comparación entre producción de ácido cítrico y azúcares añadidos*

	<b>Propiedad</b>	<b>Ácido cítrico producido (g/L)</b>	<b>Azúcares añadidos</b>	<b>Rendimiento</b>
<b>Referencia</b>	J.A. Velásquez <sup>[2]</sup>	13.5	150g/L	0.090
	Rev. Colomb. Biotecn <sup>[3]</sup>	5.77	165.13g/L	0.035
	M.B Rosas <sup>[5]</sup>	11.18	900mL sustrato	0.012
	A.Sáez Vega. <sup>[13]</sup>	1.072	190g/L	0.006
	J. S. Alvarez. <sup>[19]</sup>	3.5	200g/L	0.018

**Nota.** Comparación ácido producido sustrato añadido, tomadas de distintos estudios referenciados en el presente proyecto.

En la **Tabla 17** se nota una constante en la producción de ácido cítrico respecto a los azucres añadidos, el mayor rendimiento alcanzado es de 0.09 % determinando así que el rendimiento de producción de ácido cítrico requiere una fuente significativa de azúcares reductores para lograr alcanzar una producción relativamente alta de ácido cítrico, así mismo se logra comprobar que los resultados obtenidos en el presente proyecto son acordes con respecto a otros

proyectos realizados, lo que permite ubicar al yacón como otro posible sustrato a utilizar para la producción de ácido cítrico mediante la fermentación con *A. niger*.

Finalmente se obtuvo la relación entre el ácido cítrico obtenido (AC) con respecto a los azúcares reductores consumidos durante el mismo, los cuales se calculan a partir de la diferencia entre los azúcares reductores iniciales ( $AR_i$ ) y finales ( $AR_f$ ), en la **Tabla 18** se presentan los datos obtenidos a partir de la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{Ácido cítrico}}{\text{Azúcares consumidos}} = \frac{AC}{AR_i - AR_f} \times 100\%$$

**Tabla 18.**

*Relación producto/sustrato consumido.*

Producción de metabolito sobre sustrato consumido	% Relación
	Ácido cítrico producido Azúcares consumidos
Caldo Sabouraud	0,00000118
Replica 1	0,00000047
Replica 2	0,00000057
Replica 3	0,00000066

**Nota.** Relación de la cantidad de ácido cítrico obtenido sobre los azúcares consumidos en la fermentación.

Como se demuestra en la **Tabla 18**, la producción de ácido cítrico con respecto al azúcar consumido es baja, esto indica que el consumo de carbohidratos no se inclinó hacia la producción de metabolito de interés, en vez de eso, el proceso pudo haberse inclinado hacia otros factores asociados con el metabolismo de *A. niger*, sin embargo, la concentración de ácido cítrico final tanto en el blanco como en las réplicas concuerda con la cantidad de azúcares reductores presentes en cada una de estas, manteniendo una correlación del flujo de carbono ingresado y la producción de metabolito de interés.

### 3.1.1. pH

Adicionalmente, se registraron por triplicado los datos de pH previo y posterior al proceso de fermentación ya que este factor incide sobre los procesos de transporte de la membrana

citoplasmática, por lo tanto, permite analizar como esto afecta la producción del metabolito de interés. Estos datos se muestran en la **Tabla 19**, y **Tabla 20**, donde además se especifican los valores estadísticos de los mismos.

**Tabla 19.**

*Datos de pH previo a la fermentación*

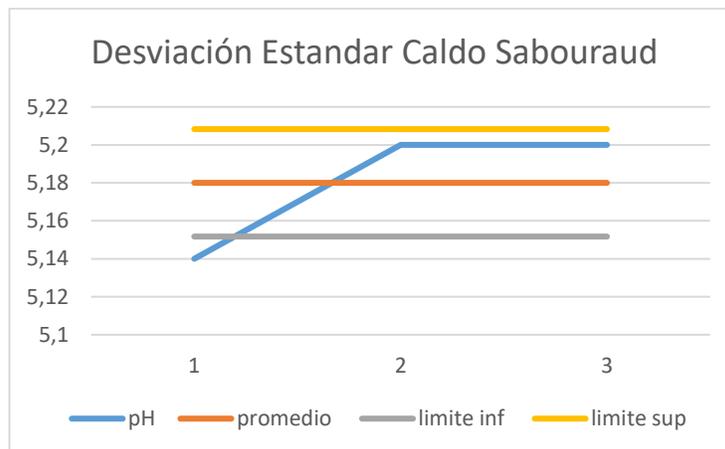
pH previo a la fermentación						
Muestra	pH inicial 1	pH inicial 2	pH inicial 3	Promedio	Varianza	Desviación estandar
Caldo Sabouraud	5,14	5,2	5,2	5,18	0,001	0,035
Replica1	6,1	6,14	6,28	6,173	0,009	0,095
Replica2	6,1	6,14	6,28	6,173	0,009	0,095
Replica3	6,1	6,14	6,28	6,173	0,009	0,095

*Nota.* Datos triplicados de pH previo a fermentación para cada muestra junto con sus cálculos estadísticos.

Adicionalmente, en la **Figura 21** se realizó un gráfico de la desviación estándar para el caldo Sabouraud construida a partir de los datos de la **Tabla 19**, con el fin de determinar la validez de los datos de pH del caldo tomados experimentalmente.

**Figura 21**

*Desviación estándar del caldo Sabouraud previo a fermentación*

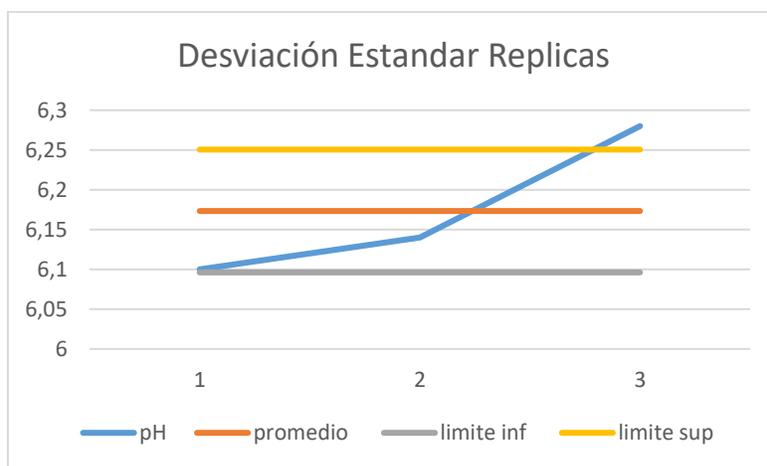


*Nota.* Grafica de la desviación estándar del pH del caldo Sabouraud previo a la fermentación con los límites en los que se encuentran los datos.

En la **Figura 21** se realizó un gráfico de la desviación estándar para las réplicas construida a partir de los datos de la **Tabla 19**, con el fin de determinar el nivel de confianza de los datos de pH de las réplicas tomados experimentalmente. Se evidencia una mínima diferencia entre los datos experimentales de pH, no obstante, al ser estos 3 datos, la gráfica es sensible a cualquier diferencial entre ellos, como se ve en la **Figura 21** el primer dato se encuentra fuera del límite inferior. Este mismo análisis se realizó para los datos obtenidos en las réplicas, tal como se presenta a continuación en la **Figura 22**.

**Figura 22**

*Desviación estándar de las réplicas previo a fermentación*



**Nota.** Se presenta la gráfica de la desviación estándar del pH de las réplicas previo a fermentación con los límites en los que los datos se encuentran.

En la **Figura 22** se presenta una relación similar a la de la **Figura 21**, esto es debido a que la cantidad de muestras obtenidas en laboratorio son las mismas, por lo que la probabilidad de error es similar. Este mismo análisis estadístico se ve a continuación para los datos de pH tomados posterior a la fermentación, los cuales se presentan a continuación en la **Tabla 20**.

**Tabla 20.**

*Datos de pH posterior a la fermentación*

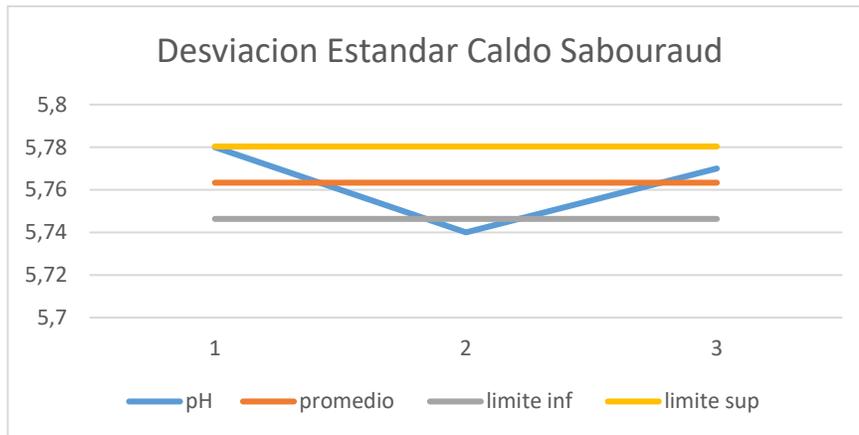
pH posterior a la fermentación						
Muestra	pH final 1	pH final 2	pH final 3	Promedio	Varianza	Desviación estandar
Caldo Sabouraud	5,78	5,74	5,77	5,763	0,000	0,021
Replica1	5,05	5,1	5,07	5,073	0,001	0,025
Replica2	5,01	4,99	5,06	5,02	0,001	0,036
Replica3	4,96	5,05	5,06	5,023	0,003	0,055

*Nota.* Datos triplicados de pH posterior a fermentación para cada muestra junto con sus cálculos estadísticos.

De forma adicional se presentan las gráficas de los cálculos estadísticos para los valores de pH que se obtienen en la **Tabla 20**; en este caso se muestran en las **Figuras 23, 24, 25 y 26** las gráficas para cada una de las unidades experimentales y para el caldo Sabouraud, estas se realizaron por separado para tener una mejor visualización del error por cada una y verificar la validez de los datos tomados experimentalmente.

**Figura 23**

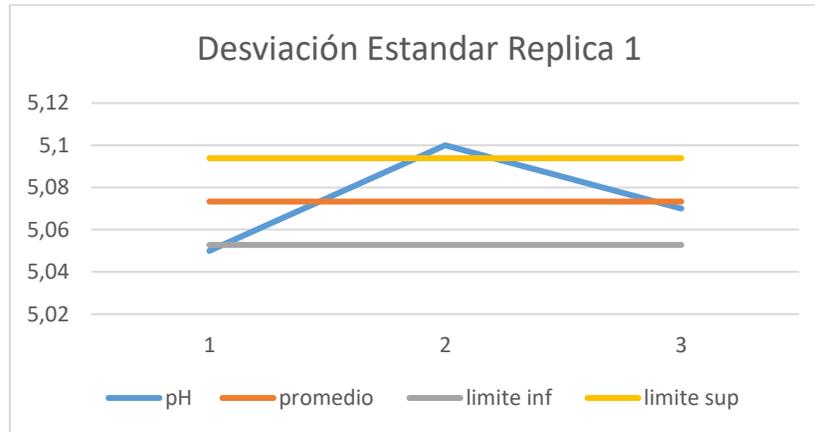
*Desviación estándar del caldo Sabouraud posterior a fermentación*



*Nota.* Se presenta la gráfica de la desviación estándar del pH del caldo Sabouraud posterior a fermentación con los límites en los que los datos se encuentran.

**Figura 24**

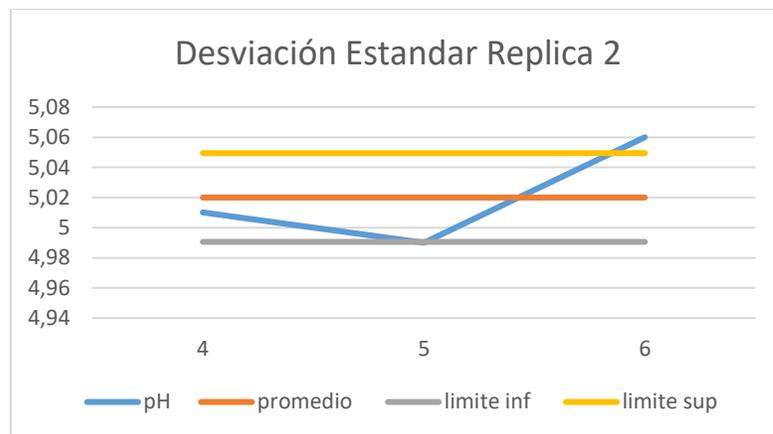
*Desviación estándar posterior a fermentación en la Replica 1*



**Nota.** Se presenta la gráfica de la desviación estándar del pH de la Replica 1 posterior a fermentación con los limites en los que los datos se encuentran.

**Figura 25**

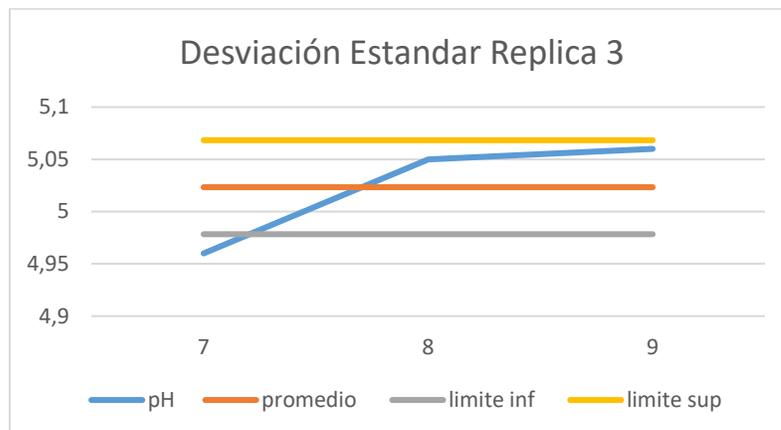
*Desviación estándar posterior a fermentación en la Replica 2*



**Nota.** Se presenta la gráfica de la desviación estándar del pH de la Replica 2 posterior a fermentación con los limites en los que los datos se encuentran.

**Figura 26**

*Desviación estándar posterior a fermentación en la Replica 3*



**Nota.** Se presenta la gráfica de la desviación estándar del pH de la Replica 3 posterior a fermentación con los límites en los que los datos se encuentran.

De manera similar a las **Gráficas 21 y 22**, se evidencia una mínima diferencia entre los datos experimentales de pH, no obstante, al manejar las mediciones por triplicado la gráfica es sensible a cualquier diferencial entre ellos. viéndose reflejado en una desviación de la línea representada en azul como las muestras de pH tomadas para cada muestra.

Para realizar un análisis a los resultados obtenidos en la **Tabla 19** y la **Tabla 20** es necesario entender la importancia de la medición entre los cambios de pH durante el proceso de fermentación, ya que el cambio de la concentración de los iones de H<sup>+</sup> afecta directamente al transporte presentado en la membrana citoplasmática, modificando la dirección de las reacciones en equilibrio hasta alcanzar la relación ácido – base requerida. Esto se refleja en la alteración de la ruta metabólica a seguir por el microorganismo, lo que conlleva a un cambio en los compuestos resultantes posterior al ciclo realizado.

*A.niger* sigue la ruta metabólica del ciclo de Krebs, donde se junta el proceso de glicólisis con el ciclo del ácido cítrico, en estos se presentan diferentes reacciones las cuales mantienen el balance ácido – base dependiendo del estado energético en el que se encuentra; si se encuentra en presencia de mucha energía (presencia elevada de ATP, Acetil CoA y NADH) se limita la estimulación del ciclo de ácido cítrico por medio de la inhibición de la enzima piruvato

deshidrogenasa, por el contrario, si este se encuentra en presencia de poca energía (presencia elevada de piruvato y ADP), se estimula ciclo a partir de la enzima piruvato deshidrogenasa para la producción de ATP. [25]

Siguiendo los comportamientos presentados anteriormente, se observó que las réplicas de fermentación con hidrolizado presentaron un decremento de pH, pasando de un valor inicial de 6.173 para cada una de ellas, a valores de 5.073, 5.02, y 5.023 respectivamente; esto indica que las muestras alcanzaron un estado de poca energía, estimulando la enzima piruvato deshidrogenasa y permitiendo una acumulación de citrato, evitando la producción de biomasa y centrando la energía restante en el mantenimiento celular, lo que se vio reflejado en una disminución de pH. Por el contrario, el blanco alcanzó un estado de alta energía constante, donde se limitó la estimulación de la enzima para la producción de ácido y dio paso a la producción de biomasa, lo cual se vio reflejado en un aumento de pH, generando así una producción acorde de ácido cítrico debido a la presencia en exceso de ATP, Acetil CoA y NADH; esto se reflejó en un aumento de pH de 5.18 a 5.763.

### **3.1.2. Biomasa**

Un aspecto importante que se tuvo en cuenta es el crecimiento de biomasa durante la fermentación, ya que contribuye al análisis de la relación entre el metabolismo del microorganismo y el consumo de sustrato, estos datos se obtuvieron a partir de cuantificación por peso seco, los cuales se reflejan en la **Tabla 21**.

**Tabla 21.**

*Datos de biomasa*

Calculo de producción de biomasa					
Muestra	Peso cápsula vacía (g)	Peso seco (g)	Biomasa previa a fermentación (g)	Biomasa posterior a fermentación (g)	$\Delta X$
Caldo Sabouraud	74,279	74,821	0,08	0,542	0,462
Replica1	52,347	52,821	0,08	0,474	0,394
Replica2	90,779	91,220	0,08	0,441	0,361
Replica3	52,212	52,598	0,08	0,386	0,306

**Nota.** Datos para el cálculo de biomasa producida posterior a la fermentación.

Se calculó la biomasa producida ( $\Delta x$ ) por medio de la diferencia entre la biomasa posterior a la fermentación (calculada a partir del peso seco despreciando el peso de las capsulas) y la biomasa inoculada previa a la fermentación la cual es la misma en todas las muestras.

Como se menciona anteriormente en la sección de pH, las réplicas mostraron un aprovechamiento de azúcares en otras rutas metabólicas como lo es el mantenimiento celular, razón por la cual presentaron un crecimiento de biomasa limitado, obteniendo valores de 0.394, 0.361, 0.306 respectivamente.

Por otra parte, el caldo Sabouraud (blanco) reflejó su tendencia a la producción de biomasa en el resultado obtenido, con un gradiente de crecimiento de 0.462 esto se puede visualizar en la **Figura 27**, donde se muestra una capa gruesa, corrugada de material orgánico crecido correspondiente *Aspergillus niger*.

**Figura 27.**

*Biomasa del caldo Sabouraud después de la fermentación*

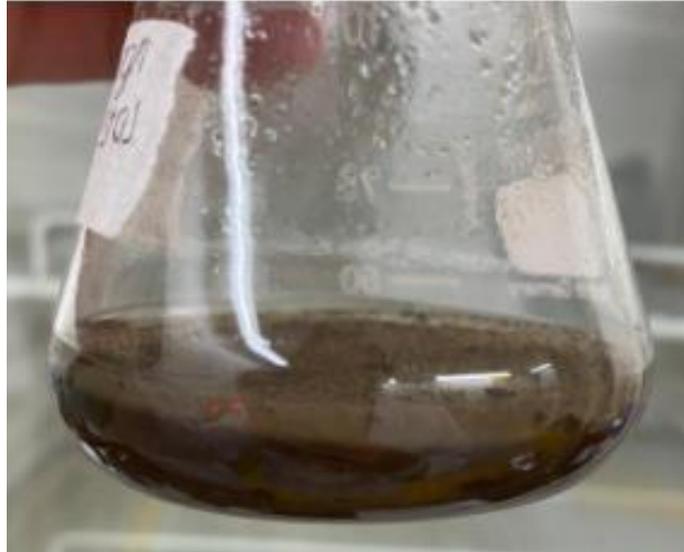


*Nota.* Crecimiento de biomasa en caldo Sabouraud (blanco) posterior a la fermentación vista desde la boquilla del Erlenmeyer.

Así mismo se corroboran los datos de biomasa obtenidas por las réplicas que se presentan en la **Tabla 20** a partir de la **Figura 28**, la cual muestra el crecimiento de biomasa por parte de una de las unidades experimentales, esta se presenta como una capa más fina y dispersa, con partículas negras; adicionalmente en la **Figura 29** se presenta la diferencia de crecimiento celular entre una de las réplicas y el caldo Sabouraud.

**Figura 28.**

*Biomasa de posterior a la fermentación*



*Nota.* Crecimiento de biomasa en hidrolizado posterior a la fermentación vista.

En la **Figura 28** se presenta de forma visual la biomasa obtenida posterior a la fermentación con hidrolizado de yacón, es esta se puede observar que efectivamente hubo un aumento de biomasa en comparación con las fotos iniciales previo a la fermentación (como se puede encontrar en la **Figura 15** del presente proyecto) por lo que cabe resaltar que aunque no se obtuvo una cantidad significativa de biomasa, nunca hubo un decrecimiento celular, por lo que la biomasa después de la fermentación fue mayor, evidenciándose así que la fermentación si cumplió con su ciclo metabólico.

**Figura 29.**

*Comparación entre el blanco y la replica*



**Nota.** Crecimiento de biomasa entre ambas muestras visto desde el fondo del Erlenmeyer.

Se logró obtener una comparación entre el desarrollo de biomasa entre el caldo Sabouraud y réplicas de hidrolizado estudiadas como se ve en la **Figura 29** corroborando lo mencionado anteriormente en la sección de pH, ya que se destaca una mayor producción de biomasa por parte del caldo.

Finalmente se calculó la relación entre biomasa producida ( $\Delta x$ ) y el consumo de sustrato los cuales se calculan a partir de la diferencia entre los azúcares reductores iniciales ( $AR_i$ ) y finales ( $AR_f$ ), tal como se muestra a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Biomasa producida}}{\text{Azúcares consumidos}} = \frac{\Delta x}{AR_i - AR_f} \times 100\%$$

Estos cálculos se pueden apreciar a continuación en la **Tabla 22**.

**Tabla 22.**

*Rendimientos de sustrato y producto en relación a la biomasa*

<b>Muestra</b>	<b>% Rendimiento biomasa producida Sustrato consumido</b>
Caldo Sabouraud	3,314
Replica 1	2,090
Replica 2	2,146
Replica 3	2,539

*Nota.* Rendimientos entre el consumo de sustrato y la producción de biomasa

Los rendimientos presentados en la **Tabla 22** reflejan que el flujo de carbono utilizado tuvo una mayor inclinación hacia la formación de biomasa en comparación a la producción de ácido cítrico, reflejando valores de 2.090%, 2.146% y 2.539% en las unidades experimentales respectivamente y 3.314% para el caldo Sabouraud (blanco), sin embargo estos valores no logran ser lo suficientemente altos, lo que corrobora que el sistema en general tuvo una preferencia en cuanto al mantenimiento celular, esto se evidencio ya que en ninguna muestra hubo un decremento de biomasa.

#### 4. CONCLUSIONES

Se caracterizó el yacón bibliográficamente con sus propiedades fisicoquímicas y nutricionales, donde se rectificaron experimentalmente las propiedades de humedad y pH del fruto, para registrar un control y clasificar el tubérculo entre los rangos establecidos por las diferentes publicaciones citadas anteriormente. En este caso se mantienen entre los rangos los valores de humedad del tubérculo dando un promedio de 90.629% el cual cumple con los rangos de 85% a 90% de humedad, así mismo las muestras tomadas de pH presentaron valores promedio de 6.865 y 6.813 las cuales son semejantes a los rangos establecidos a través de la revisión bibliográfica realizada, obteniendo valores entre 6.072 y 6.725.

Se evaluaron las propiedades del yacón como sustrato en la fermentación con *A. niger* a partir de una cuantificación de azúcares reductores presentes en el mismo y adecuando al tubérculo por medio de una hidrólisis para aprovechar al máximo la cantidad de carbohidratos presentes en él, obteniendo rendimientos de hidrolizado de entre 19% y 77,76%; de este modo se logró una concentración de azúcares reductores de 12.185 g/L para la muestra fresca y de 8.165g/L para la muestra madurada, lo que comprueba que es posible utilizar las propiedades presentes en el yacón para la obtención de ácido cítrico.

Se obtuvieron los rendimientos de ácido cítrico producido a partir de yacón mediante fermentación utilizando *Aspergillus niger* por medio de la relación entre el metabolito producido con respecto a los azúcares reductores consumidos durante el proceso, dando un total de 0,00000118 % para el caldo Sabouraud (blanco) y un promedio de 0,00000057 % para los hidrolizados de yacón, así mismo se realizaron la mediciones de concentración de ácido cítrico obtenido en las unidades experimentales, las cuales arrojaron datos de 0,0165mg/L para el caldo Sabouraud (blanco) y de 0.0055mg/L, 0.0066 mg/L y 0.0077mg/L para cada una de las muestras respectivamente, evidenciándose la posibilidad de producción del ácido a partir del sustrato yacón

Finalmente, el proceso de fermentación refleja una inclinación hacia la producción de biomasa en comparación a la producción del metabolito de interés, obteniendo valores de 3% para el caldo, y 2,1%, 2,1% y 2,5% para las réplicas de hidrolizado respectivamente; estos valores no presentan mayores diferencias entre sí, cabe resaltar que estos datos no tienen en cuenta el uso de azucares en otras rutas metabólicas que están presentes en la fermentación.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] A Muñoz. et al.” Ácido Cítrico: Compuesto Interesante”, *Rev. Científica de la U. A de Coahuila*, vol. 6. No 12, 2014. [En línea]. Disponible en: <http://www.actaquimicamexicana.uadec.mx/articulos/12-4%20citricos.pdf> [11 Jun 2021].
- [2] J.A. Velásquez, Beltrán D., Padilla L. y Giraldo G. “Obtención de ácido cítrico por fermentación con *aspergillus niger*. utilizando sustrato de plátano dominico hartón (musa aab simmonds) maduro”, *Revista Tumbaga* (2010), 5, 135-147. [En línea]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3628261.pdf>, [11 Jun 2021].
- [3] O. J. Sanchez, M. C. Ortiz y A. L. Betancourt. “Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por fermentación con *Aspergillus niger* spp.” *Rev. Colomb. Biotecn.*, Vol. VI, No. 1, Julio 2004, 43-54. [En línea]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3628261.pdf>, [11 de junio 2021].
- [4] Seminario J, Valderrama M & Manrique.2003. El yacón: fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio. Centro Internacional de la papa (CIP), Universidad Nacional de Cajamarca, Agencia Suiza para el desarrollo y la Cooperación (COSUDE), Lima, Perú, 60 p. [En línea]. Disponible en: [http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/07/Yacon\\_Fundamentos\\_password.pdf](http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/07/Yacon_Fundamentos_password.pdf), [11 de junio 2021].
- [5] M.B Rosas, D.F Terán “Obtención de ácido cítrico a partir de melaza o cachaza, mediante fermentación utilizando cepa de *Aspergillus niger* atcc 16888” tesis, Universidad técnica del Norte, Ibarra, 2015. [En línea]. Disponible en: <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/4483/1/03%20EIA%20377%20TESIS.pdf>, [11 de junio 2021].
- [6] V. M. Barreto, “Desarrollo de una propuesta para el diseño conceptual de la producción de un edulcorante a base de yacón”, Proyecto de grado, Bogotá D.C, Fundación U. América, Bogotá D.C, 2019. [En línea]. Disponible en: <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7372/1/6122859-2019-1-IQ.pdf>, [11 de junio 2021].
- [7] G. Dabba, “Production of citric acid by *Aspergillus niger* using molasses as substrate”, Proyecto de grado, Addis Ababa Institute of Technology, Etiopia, 2017. [En línea]. Disponible en:

- [https://www.researchgate.net/publication/282208961\\_Production\\_of\\_Citric\\_Acid\\_by\\_Aspgillus\\_Niger\\_Using\\_Sugarcane\\_Molasses\\_as\\_Substrate](https://www.researchgate.net/publication/282208961_Production_of_Citric_Acid_by_Aspgillus_Niger_Using_Sugarcane_Molasses_as_Substrate), [11 de junio 2021].
- [8] Databio, “Aspergillus spp”, Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo, 2012. En línea. Disponible en: <https://www.insst.es/documents/94886/353749/Ficha+Aspergillus+spp.pdf/fc87d0c4-023a-4dda-95dc-cd26d346e1f2?version=1.0&t=1528734451245> , [11 de junio 2021].
- [9] DL. López Torrez “Valorización de la raíz de yacón: obtención de un jarabe rico en fructooligosacáridos”, *UPB desarrollo & investigación*, vol. 1, no. 7, pp. 88-99, Sep, 2007 . [En línea]. Disponible en :<https://www.upb.edu/revista-investigacion-desarrollo/index.php/id/article/view/99/262> [acceso: 11 jun, 2021].
- [10] I. Maquez, M. Hermann & T. Berman. 2004. El yacón: ficha técnica. Centro Internacional de la papa (CIP), Universidad Nacional de Cajamarca, Agencia Suiza para el desarrollo y la Cooperación (COSUDE), Lima, Perú. [ En línea]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/48032371.pdf> , [11 de junio 2021].
- [11] D. Salvatierra, *Determinación de la composición química proximal, carbohidratos totales, azúcares libres y fructanos del tipo inulina – fructooligosacáridos del yacón (Smallanthus sonchifolius (Poepp. et Endl.) H. Robinson)*, tesis pre, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú, 2015. [ En línea]. Disponible en: [http://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/668/Determinaci%F3n+de+la+composici%F3n+qu%EDmica+proximal,+carbohidratos+totales,+az%FAcares+libres+y+fructanos+del+tipo+inulina++fructooligosac%Elridos+del+yac%F3n+\(Smallanthus+sonchifolius+\(Poepp.+et+Endl.\)+H.+Robinson\).pdf;jsessionid=AC4321D8F9F2AE1BFCB88C47D1762AF2?sequence=1](http://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/668/Determinaci%F3n+de+la+composici%F3n+qu%EDmica+proximal,+carbohidratos+totales,+az%FAcares+libres+y+fructanos+del+tipo+inulina++fructooligosac%Elridos+del+yac%F3n+(Smallanthus+sonchifolius+(Poepp.+et+Endl.)+H.+Robinson).pdf;jsessionid=AC4321D8F9F2AE1BFCB88C47D1762AF2?sequence=1) [11 de junio 2021].
- [12] G. Daba, *Production of citic acid by aspergillus niger using molasses as substrate*, tesis master, Universidad Addis Ababa, Addis Ababa, Ethiopia, 2017. [ En línea]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/282208961\\_Production\\_of\\_Citric\\_Acid\\_by\\_Aspgillus\\_Niger\\_Using\\_Sugarcane\\_Molasses\\_as\\_Substrate](https://www.researchgate.net/publication/282208961_Production_of_Citric_Acid_by_Aspgillus_Niger_Using_Sugarcane_Molasses_as_Substrate). [11 de junio 2021].
- [13] A. Sáez Vega., L. Flórez Valdés, y A. Cadavid Rendón, “Caracterización de una Cepa Nativa de Aspergillus niger y Evaluación de la Producción de Ácido Cítrico”, *RUE*, vol. 38, n.º 128, pp. 33-42, jun. 2012. [En línea]. Disponible en:

- <https://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/revistauniversidadeafit/article/download/845/753/#:~:text=Se%20puede%20concluir%20que%20la,altas%20cantidades%20de%20%C3%A1cido%20c%C3%ADtrico>. [11 de junio 2021].
- [14] J.C. Salazar, *Caracterización del tubérculo de yacon (Smallanthus sonchifolia) para la elaboración de yogur batido*, tesis pre, Facultad de industrias alimentarias, Universidad nacional agraria de la selva, Tingo- María, Perú, 2002. [En línea]. Disponible en: <http://repositorio.unas.edu.pe/bitstream/handle/UNAS/202/FIA124.pdf?sequence=1&isAllowed=y>, [11 de junio 2021].
- [15] Codex alimentarius: normativas internacionales de los alimentos. Organización mundial de la salud, 2017, [En línea]. Disponible en: <https://mail.google.com/mail/u/0/?tab=rm&ogbl#starred/FMfcgxwLsKDGHzqzCxfJfNRFBCsJl rS?projector=1&messagePartId=0.1> , [11 de junio 2021].
- [16] Lorenz, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* vol. 3. (p.426-428). [En línea]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/MohammadHomayonzadeh/post/How\\_to\\_properly\\_measure\\_reducing\\_sugars\\_in\\_seeds/attachment/5c629bda3843b0544e65798e/AS%3A725425382772753%401549966297941/download/Dinitrosalicylic+acid2.pdf](https://www.researchgate.net/profile/MohammadHomayonzadeh/post/How_to_properly_measure_reducing_sugars_in_seeds/attachment/5c629bda3843b0544e65798e/AS%3A725425382772753%401549966297941/download/Dinitrosalicylic+acid2.pdf), [11 de junio 2021].
- [17] Universidad de la república Uruguay. [ Bioquímica- BCM- Facultad de Medicina- Udelar]. Cálculo de [Glucosa]- Curva de calibración con DNS [Archivo de Video]. YouTube.<https://www.youtube.com/watch?v=7AC3uYjDi9Q> [10 de junio 2021].
- [18] A. L. Shouben, M. Sanchez, J. E. Muñoz, et al, “Efecto del fósforo y del potasio en la producción de ácido cítrico utilizando una cepa de *Aspergillus niger*”, *Acta Agron.* vol.63, no.3, Julio, 2014, doi: <https://doi.org/10.15446/acag.v63n3.35809> [Acceso: junio 10,2021].
- [19] J. S. Alvarez. (2017). Evaluación de la funcionalidad de producción de ácido cítrico usando cepas de *Aspergillus niger* identificadas molecularment (Trabajo de grado). Colegio de ciencias biológicas y ambientales (COCIBA). 2017. [En línea]. Disponible en: <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/6627/1/131134.pdf>, [11 de junio 2021].

- [20] B. E. Elizondo, R. S. Manzanares, *Obtención de ácido cítrico por medio de fermentación sumergida a partir de Aspergillus niger ATCC 16404 utilizando suero de leche como medio de cultivo de fermentación*, Trabajo de grado, Facultad de química y farmacia, Universidad de el Salvador, 2009, [En línea]. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/2608/1/16101588.pdf> [11 de junio 2021].
- [21] M. Inga, I. Betalleluz, M. Kina, et al, "Optimización del proceso de extracción de los fructooligosacáridos de yacón (*Smallantus Sonchifolius*)", *Rev. Soc. Quím.* Vol.81, No.3, Julio, 2015, [En línea]. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2015000300008](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2015000300008) [Acceso: junio 10,2021].
- [22] I. Reyes, M. González, F. López, "Un análisis del metabolismo de *Aspergillus niger* creciendo sobre un sustrato sólido", *Rev. Mex. Quím.* Vol. 12, No. 1, enero, 2013. [En línea]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/620/62028007005.pdf> [Acceso: junio 10 2021]
- [23] Condalab. "Caldo dextrosa Sabouraud EP/USP", [En línea].[https://www.condalab.com/int/en/index.php?controller=attachment&id\\_attachment=8466](https://www.condalab.com/int/en/index.php?controller=attachment&id_attachment=8466) [Acceso: 11 jun 2021].
- [24] Sistema Integral de Información de Comercio Exterior. "Exportación del producto yacón según sus principales mercados en us\$ 2016 – 2021". [En línea]. <https://www.siicex.gob.pe/siicex/apb/ReporteProducto.aspx?psector=1025&preporte=prodmerc &pvalor=1953> [Acceso: junio 10, 2021]
- [25] Sociedad estudiantil de ciencias UPCH. Ciclo del ácido cítrico [Archivo de Video]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=Cwi7wfZ-Ykw> , [10 de junio 2021].
- [26] S. De Jesus. "Azúcares". 2009. [En línea]. Disponible en: <https://www.significados.com/azucares/> [21 de julio 2021]
- [27] J. Taglialegne. "Estrategias tecnológicas en la inhibición de oxidasas en alimentos." Módulo Química de los Alimentos. Brazil. 2016. [En línea]. Disponible en: <https://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/9760/2013000000729.pdf>, [21 de julio 2021].

- [28] R. Parada. “Conidios”. 2021 [En línea]. Disponible en: <https://www.lifeder.com /conidios/> [21 de julio 2021].
- [29] M. Jatin. Medline plus. “Esporas”. 2009. [En línea]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/002307.htm>. [21 de julio 2021].
- [30] Biblioteca Agrícola Nacional de los Estados Unidos. Célula Filamentosa. 2013. [En línea]. Disponible en: <https://boletinagrario.com/ap-6,celula+filamentosa,1721.html>. [21 de julio 2021].
- [31] J.Chen. P. Cammarata, P.Baines., et al. “Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 2009. [En línea] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488909001670> [21 de julio 2021].
- [32] G.Hendry. “The Ecological Significance of Fructan in a Contemporary Flora.” *New Phytologist*. 1987. [En línea]. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/THEECOLOGICAL-SIGNIFICANCE-OF-FRUCTAN-IN-A-FLORAHendr%20E1%20BB%20B3/fc04610d093496d06f7ccdd830525c1060342875>. [21 de julio 2021].
- [33] C. Lira. “Hifas: características, funciones y tipos”. 2018 [En línea]. Disponible en. [Online]. Disponible en: <https://www.lifeder.com/hifas/>. [21 de julio 2021].
- [34] M. B. Roberfroid, (2003). *Introducing inulin-type fructans*. *Br. J. Nutr.* 93: 13–26. doi:10.1079/bjn20041350.
- [35] G.I. Shulman, K. F. Petersen KF. “Metabolismo”.2020. [En línea]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/002257.htm> [21 de julio 2021].
- [36] R. Morrison,N. Boyd. *Química Orgánica*. 5° edición. Editorial: Pearson Eddison Wesley.1999.

## GLOSARIO

**Azúcares fermentables:** son aquellos que son de fácil consumo para los microorganismos durante el proceso de fermentación; en la naturaleza, existen distintos tipos de azúcares según su estructura química. Las que más se destacan son la glucosa y la fructosa, pero existe una amplia variedad de azúcares fermentables. [26]

**Azúcares simples:** “los azúcares simples son la forma más simple de carbohidratos. Están compuestos por átomos de oxígeno (O), carbono (C) e hidrógeno (H) y cumplen con la fórmula química  $C_nH_{2n}O_n$ . Son también llamadas monosacáridos simples.” [26]

**Blanqueado:** se pueden inactivar enzimas por escaldado, un tratamiento térmico suave que se aplica a vegetales, con el objeto de inactivar enzimas que pueden causar deterioro, reducir la carga microbiana y además eliminar el oxígeno retenido en los tejidos. [27]

**Células filamentosas:** “un tipo de célula del esclerénquima alargada y estrecha con los extremos puntiagudos y que tiene paredes celulares secundarias engrosadas. Las células de fibra, como otras esclereidas, pueden contener lignina, proveen soporte estructural a los tejidos de las plantas, y pueden ser encontradas en varias partes de la planta.” [30]

**Conidios:** son las esporas externas las cuales permiten a una gran variedad de hongos reproducirse y de esta manera propagarse de manera asexual. Su formación puede ser estimulada por condiciones ambientales favorables. [28]

**Esporas:** son células que producen ciertos hongos y bacterias; las esporas participan en la reproducción y también son utilizadas como mecanismo de defensa. Son capaces de soportar agentes químicos por lo cual para destruirlas es necesario realizar un proceso de desinfección denominado autoclave. [29]

**Fructanos:** es un polímero de moléculas de fructosa. Los fructanos con una longitud de cadena corta se conocen como fructooligosacáridos. [32]

**Fosforilación oxidativa:** es un proceso metabólico que utiliza energía liberada por la oxidación de nutrientes para producir adenosina trifosfato (ATP). La fosforilación oxidativa logra obtener hasta el 90% del ATP producida por la célula. [31]

**Hifas:** estructuras cilíndricas filamentosas que constituyen el cuerpo de los hongos multicelulares las cuales están formadas por una fila de células alargadas envueltas por una pared celular formada por la sustancia quitina. [33]

**Inulina:** son un grupo de polisacáridos naturales producidos por muchos tipos de plantas, pertenecen a una clase de fibras dietéticas conocidas como fructanos. Algunas plantas utilizan la inulina como un medio para almacenar energía y normalmente se encuentra en las raíces o los rizomas. [3s]

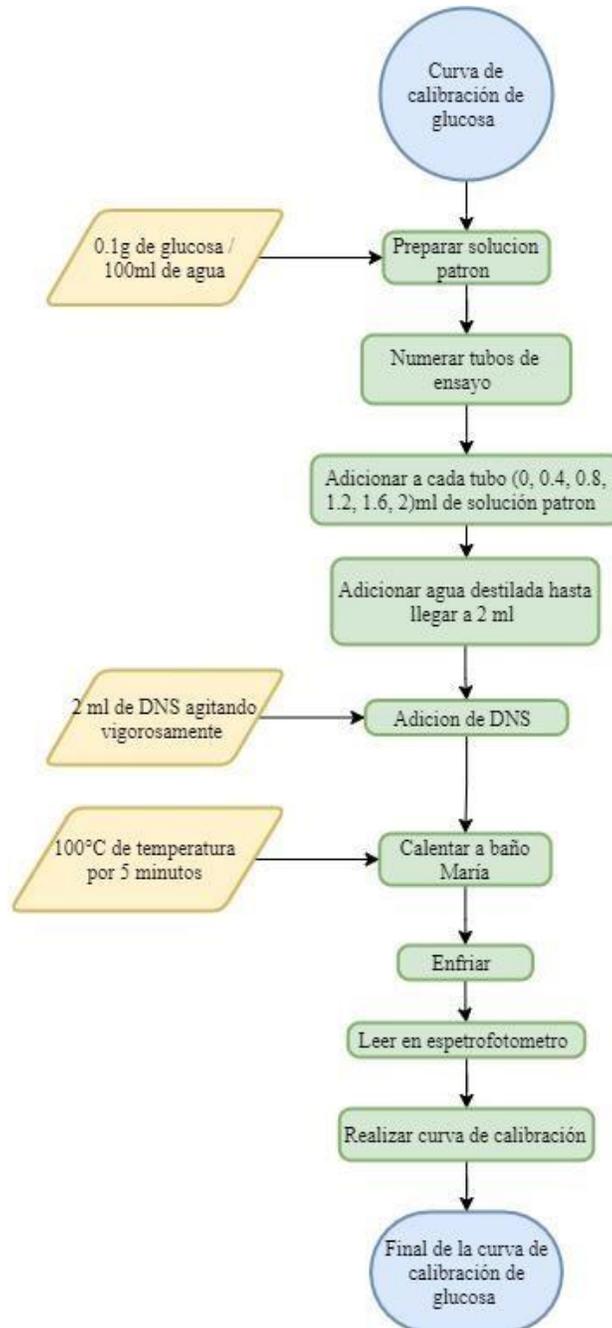
**Metabolismo:** se refiere a todos los procesos físicos y químicos de cualquier organismo para convertir o crear energía, estos procesos incluyen respiración o consumo de nutrientes entre otros. [35]

## **ANEXOS**

## ANEXO 1.

### CURVAS DE CALIBRACIÓN

#### Curva de calibración de glucosa



El desarrollo experimental se basó en el video metodológico [17], el cual consiste en añadir DNS ácido 3,5-dinitrosalicílico para cambiar la coloración a muestras que presentan azúcares reductores en ellas; el reactivo DNS presenta un tono amarillo, al reaccionar, este se torna en ANS

el cual tiene una coloración roja, las muestras entre más azúcares presentan más intensa su coloración roja. Una vez terminada la reacción se realiza una lectura por medio de espectrofotometría.

A continuación, se muestra las **Tabla 23** de concentración de glucosa para la construcción de la curva de calibración:

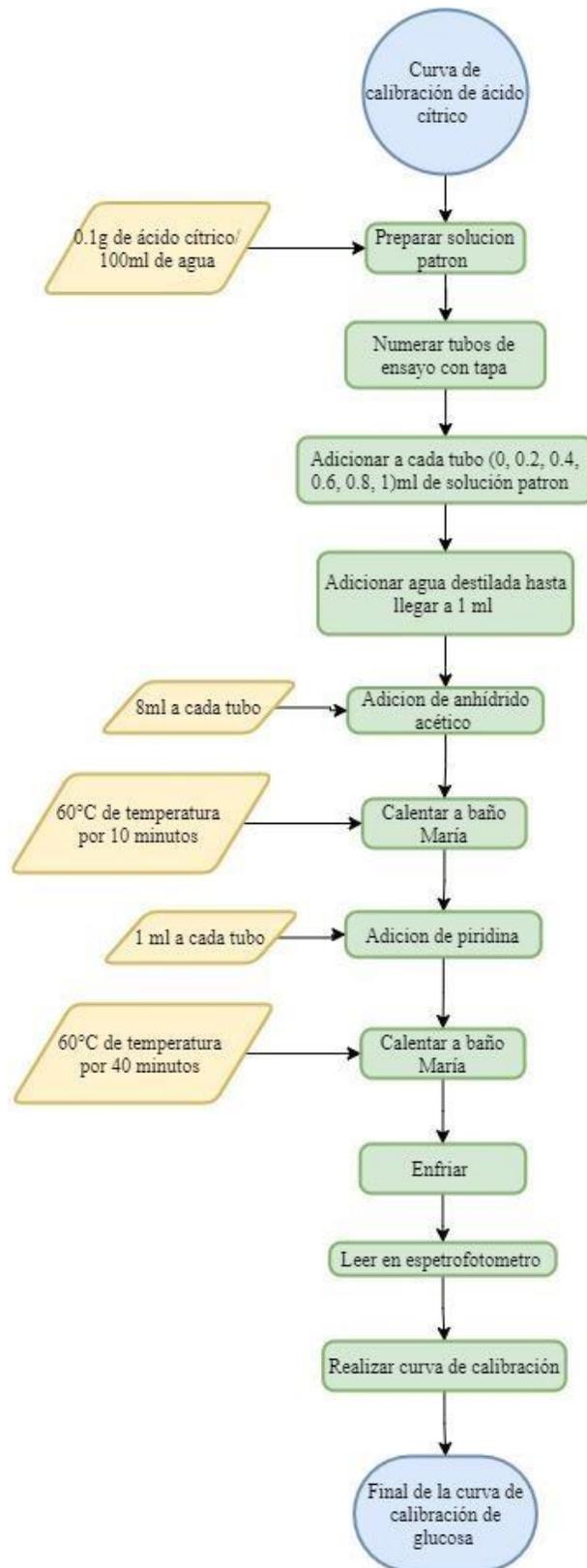
**Tabla 23**

Tomas de absorbancia de muestras de glucosa

<b>Curva de calibración de azúcares reductores</b>				
<b>Muestra</b>	<b>Solución patrón de Glucosa (1g/100ml)</b>	<b>Agua (ml)</b>	<b>[Glucosa]</b>	<b>Promedio de toma de absorbancia</b>
Blanco	0	2	0,000	0,093
1	0,4	1,6	0,001	0,099
2	0,8	1,2	0,002	0,114
3	1,2	0,8	0,003	0,131
4	1,6	0,4	0,004	0,150
5	2	0	0,006	0,162

A partir de los registrados anteriormente se realizó la curva de calibración donde se graficaron los datos de absorbancia vs la cantidad de glucosa presente en las muestras, finalmente se determina la ecuación de la recta.

## Curva de calibración del ácido cítrico



La construcción de la curva de calibración de ácido cítrico sigue el proceso descrito por Saffran-Densted, el cual consiste en añadir anhídrido acético y piridina para cambiar la coloración a muestras que presentan ácido cítrico en ellas, estas se tornan en tonos amarillentos, si la concentración es alta (4gr/100ml) la coloración alcanza a tonos marrón o vino tinto, Una vez terminada la reacción se realiza una lectura por medio de espectrofotometría.

A continuación, se muestra las **Tabla 24** de concentración de ácido cítrico utilizadas para la construcción de la curva de calibración:

**Tabla 24**

*Datos de absorbancia de las muestras de ácido cítrico*

<b>Ácido cítrico presentes en cada muestra</b>			
<b>Muestra</b>	<b>Promedio de toma de absorbancia</b>	<b>[Ácido cítrico]</b>	<b>Ácido cítrico (g/l)</b>
Caldo Sabouraud	0,144	0,003	1,64723E-05
Replica 1	0,058	0,001	5,45345E-06
Replica 2	0,067	0,001	6,6156E-06
Replica 3	0,076	0,001	7,69165E-06

A partir de los registrados anteriormente se realizó la curva de calibración donde se graficaron los datos de absorbancia vs la cantidad de ácido cítrico presente en las muestras, finalmente se determina la ecuación de la recta.

## **ANEXO 2.**

### **RECOMENDACIONES**

Para ampliar el estudio realizado al yacón como sustrato, se recomienda en los tratamientos primarios realizar un mayor volumen de trabajo, con el fin de evaluar el proceso a mayor escala y bajo procesos de control mejor estandarizados, hay que tener en cuenta la importancia de una pronta intervención de actividad enzimática por medio de blanqueado, esto con el fin de tener una mejor conservación de los azúcares reductores presentes inicialmente y que la concentración obtenida de los mismos sea mayor, para así aprovechar al máximo las propiedades del yacón.

Se recomienda hacer una mayor toma de datos de pH tanto para los tratamientos primarios como para la fermentación, con el fin de disminuir la sensibilidad de las gráficas estadísticas y mitigar el error de medición, para así dar una mayor veracidad a la información que se suministre respecto a los datos tomados en laboratorio.

En los tratamientos secundarios, se recomienda realizar una evaluación de producción de prebióticos teniendo en cuenta la cantidad de fructooligosacáridos presentes en el yacón, para estimular el crecimiento de *A.niger*. así como un análisis experimental de los nutrientes presentes en el tubérculo y como estos influyen en la fermentación para producción de ácido cítrico.

Dada las limitaciones que se presentaron en cuanto a los equipos disponibles, el proceso de hidrólisis se realizó a partir de ácido clorhídrico, neutralizando con hidróxido de sodio sin separación de sales remanentes obtenidas, por lo tanto, se recomienda replicar el procedimiento de hidrólisis a partir del uso de ácido sulfúrico como reactivo, neutralizando el producto con hidróxido de calcio y separando las sales obtenidas a partir de un equipo evaporador, ya que acorde con las referencias utilizadas en este proyecto, el uso de estos dos reactivos genera rendimientos más altos, así mismo también se puede evaluar el uso de otros tipos de hidrólisis, tal sea el caso de una hidrólisis enzimática, y realizar una comparación con los datos obtenidos en el presente proyecto para evaluar cual proceso genera un mayor aprovechamiento de los carbohidratos presentes en el yacón.

Finalmente, en la fermentación se recomienda realizar un análisis de proceso con una mayor concentración de biomasa. Junto con esto realizar una toma de datos diario para poder realizar la cinética de crecimiento, evaluando el cambio que presentan los parámetros que influyen en el proceso, tal sea: temperatura, pH, liberación de CO<sub>2</sub> y consumo de oxígeno, esto con el fin de obtener una información más detallada de las condiciones óptimas en la fermentación con *A. niger* a partir de yacón, así mismo se recomienda realizar un mayor muestreo de las unidades experimentales, con el fin de disminuir la incertidumbre.