

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Evaluación de la funcionalidad de producción de ácido cítrico
usando cepas de *Aspergillus niger* identificadas
molecularmente.

Trabajo de Investigación

Jorge Sebastián Álvarez Santana

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en Procesos Biotecnológicos

Quito, 18 de mayo del 2017

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Evaluación de la funcionalidad de producción de ácido cítrico usando cepas de
Aspergillus niger identificadas molecularmente.

Jorge Sebastián Álvarez Santana

Calificación:

Antonio León Reyes, Ph.D.
Co-Director de Proyecto de Titulación

Daniela Almeida, Ph.D.
Co-Director de Proyecto de Titulación

María de Lourdes Torres, Ph.D.
Coordinadora de Ing. en Procesos
Biotecnológicos

José Álvarez, Ph.D.
Miembro del comité

Miguel Ángel Méndez, Ph.D.
Miembro del comité

Quito, 18 de mayo del 2017

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Jorge Sebastián Álvarez Santana

Código: 00112073

Cédula de Identidad: 171817260-2

Lugar y fecha: Quito, 18 de mayo del 2017

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por haber depositado en mí su confianza y su paciencia en el transcurso de mi carrera.

Agradezco a mis co-directores de mi proyecto de titulación, Antonio León y Daniela Almeida, debido a su confianza, motivación, tiempo, conocimiento y amistad impartido durante el desarrollo del proyecto y en clases.

Agradezco a la coordinadora de carrera, María de Lourdes Torres por haberme guiarme dentro del área de la biotecnología.

Agradezco a Noelia Barriga, Karen Herrera, Daniel Carrasco y Darío Ramírez, por su guía, ayuda y sobretodo su amistad.

Agradezco a mis amigos de carrera por brindarme su apoyo a lo largo de estos 5 años, siendo así solamente el inicio de una gran amistad.

RESUMEN

El ácido cítrico es un ácido orgánico débil que se encuentra presente en frutas cítricas y como intermediario del ciclo de Krebs en organismos vivos aerobios. Presenta varias aplicaciones dentro de la industria de alimentos, farmacéutica, agrícola, entre otras. Es por ello que es un componente industrial importante y que representa altos costos de importación de países productores como China, Alemania, entre otros. La producción de ácido cítrico se realiza por procesos fermentativos sumergidos, en donde se ha determinado que unos de los factores más importantes son: la concentración y fuente de carbono. Este proceso es realizado por el hongo filamentoso *Aspergillus niger*. En el presente proyecto se aislaron 3 cepas de *Aspergillus niger* a partir de sustratos orgánicos (cepas A, B y C), los cuales fueron identificados morfológicamente usando métodos de microscopia y molecularmente mediante la amplificación de la región ITS del ADN ribosomal. Adicionalmente se evaluó la producción de ácido cítrico en tres concentraciones de sacarosa (100, 150 y 200 g/L), en donde la cepa D (cepa control) presentó una mayor producción neta de ácido cítrico de 3,5 g/L en una concentración de 200 g sacarosa/ L. Adicionalmente la cepa D y B, presentan una mayor eficiencia en el rendimiento mostrando un 0,045 y 0,043 g ácido cítrico / g sacarosa consumida cuando se suplementa con 100 g sacarosa/L. De esta manera se establece que la cepa B de *A. niger* presentó un alto rendimiento de producción de ácido cítrico en una baja concentración de sacarosa, lo cual es representativo en procesos de escalado para la producción industrial de ácido cítrico en el Ecuador.

Palabras clave: ácido cítrico, bioproceso, fermentación, *Aspergillus niger*, ciclo de Krebs y región Internal Transcribed Spacer de ADN ribosomal (ITS).

ABSTRACT

Citric acid is a weak organic acid that is found in citrus fruits and as an intermediary compound of the Krebs cycle in living aerobic organisms. It presents several applications within different industries such as food, pharmaceutical, agricultural, etc. This is why it is an important product within Ecuador industry and it represents a high import costs from countries such as China, Germany, among others. The production of citric acid is carried out by submerged fermentation processes, where it has been determined that one of the most important factors are: concentration and the carbon source. The citric acid production process could be performed by the filamentous fungus *Aspergillus niger*. For this research, 3 strains of *Aspergillus niger* were isolated from organic substrates, which were identified morphologically and molecularly by the amplification of the ITS region of the ribosomal DNA. In addition, citric acid production was evaluated by varying the sucrose concentration (100, 150 and 200 g / L), where strain D showed a higher amount of citric acid produced, 3.5 g / L with a 200 g Saccharose / L concentration. Furthermore, strain D and B, presented a higher yield efficiency showing a 0.045 and 0.043 g citric acid / g sucrose consumed when supplemented with 100 g Sucrose / L. By means of the statement mentioned, an isolated *A. niger* strain presents a high yield of citric acid production with a low concentration of sucrose, which is representative in scaling processes for the production of citric acid in Ecuador.

Key words: citric acid, bioprocess, fermentation, *Aspergillus niger*, Krebs cycle, ITS region ribosomal DNA.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1.Ácido cítrico	10
1.2.Aplicaciones	10
1.3.Antecedentes de producción.....	11
1.4.Microorganismos utilizados para la producción de ácido cítrico	12
1.5. <i>Aspergillus niger</i>	13
1.6.Identificación de <i>Aspergillus niger</i>	13
1.7.Estrategia de Fermentación	14
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. ÁREA DE ESTUDIO.....	18
4. OBJETIVOS.....	19
5. MATERIALES.....	20
6. MÉTODOS.....	25
6.1.Recolección de sustratos orgánicos.....	25
6.2.Aislamiento de <i>Aspergillus</i> spp. a partir de sustratos orgánicos.....	25
6.3.Identificación microscópica de <i>Aspergillus</i> spp.....	26
6.4.Extracción de ADN total de los aislado de <i>Aspergillus</i> spp.....	26
6.5.Amplificación de la región ITS 1 – ITS 4 (ADN ribosomal 5.8s) por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	27
6.6.Secuenciación del producto de PCR de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8 S	29
6.7.Preparación de la suspensión de esporas de <i>Aspergillus niger</i>	29
6.8.Preparación de recipientes y medios de cultivo para la producción de ácido cítrico.	29
6.9.Bioproseso de producción de ácido cítrico.	31
6.10. Determinación del crecimiento de <i>Aspergillus niger</i>	31
6.11. Determinación de la producción de ácido cítrico	33
7. RESULTADOS	34
7.1.Aislamiento e identificación de <i>Aspergillus</i> spp.	34
7.2.Extracción de ADN a partir de los aislados y cepa de <i>Aspergillus niger</i>	36
7.3.Amplificación de la región ITS mediante la técnica PCR.....	37
7.4.Identificación en base a la secuenciación del producto de PCR de la región ITS del ADN ribosomal.	38
7.5.Crecimiento en el medio de cultivo con diferentes concentraciones de sacarosa. ..	39
7.6.Producción de ácido cítrico en medios de cultivo con diferentes concentraciones de sacarosa.	41
7.7.Análisis de rendimiento efectivo de producción de ácido cítrico en relación al consumo de sacaros	43
8. DISCUSIÓN.....	45
9. CONCLUSIONES.....	55
10. RECOMENDACIONES	56

11. BIBLIOGRAFÍA	57
12. ANEXOS	62

Tabla de Figuras

Figura 1. Morfología de <i>Aspergillus niger</i>	142
Figura 2. Cultivos de <i>Aspergillus niger</i> en medio PDA a partir de distintas fuentes orgánicas. 1 – 8: morfología macroscópica; 9 – 12: morfología microscópica.....	364
Figura 3. Gel de electroforesis al 2% de agarosa que presenta la extracción de ADN con el Kit PowerSoil ® DNA Isolation (Mo Bio Laboratories, USA). Orden de carga: L: marcador de peso molecular (100 bp INVITROGEN ©), Aislados: A, B, C, D y Blanco	375
Figura 4. Gel de Electroforesis al 1% de agarosa que presenta la amplificación de la región ITS. Orden de carga: L: marcador de peso molecular (100 pb INVITROGEN ©), Aislados: A, B, C, D y Blanco. Se espera un tamaño de banda de 600 pb,.....	386
Figura 5. Curva de degradación de sacarosa por parte de la cepa C y <i>T. harzianum</i> luego de 144 h de fermentación.....	38
Figura 6. Consumo de sacarosa por parte de las cepas evaluadas luego de 144 h de fermentación en distintas concentraciones de sacarosa.....	39
Figura 7. Producción de ácido cítrico por parte de las cepas evaluadas en una concentración de 200 g/L de sacarosa.....	40
Figura 8. Producción de ácido cítrico por parte de las cepas evaluadas luego de 144 h de fermentación en distintas concentraciones de sacarosa.....	41
Figura 9. Cinética de producción de ácido cítrico por parte de la cepa D luego de 144 h de fermentación en 100 g Sacarosa / L.....	42
Figura 10. Consumo de sacarosa por parte de las cepas evaluadas en una concentración inicial de 100 gSacarosa/L.....	64
Figura 11. Consumo de sacarosa por parte de las cepas evaluadas en una concentración inicial de 150 gSacarosa/L.....	684
Figura 12. Consumo de sacarosa por parte de las cepas evaluadas en una concentración inicial de 200gSacarosa/L.....	695
Figura 13. Producción neta de ácido cítrico por parte de las cepas evaluadas en una concentración de 100 g/L de sacarosa	717
Figura 14. Producción neta de ácido cítrico por parte de las cepas evaluadas en una concentración de 150 g/L de sacarosa	717

Tabla de Anexos

Anexo 1. Secuencias en formato FASTA de la región ITS 1 – ITS 4 de las cepas de <i>Aspergillus niger</i> analizadas.....	65
Anexo 2. Curva de calibración para la medición de sacarosa.....	63
Anexo 3. Análisis de varianza para el consumo de sacarosa por parte de las cepas evaluadas.....	64
Anexo 4. Prueba de Tukey 5% para el consumo de sacarosa por parte de las cepas evaluadas.....	64
Anexo 5. Curvas de crecimientos de las cepas evaluadas.....	65
Anexo 6. Análisis de varianza para la producción de ácido cítrico a partir de las cepas evaluadas.....	66
Anexo 7. Prueba de Tukey 5% para la producción de ácido cítrico por parte de las cepas evaluadas.....	67
Anexo 8. Curvas de producción neta de ácido cítrico de las cepas evaluadas.....	68
Anexo 9. Análisis de varianza del rendimiento de producción de ácido cítrico a partir de las cepas evaluadas.....	69
Anexo 10. Prueba de Tukey 5% del rendimiento de producción de ácido cítrico a partir de las cepas evaluadas.....	69
Anexo 11. Producción de ácido cítrico reportada en la literatura.....	70

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ácido cítrico

El ácido cítrico o 2-hidroxi-propano-1,2,3-ácido tricarboxílico ($C_6H_8O_7$) es un ácido orgánico débil con un peso molecular de 210.14 g/mol y es soluble en agua. Es sólido a temperatura ambiente y presenta un punto de fusión a 153°C. Presenta tres valores distintos de pKa en un pH de: 3.1, 4.7 y 6.4 esto es debido a que contiene 3 grupos carboxílicos en su estructura. Se encuentra presente en los frutos cítricos y como intermediario en el ciclo de Krebs de los organismos vivos (Show et al, 2015).

Debido a sus propiedades fisicoquímicas y su presencia natural en el ambiente, ha sido muy utilizado dentro del sector industrial desde el siglo 19 (Ciriminna et al, 2017). La obtención de ácido cítrico puede ser mediante la extracción de frutos cítricos como: limón, lima y naranjas, o a partir de fuentes sintéticas por: reacciones químicas o fermentación microbiana (Show et al, 2015).

1.2. Aplicaciones

El ácido cítrico ha sido ampliamente utilizado ya que no presenta un riesgo potencial hacia el ser humano ni el ambiente (Socool et al, 2006). Debido a que es un ácido débil y a su sabor ácido en solución, es muy utilizado dentro de la industria de alimentos y bebidas. Adicionalmente, el ácido cítrico en combinación con citrato presenta una gran capacidad buffer, por lo que es utilizado como quelante de metales. Debido a la presencia de los grupos carboxílicos se da la formación de componente importantes (Ciriminna et al, 2017). Por lo tanto, es ideal su uso dentro de distintas industrias, tales como: farmacéuticas, cosméticas, nutracéutica, agricultura, entre otros (Show et al, 2015).

El ácido cítrico forma parte del grupo Generally Recognized as Safe (GRAS), lo cual indica que se puede utilizar como aditivo versátil e inocuo en distintos alimentos (Socool et al, 2006). Adicionalmente presenta el código de ingrediente para alimentos E330 dentro de la Unión Europea. Por lo que el uso de este componente es utilizado mundialmente (Ciriminna et al, 2017).

1.3. Antecedentes de producción

En 1784 se establece la metodología de extracción de ácido cítrico a partir de frutos cítricos (Show et al, 2015) y se reporta la mayor planta de producción de ácido cítrico a partir de jugo de limón en Europa: Palermo's Fabbrica Chimica Italiana Goldenberg, mediante la formación de citrato de calcio con cal y recuperándola con ácido sulfúrico diluido (Ciriminna et al, 2017). En 1893 se establece la producción de ácido cítrico a través de fermentación en un medio de azúcares y sales inorgánicas mediante el uso de *Penicillium glaucum*. Posteriormente, en 1916, James Currie establece un proceso económico de producción industrial de ácido cítrico a partir de *Aspergillus niger*, ya que presentaba cantidades significativas de ácido cítrico. Estableció un pH óptimo de 2.5 – 3.5 en donde se incrementa la producción de manera proporcional a la concentración de (Socool et al, 2006). Esto favoreció a las industrias ya que su producción es más sustentable debido al amplio uso de fuentes de azúcares que pueden provenir de residuos de distintas industrias (Ciriminna et al, 2017).

1.4. Microorganismos utilizados para la producción de ácido cítrico

Los microorganismos capaces de producir ácido cítrico pueden ser: bacterias (*Arthrobacter paraffinens*, *Bacillus licheniformis*, *Corynebacterium* spp., entre otros), levaduras (*Candida oleophilis*, *Candida guilhermondii*, *Yarrowia lipolytica*, entre otros) y hongos (*Aspergillus wentii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius*, *Penicillium janthinellum*, *Trichoderma viride*, *Mucor pyriformis*, entre otros (Socool et al, 2006), (Show et al, 2015). Sin embargo, no todos son capaces de producir comercialmente ácido cítrico con altos rendimientos debido a que su producción se basa en el metabolismo energético, siendo así que su acumulación se alcanza bajo condiciones específicas que no todos los microorganismos pueden tolerar. Adicionalmente, el uso de levaduras presenta una alta producción de isocitrato el cual es controlado por la enzima aconitasa. Este es un componente no deseado, por lo que se ha tenido que desarrollar cepas mutantes con una baja actividad enzimática (Socool et al, 2006).

Se ha establecido que *Aspergillus niger* es un microorganismo óptimo para la producción de ácido cítrico ya que presenta ventajas sobre las bacterias debido a que el proceso de fermentación se lo puede realizar utilizando sustratos de bajo costo con altos rendimientos de producción. Para mejorar la producción de ácido cítrico se han establecido procedimientos de mejoramiento genético usando mutagénesis mediante el uso de radiación gamma, ultravioleta y componentes químicos (Show et al, 2015). Sin embargo, cuando se usa *Aspergillus niger* es muy importante considerar la técnica de fermentación y el sustrato, por lo que se deben hacer pruebas para evaluar su producción y establecer el mejor método previo a cualquier modificación genética (Show et al, 2015).

1.5. *Aspergillus niger*

Aspergillus niger pertenece al Dominio: Eukarya, Reino: Fungi, Filo: Ascomycota, Clase: Eurotiomycetes, Orden: Eurotiales, Familia: Trichocomaceae, Género: *Aspergillus*, Subgénero: *Circumdati* sección *Nigri* y Especie: *Aspergillus niger* (Encyclopedia of Life, 2017).

Aspergillus niger presenta una reproducción asexual y puede crecer sobre una gran variedad de sustratos inertes, por lo que es una especie que se encuentra distribuida alrededor de todo el mundo. Su crecimiento está asociado a materiales orgánicos y al suelo. Es un hongo filamentoso saprofítico que crece en material vegetal, granos, compost, entre otros. A pesar de que es responsable de causar enfermedades en los seres humanos, se han establecido aplicaciones industriales para la producción de enzimas y ácidos orgánicos mediante fermentación, tales como ácido cítrico y ácido glucónico (Encyclopedia of Life, 2017).

1.6. Identificación de *Aspergillus niger*

La identificación de *A. niger* puede ser mediante microscopía, siendo solamente morfológica, ya que presente cabezas conidiales biseriadas y radiales, estípes lisos de pared gruesa, vesícula esférica, sin presencia de métulas y fiálides unidas a la vesícula (ver Figura 1). Los conidios son globosos y generalmente rugosos con crestas irregulares (Abarca, 2000).

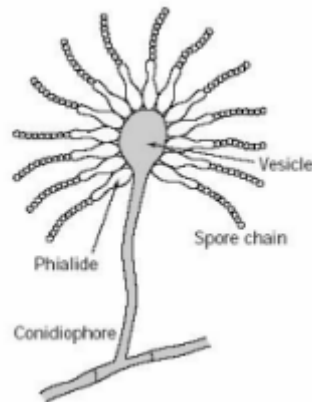


Figura 1. Morfología de *Aspergillus niger*

Sin embargo, su morfología puede confundirse con otro tipo de especies de la sección *Nigri* como: *A. tubigenis*, *A. foetidus*, *A. carbonarius*, *A. awamori*. Es por ello que se ha desarrollado una identificación de especies de *Aspergillus* a nivel molecular mediante los genes: P450, genes del ARN ribosómico, Internal Transcribed Spacer (ITS), proteasa alcalina y genes mitocondriales (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013). Sin embargo, se ha demostrado que la amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa de la región ITS es confiable para la identificación de *Aspergillus niger* (Schoch et al, 2012) (Travis, Iwen, & Hinrichs, 2000) (Turenne et al, 1999) (Samson et al, 2007).

1.7. Estrategia de fermentación

El 90% de la producción de ácido cítrico se realiza en función de procesos fermentativos. El proceso fermentativo requiere de 3 pasos: preparación e inoculación, fermentación y recuperación de ácido cítrico (Show et al, 2015). La preparación e inoculación de *A. niger* se realiza tras la esporulación en un medio de cultivo adecuado para obtener la suspensión de esporas necesarias para ser inoculadas en el medio de fermentación. Las cepas que se utilizan a nivel industrial no están disponibles para el mercado, es por ello que para el desarrollo de estos procesos se puede obtener cepas de bancos de cultivos, como por ejemplo: American Type Culture Collection (ATCC) o mediante procesos de aislamiento y caracterización (Socool et al, 2006). Existen 3 tipos de fermentación: de superficie, sólida y sumergida. El presenta altos rendimientos y productividad en relación a los demás tipos de procesos a pesar de que requiere instalaciones más sofisticadas y un riguroso control. Adicionalmente, presenta bajos costos laborales, menor riesgo de contaminación, fácil proceso de escalado, variedad de sustratos y menor tiempo de producción (5-12 días) (Socool et al, 2006). La cuantificación de la producción de ácido cítrico se puede realizar mediante espectrofotometría, cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida (HPLC), resonancia magnética nuclear o titulación. Finalmente, la recuperación de ácido cítrico se realiza mediante precipitación, extracción y adsorción (Show et al, 2015).

En el presente proyecto se va a evaluar la producción de ácido cítrico en fermentación sumergida con distintas concentraciones de sacarosa. Debido a que es un proceso de muestreo inicial, el alcance del proyecto será la cuantificación de ácido cítrico mediante la técnica de titulación.

2. JUSTIFICACIÓN

La producción de ácido cítrico a nivel mundial en el 2007 fue de 1,6 millones de toneladas con un crecimiento anual de 3.5 – 4.0 %. China es el principal productor con 50% de producción mundial y ventas a bajos costos, representado así una competencia frente a productores Europeos (Ciriminna et al, 2017). En base a estimaciones, se ha determinado que el valor del mercado de ácido cítrico continúa en crecimiento y pronto excederá un valor de \$ 2 billones (Show et al, 2015).

En Ecuador el ácido cítrico es un componente importante para diferentes industrias tales como: química, alimenticia, farmacéutica, cosmética, agrícola, entre otras. Dentro de la industria de alimentos y bebidas se utiliza un 75% de la demanda mundial, siendo un ingrediente principal en bebidas carbonatadas y edulcorantes (Show et al, 2015). Sin embargo, al no existir producción nacional, el único método para obtener ácido cítrico es su importación de China, Estados Unidos, Alemania, Colombia, Italia, Uruguay y Brasil representando un costo muy elevado. Según el Departamento Administrativo Nacional de Estadística (2015) en el 2014 se importaron alrededor de 4.325.893 kg representando un rubro de \$ 18.550.503 y en el 2015 (Enero – Septiembre) alrededor de 4.000.000 kg con un rubro de \$ 13.000.000. Adicionalmente, en base al artículo 10 del Plan Nacional del Buen Vivir del Ecuador (2013) en donde se impulsa la transformación de la matriz productiva del Ecuador, se debe impulsar la formación de nuevas industrias que contribuyan al desarrollo del país. Representando así la necesidad de investigaciones biotecnológicas que busquen disminuir su gasto económico frente a las importaciones.

Por lo tanto, en la presente investigación se busca aislar cepas de *A. niger* a partir de diferentes sustratos orgánicos y evaluar la concentración de sacarosa como fuente de carbono ya que se ha demostrado que este tipo de azúcar que genera una mayor producción de ácido cítrico (Alekseev, Dubina, & Komov, 2015) . Esto se realiza con el fin de establecer una cepa con mayor potencialidad de producción de ácido cítrico bajo condiciones estándares para el futuro desarrollo de un bioproceso a mayor escala.

3. ÁREA DE ESTUDIO

Los inóculos fueron recolectados en la ciudad de Quito, Provincia de Pichincha, Ecuador. Todos los procedimientos de aislamiento, caracterización molecular y producción de ácido cítrico fueron realizados dentro del Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito, campus Cumbayá. El procedimiento de identificación y caracterización microscópica de los aislados se realizó en el Instituto de Desarrollo de Materiales y Energías Alternativas (IDEMA), USFQ. La medición de sacarosa fue realizada dentro del Laboratorio de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito, campus Cumbayá.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar la funcionalidad de producción de ácido cítrico en fermentaciones tipo batch con medio de cultivo sintético usando cepas de *Aspergillus niger* identificadas molecularmente.

Objetivos específicos

- Aislar cepas de *Aspergillus* spp. a partir de sustratos orgánicos.
- Identificar morfológicamente y molecularmente la especie de las cepas aisladas de *Aspergillus* spp.
- Extraer ADN, amplificar por PCR y secuenciar región ITS de los aislados de *Aspergillus* spp.
- Determinar la producción de las cepas caracterizadas de *A. niger* en fermentación batch usando 3 concentraciones de sacarosa (100, 150 y 200 g/L).
- Comparar la producción de ácido cítrico de las cepas aisladas y la cepa ATCC 6275 de *Aspergillus niger* en fermentación tipo batch usando varias concentraciones de sacarosa.

5. MATERIALES

5.1. Recolección de sustratos orgánicos para el aislamiento de *Aspergillus* spp.

- Compost
- Semillas de albahaca
- Galletas
- Fundas plásticas estéril
- Caja de transporte

5.2. Preparación de medio de cultivo para aislamiento

- Papa Dextrosa Agar (PDA), DIFCO™
- Balanza analítica PIONEER™
- Medidor de pH Mi 151, MILWAUKEE
- Pesa muestras
- Frascos Pyrex (1000 mL)
- Agua destilada
- Plancha de calor BOECO MSH-420
- Ácido láctico 10% LABDIN
- Autoclave MRC, modelo UTKBS – 50 LV
- Cabina de bioseguridad BSLII
- Cajas plásticas Pétri

5.3. Aislamiento de *Aspergillus* spp. en medio Papa Dextrosa Agar (PDA)

- Tubos de ensayos con agua destilada estéril

- Vortex Scientific Industries Inc.
- Cajas petri con medio Papa Dextrosa Agar (PDA), DIFCO™
- Micropipeta 100 a 1000 µl, LABNET
- Micropipeta 10 a 100 µl, LABNET
- Azas triangulares estériles
- Incubadora INCUBATOR, modelo 6
- Cabina de bioseguridad BSLII
- Autoclave MRC, modelo UTKBS – 50 LV
- Parafilm M®

5.4. Identificación microscópica de *Aspergillus* spp.

- Microscopio LAICA DM500
- Caja Petri con micelio del hongo a identificar
- Porta objetos
- Azul de metileno
- Cinta adhesiva

5.5. Extracción de ADN nuclear de *Aspergillus* spp.

- Morteros de cerámica
- Autoclave MRC, modelo UTKBS – 50 LV
- Nitrógeno líquido
- Kit PowerSoil DNA Isolation (Mo Bio Laboratories, USA)
- Centrífuga Wisd Laboratory Instruments, modelo CF-10
- Micropipeta 100 a 1000 µl, LABNET
- Micropipeta 10 a 100 µl, LABNET

- Parafilm M ®
- Nanodrop THERMO SCIENTIFIC 2000
- Blue juice INVITROGEN ©
- Gel de agarosa LE ANALYTICAL GRADE
- Buffer TAE 1X
- SYBR ® SAFE DNA
- Cámara electroforética ENDURO LABNET
- Fotodocumentador ENDURO TM GDS
- Ladder 100 bp INVITROGEN ©

5.6. Amplificación de la región ITS 1 – ITS 4 (ADN ribosomal 5.8s) por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

- Buffer GO TAQ 10X ® INVITROGEN
- MgCl₂ 25.0 mM INVITROGEN
- dNTPs 10 mM INVITROGEN
- Primer ITS 1 10 pmol INVITROGEN
- Primer ITS 4 10 pmol INVITROGEN
- Taq DNA Polymerase 5 U/μl GO TAQ ® INVITROGEN
- Termociclador LABNET

5.7. Purificación del producto del PCR de la región ITS 1 – ITS 4

- Kit PURELINK ® GENOMIC DNA INVITROGEN
- Nanodrop THERMO SCIENTIFIC 2000

5.8. Secuenciación de la región ITS 1 – ITS 4

- Herramienta BLAST: disponible en NCBI

- Software GENEIOUS 9

5.9. Preparación de la suspensión de esporas de *Aspergillus niger*

- Micropipeta 1000 μ l, 100 μ l, 10 μ l LABNET
- Algodón esterilizado
- Azas triangulares estériles
- Micelio de *Aspergillus niger* en medio PDA (6 días de crecimiento)
- Solución Tween 20 1% estéril
- Embudo de plástico esterilizado
- Tubos Falcon (15 ml)
- Cámara de cultivo, Diseño Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos II
- Microscopio Radical modelo RXL – 4T
- Azul de metileno
- Cámara de Neubauer BODECO

5.10. Elaboración de medio de cultivo en sistema batch

- Frascos Pyrex (500 ml)
- Algodón, Gasas y Esparadrapo
- Manguera de venoclisis
- Agua destilada
- Sulfato de hierro H.V.O.
- Nitrato de amonio H.V.O.
- Sulfato de zinc heptahidratado H.V.O.
- Sulfato de magnesio H.V.O.
- Fosfato de potasio Reactivos H.V.O.

- Sacarosa marca comercial SAN CARLOS
- Autoclave MRC, modelo UTKBS – 50 LV
- Incubadora

5.11. Determinación del crecimiento de *Aspergillus* spp.

- Espectrofotómetro GEASYS 10 UV, THERMO SPECTRONIC
- Agua destilada
- Baño maría, Fisher Scientific
- Tubos de ensayo
- Fenol 5% SIGMA ALDRICH
- Ácido sulfúrico 95% HVO
- Micropipeta 1000 μ l, 100 μ l, 10 μ l LABNET
- Papel filtro estéril Whatman 40
- Embudo de plástico

5.12. Determinación producción de ácido cítrico

- Soporte universal
- Fenoftaleína H.V.O.
- Hidróxido de sodio (1 M) H.V.O.
- Gotero
- Bureta
- Erlenmeyer (100 ml)
- Pipeta volumétrica (10 ml)
- Papel filtro estéril Whatman 40
- Embudo de plástico

6. MÉTODOS

6.1. Recolección de sustratos orgánicos

Los sustratos a partir de los cuales se aislaron las cepas de *Aspergillus* spp. fueron: frutos cítricos (limón, naranja, arazá), granos (café, alverja), alimento rico en almidón (galletas), material vegetal (semillas de albahaca) y muestra de compost.

Las muestras de frutos cítricos, granos y material vegetal fueron ubicadas en fundas estériles individualmente. Se seleccionó semillas de albahaca que presentaba micelio de hongos. Las muestras fueron transportadas bajo temperatura ambiente en una caja de transporte y se las almacenó por 3 días. Por otra parte, el alimento rico en almidón fue ubicado dentro de fundas estériles y almacenadas dentro de un lugar oscuro a temperatura ambiente y se las almacenó por 3 días.

6.2. Aislamiento de *Aspergillus* spp. a partir de sustratos orgánicos

Para el aislamiento de colonias de *Aspergillus* spp. se preparó el medio de cultivo PDA en función de las indicaciones del fabricante. Se esterilizó en el autoclave a 121 °C durante 20 min. Una vez que se enfrió el medio de cultivo PDA, se colocó 2 gotas de ácido láctico por litro de medio y se dispensó 25 ml de medio en cajas Petri plásticas y se dejó en reposo hasta que el medio se solidifique. Luego, se almacenó a 4 °C hasta su posterior uso. Posteriormente, se tomó 10 gramos del sustrato orgánico y se diluyó en 90 ml de agua destilada estéril, a partir de dicha solución se tomó 1 ml y se diluyó en 9 ml de agua destilada estéril y se obtuvo la dilución 10^{-1} . Se realizó este procedimiento hasta llegar a la dilución 10^{-10} . Luego, se inoculó 0,1 ml de las diluciones impares en las cajas Petri con medio PDA por el método de extendido en placa. Se incubó durante 5 días a 28 °C.

De las colonias obtenidas en el medio PDA se seleccionó las que presentaban morfología esperada para *Aspergillus niger*: vista frontal de color negro, vista posterior de color amarillo y micelio filamentoso. Se las subcultivó individualmente en medio PDA y se incubó durante 5 días a 28 °C. Se realizó este proceso de subcultivos sucesivos hasta obtener colonias individuales con la morfología esperada Samson et al (2007).

6.3. Identificación microscópica de *Aspergillus* spp.

Para la identificación microscópica de las colonias al 3er día del cultivo se tomó una muestra del micelio con cinta adhesiva transparente y se colocó en un portaobjetos que tuvo una gota de azul de metileno. Se debe tener cuidado de no generar burbujas.

Posteriormente, se observó bajo el microscopio en un aumento de 40 X y se diferenciaron los conidióforos, conidios e hifas descritos según Samson et al (2007).

6.4. Extracción de ADN total de los aislados de *Aspergillus* spp.

Para la extracción de ADN, primero se preparó medio de cultivo PDB en función de las indicaciones del fabricante y se colocó 50 ml en Erlenmeyer de 100 ml. Se esterilizó el medio a 121 °C durante 20 min. Luego, se cortó un pedazo del medio PDA que contenga el micelio de los aislados de *Aspergillus* spp. previamente obtenidos y se colocó en medio PDB. Se incubó el cultivo durante 3 días a 28 °C. Posteriormente, se separó el micelio del medio PDB a través de papel filtro estéril y se maceró con nitrógeno líquido. Se transfirió 250 µg de la maceración al tubo PowerBead del Kit PowerSoil – DNA Isolation (Mo Bio Laboratories, USA) y se siguió el proceso de extracción según las indicaciones del fabricante.

Para la comprobación de la calidad de extracción se realizó una cuantificación en el Nanodrop 2000 obteniendo así indicadores de la concentración (ng/μl), relación 260/280 y 260/230. Adicionalmente, se realizó un gel de agarosa al 2% mediante la dilución de 1.2 g de agarosa en el buffer TAE 1X en una plancha de calor, se dejó enfriar y se colocó 2 μl de SYBR® SAFE DNA. Se ubicó en los pocillos del gel de agarosa una solución de: 4 μl de la extracción más 2 μl de Blue Juice INVITROGEN®. Para el ladder se ubicó una solución de: 1 μl de ladder 100 bp INVITROGEN® más 2 μl de Blue Juice INVITROGEN®. Las muestras se dejaron correr en la cámara de electroforesis ENDURO LABNET durante 45 minutos a 80 V. Finalmente, el gel de agarosa se visualizó en el Fotodocumentador ENDURO™ GDS con luz ultravioleta.

El permiso de acceso a recursos genéticos (cepas de *Aspergillus niger*) fue concedido por parte de la Autoridad Nacional Competente (Ministerio del Ambiente del Ecuador) en el contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos del Programa de Investigación Científica Denominado (MAE-DNB-CM-2016-0046): “Investigación Genética de la Biodiversidad de Ecuador Continental” Celebrado entre El Ministerio del Ambiente, a través de la Subsecretaría de Patrimonio Natural; Y, La Universidad San Francisco de Quito.

6.5. Amplificación de la región ITS 1 – ITS 4 (ADN ribosomal 5.8s) por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se lo realiza mediante la técnica convencional de PCR con el uso de los primers universales ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS 4 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') (Hermosa, y otros, 2000). El procedimiento de amplificación fue estandarizada en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito. Las concentraciones de reactivos utilizados y los parámetros utilizados en el termociclador se indican en la Tabla 1 y Tabla 2.

Tabla 1. Cantidad de reactivos utilizados por reacción de PCR para la amplificación de la región ITS.

Reactivos	Volumen para 1X (μl)
Buffer 10 X	5
MgCl ₂ 50mM	4
dNTPs(10mM)	2
Primer ITS 1(10pmol)	2
Primer ITS 4(10pmol)	2
<i>Taq</i> polimerasa	1
ADN 50ng/mL	2
H ₂ O	32
Volumen total	50

Tabla 2. Condiciones de operación de PCR para la amplificación de la región ITS en hongos.

Programa	T°	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	95 °C	5 min	1
Desnaturalización	94 °C	1 min	35
Hibridación	62,3°C	2 min	
Extensión	72 °C	2 min	
Extensión Final	72 °C	10 min	1
Reposo	10 °C	10 min	

Para la comprobación de la calidad de la amplificación se realizó una cuantificación en el Nanodrop 2000 obteniendo la concentración (ng/μl), relación 260/280 y 260/230.

Adicionalmente, se analizó la presencia de la amplificación por lo que realizó un gel de agarosa al 1% mediante la dilución de 0.6 g de agarosa en el buffer TAE 1X descritos anteriormente.

6.6. Secuenciación del producto de PCR de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8 S

Las muestras de amplificación de la región ITS fueron empacadas y enviadas a la compañía MACROGEN (Seúl, Corea) para su secuenciación. Las secuencias recibidas fueron analizadas mediante el programa Geneious 9 ® y fueron comparadas con la base de datos del NCBI © con la herramienta molecular BLAST, arrojando de esta manera la identidad de los aislados.

6.7. Preparación de la suspensión de esporas de *Aspergillus niger*

Para la producción de ácido cítrico a partir de *A. niger* es necesario obtener la suspensión de esporas. Para ellos se obtuvo aislados de *Aspergillus niger* en medio PDA con crecimiento de 5 días a 28 °C. Luego se realizó un raspado del micelio con 3 ml de una solución de 0,1% Tween 20, la solución obtenida se filtró a través de un embudo con algodón estéril. Este proceso se lo realizó hasta obtener un volumen de 5 ml de suspensión de espora. La solución fue recuperada en un tubo falcon de 15 ml.

6.8. Preparación de recipientes y medios de cultivo para la producción de ácido cítrico

Para la producción de ácido cítrico se estableció un sistema de fermentación batch en frascos de vidrio de borosilicato de 500 ml. Se cubrió la entrada con un tapón de algodón cubierto de gasa, con dos ingresos por medio de mangueras de venoclisis. Cada frasco se llenó con un volumen de 400 ml de medio. La concentración de los nutrientes de los medios de cultivo con los cuales se trabajó se indica en Tabla 3.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo sintético para la producción de ácido cítrico.

Nutriente	Concentración			Unidades	Referencia
	100	150	200		
Sacarosa	100	150	200	g/L	(Acourene & Ammouche, 2012)
Fosfato de Potasio	2,5			g/L	(Dhillon, Brar , Verma , & Tyagi, 2011) (Gómez, Sánchez, Muñoz , & Valencia , 2014)
Nitrato de Amonio	0,25			g/L	
Sulfato de Hierro	1,3			ppm	
Sulfato de Zinc	0,3			ppm	
Sulfato de Magnesio	0,2			g/L	

Para la preparación de los diferentes ensayos se prepararon diferentes soluciones stock. Una solución stock de fosfato de potasio (Stock A) 10X mediante la adición de 45.4 g en un litro de agua destilada. Se preparó una solución stock de micronutrientes 100X (Stock B) compuesta por 32 g nitrato de amonio, 89 mg sulfato de zinc y 25 g sulfato de magnesio en un litro de agua destilada. Únicamente los stocks de fosfato de potasio y stock de micronutrientes se esterilizaron a 121 °C durante 20 min. Se preparó una solución stock de sulfato de hierro 1000X (Stock C) mediante la adición de 2.6 g sulfato de hierro en un litro de agua destilada. Para cada ensayo se colocó la cantidad de sacarosa a analizar (100, 150, 200 g/l) y se disolvió en agua destilada, se colocó 100 ml del stock A / L medio de fermentación y 10 ml del stock B / L medio de fermentación y se aforó a 1 litro con agua destilada. Posteriormente, se ubicó 400 ml de medio de fermentación en un frasco Pyrex de 500 ml. Los medios se esterilizaron a 121 °C durante 20 min. Finalmente, se colocó 1 ml del stock C por litro de medio de fermentación dentro de la cámara de flujo laminar.

6.9. Bioproceso de producción de ácido cítrico

Los tratamientos de los experimentos que se realizó fueron con tres aislados de *Aspergillus niger* aisladas, una cepa de *Trichoderma harzianum* (control negativo para la producción de AC cítrico, proporcionado por el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos – USFQ) y una cepa de *Aspergillus niger* ATCC 6275 (control positivo) y un medio abiótico (blanco).

A partir de la solución de conidias se realizó el conteo dentro de la cámara de Neubauer y se realizaron las diluciones correspondientes para obtener una concentración de 1.6×10^8 conidias / 400 ml de medio de fermentación (Dhillon et al, 2011).

Las condiciones operacionales del bioproceso fue a una temperatura de 30 °C, 200 rpm durante 144 horas (Dhillon et al, 2011). (Acourene & Ammouche, 2012) (Gómez, Sánchez, Muñoz , & Valencia , 2014).

6.10. Determinación del crecimiento de *Aspergillus niger*

El crecimiento de *A. niger* fue determinado mediante una detección indirecta del crecimiento microbiano, en la cual se evalúa la concentración de sacarosa. Para esto, se preparó una curva de calibración a partir de una solución madre de sacarosa de 200 mg/L. A partir de esta solución madre se preparó 11 diluciones para realizar la curva de calibración, los cuales se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Preparación de estándares de glucosa a partir de una solución madre de 200 mg/L

No.	Glucosa 200 mg/L [mL]	H ₂ O [mL]	Estándares [mL]	Fenol 5% [mL]	H ₂ SO ₄ [mL]	Total [mL]
1	0	0,5	0,5	0,5	2,5	3,5
2	0,05	0,45	0,5	0,5	2,5	3,5
3	0,1	0,4	0,5	0,5	2,5	3,5
4	0,15	0,35	0,5	0,5	2,5	3,5
5	0,2	0,3	0,5	0,5	2,5	3,5
6	0,25	0,25	0,5	0,5	2,5	3,5
7	0,3	0,2	0,5	0,5	2,5	3,5
8	0,35	0,15	0,5	0,5	2,5	3,5
9	0,4	0,1	0,5	0,5	2,5	3,5
10	0,45	0,05	0,5	0,5	2,5	3,5
11	0,5	0	0,5	0,5	2,5	3,5

Se tomaron muestras de los bioensayos cada 24 horas en un tubo eppendorf de 1.5 ml, a partir de la cual se tomó 1 μ l de muestra y se diluyó en 999 μ l de agua destilada. A partir de esta dilución se transfirió 0,5 ml de la muestra a un tubo de ensayo donde se añadió 0,5 ml de una solución de fenol al 5% (v/v) y 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se mezcló cada tubo, se dejó reposar durante 7 minutos y posteriormente se calentó a 45°C durante 20 minutos. Una vez fríos los tubos de ensayo, se midió la concentración de sacarosa de cada muestra en base a la intensidad del color a una longitud de onda de 490 nm empleando el espectrofotómetro. Estándares y blancos se corrieron durante cada medición para minimizar errores instrumentales y asegurar la precisión del método analítico (Dubois , Gilles , Hamilton, Rebers, & Smith, 1956).

6.11. Determinación de la producción de ácido cítrico

La determinación de la concentración de ácido cítrico se realizó mediante titulación (Show, y otros, 2015) en donde se considera que la acidez titulable es proporcional a la cantidad de ácido cítrico presente en base a un factor de conversión (Bakhiet & Mokhtar, 2015).

Se filtró 10 ml de los bioensayos cada 24 horas y se colocó 2 gotas de fenolftaleína al 1% para proceder a titular con NaOH 1M. Cuando se alcanzó el punto de viraje (cambio a color morado) se registró el volumen de NaOH utilizado y se multiplicó por 6.4 dando así un valor de concentración de ácido cítrico en g/L.

7. RESULTADOS

7.1. Aislamiento e identificación de *Aspergillus* spp.

Para el proceso de aislamiento de *Aspergillus* spp. se cultivó durante 5 días muestras de sustratos orgánicos en medio PDA. Se obtuvo una gran cantidad de microorganismos, sin embargo se seleccionaron colonias con conidios negros e hifas blancas, las cuales representan la morfología esperada del género *Aspergillus* spp. (Samson et al, 2007). Los sustratos de los que se obtuvo colonias con dicha morfología fueron: semillas de albahaca, galletas y muestras de compost. De esos sustratos se obtuvo un aislado por cada sustrato, y se codificaron de la siguiente manera:

- A. Aislado Compost
- B. Aislado Semilla de Albahaca
- C. Aislado de Galletas

Los tres aislados obtenidos presentaron colonias blancas con micelio filamentoso, borde circular y altamente productoras de conidios negros (Figura 2: 5-8), mientras que en la base de la caja de cultivo se presentó un color amarillo con centro café (Figura 2: 1-4). Se observó muestras de estas colonias en el microscopio a 40, y se encontró vesículas circulares con un tamaño mayor a 50 μm , conidias esféricas de color negro y no presenta métulas (Figura 2: 9-12). La cepa ATCC 6275 se cultivó en medio en medio PDA durante 5 días, a partir de la cual se puede tener una referencia adicional de morfología requerida para seleccionar las colonias (Figura 2: 4,8,12).


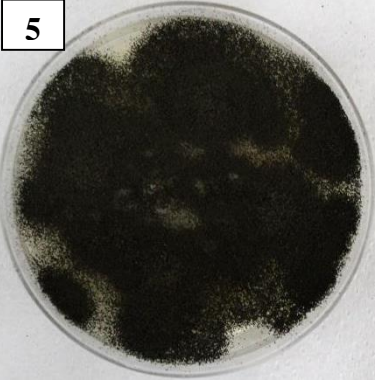
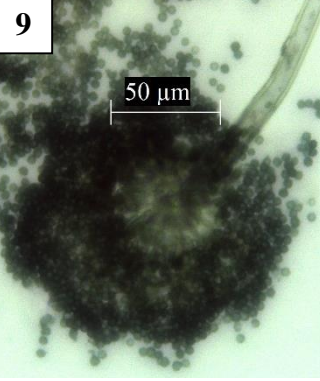
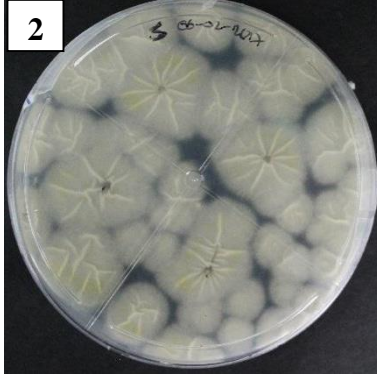
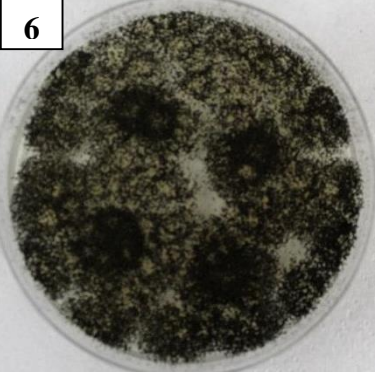
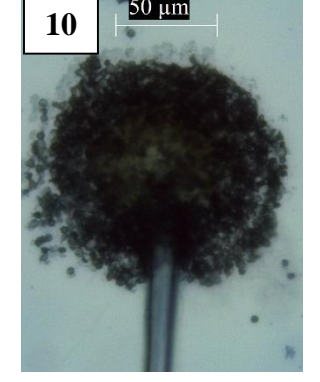

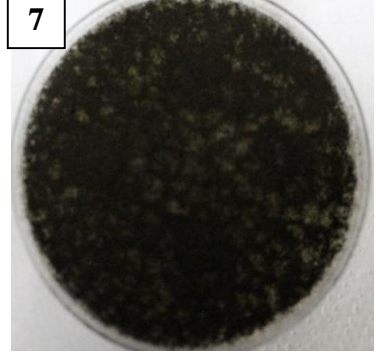
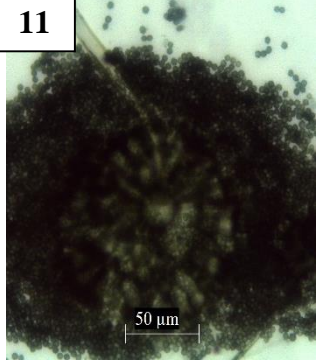
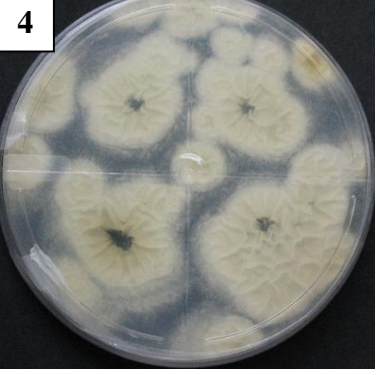

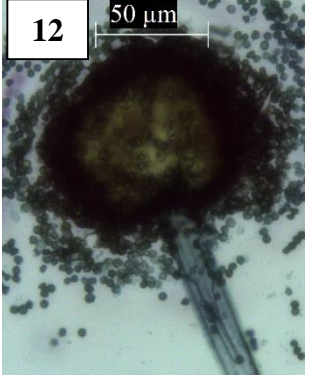
Aislado	Origen	Vista de la base de la colonia	Vista superior de la colonia	Microscopía (40X)
A	Compost			
B	Semilla de Albahaca			
C	Galletas			
Referencia: Cepa D				

Figura 2. Cultivos de *Aspergillus niger* en medio PDA a partir de distintas fuentes orgánicas. 1 – 8: morfología macroscópica; 9 – 12: morfología microscópica.

7.2. Extracción de ADN a partir de los aislados y cepa de *Aspergillus niger*

Luego de 3 días de crecimiento en medio PDB se recuperó el micelio y se dio inicio al proceso de extracción de ADN de los aislados de *Aspergillus niger* y la cepa ATCC 6275 con el Kit PowerSoil® DNA Isolation (Mo Bio Laboratories, USA). Se comprobó la presencia de ADN genómico a través de electroforesis en gel de agarosa al 2%. En el gel de electroforesis se evidenció una banda mayor a 1500 pb, lo que indica la presencia del ADN genómico (Figura 3).

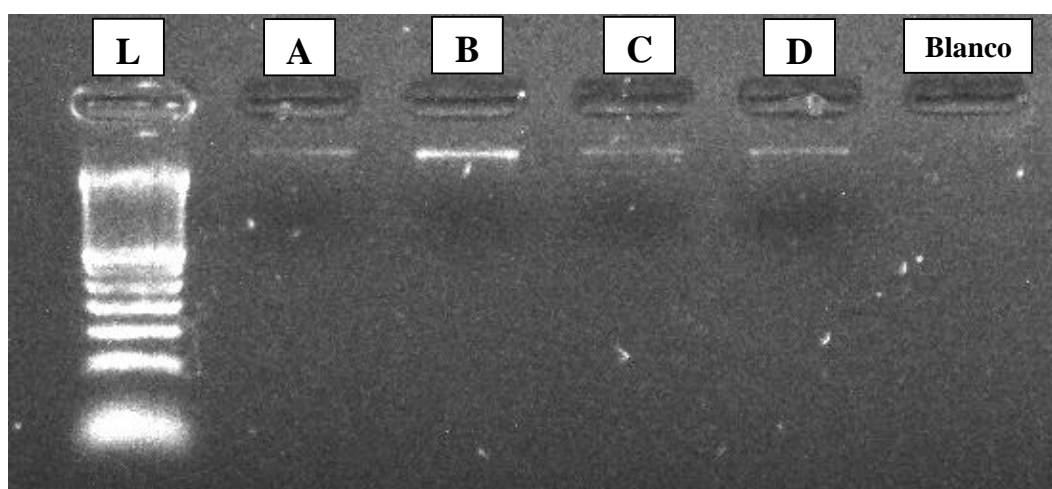


Figura 3. Gel de electroforesis al 2% de agarosa que presenta la extracción de ADN con el Kit PowerSoil® DNA Isolation (Mo Bio Laboratories, USA). Orden de carga: L: marcador de peso molecular (100 bp INVITROGEN®), Aislados: A, B, C, D y Blanco

Se cuantificó el ADN con el Nanodrop 2000, en donde se obtuvo una concentración de ADN en un rango de 8,3 – 11,6 ng/μl. Sin embargo, la relación 260/280 presenta valores superiores a 2 (Tabla 5), por lo que se puede inferir que el contenido de proteínas es muy bajo en la muestra, lo que nos indica un ADN de buena calidad que puede ser usado en procesos posteriores como el PCR.

Tabla 5. Cuantificación del ADN total extraído en el Nanodrop 2000 a partir de los cultivos de *Aspergillus* spp. mediante el Kit Power Soil ® DNA Isolation (Mo Bio Laboratories, USA).

Muestra	Concentración (ng/μl)	260/280	260/230
A	11,6	2,47	1,62
B	9,1	3,21	1,44
C	8,1	2,20	1,90
D	8,3	2,16	1,80

7.3. Amplificación de la región ITS mediante la técnica PCR

Luego del proceso de extracción de ADN se amplificó la región ITS mediante el uso de primers universales para la región ITS 1 – ITS 4. Los productos amplificados fueron visualizados por medio de electroforesis en agarosa al 2%, en donde se observó un fragmento con un peso molecular de 600 pb (Figura 4), que coincide con el tamaño esperado de la región ITS1-ITS4. De esta manera se indica que hubo una correcta amplificación y no se evidencia amplificaciones inespecíficas ya que en el “blanco” no se presentó algún tipo de producto.

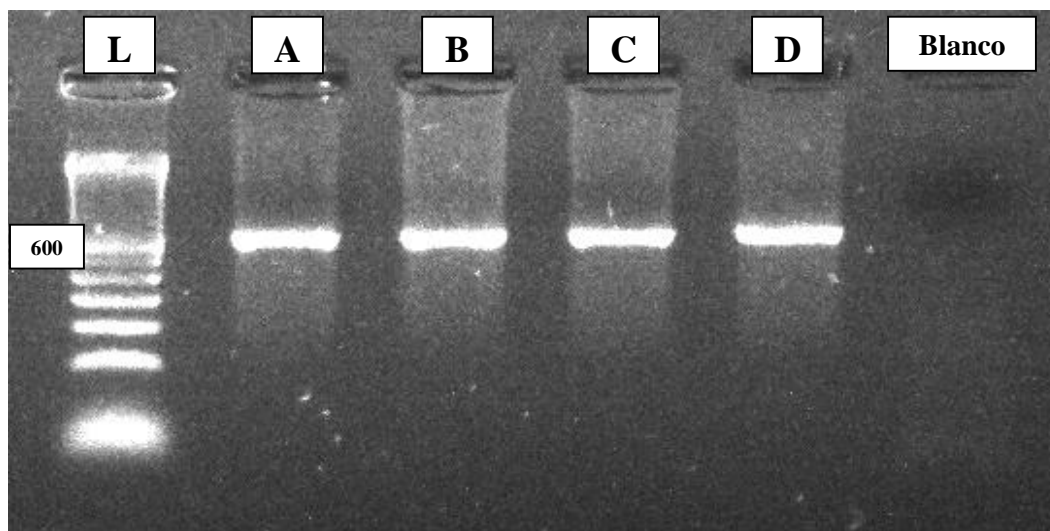


Figura 4. Gel de Electroforesis al 1% de agarosa que presenta la amplificación de la región ITS. Orden de carga: L: marcador de peso molecular (100 pb INVITROGEN ©), Aislados: A, B, C, D y Blanco. Se espera un tamaño de banda de 600 pb,

7.4. Identificación en base a la secuenciación del producto de PCR de la región ITS del ADN ribosomal

Los productos de PCR se enviaron a secuenciar a Macrogen (Corea del Sur). Una vez que se recibieron las secuencias, se editaron para eliminar las regiones que mostraban ruido utilizando el programa Geneious 9.

Para la identificación de la especie de los aislados de *Aspergillus* spp. se utilizó la herramienta BLAST, y se determinó que los aislados corresponden a la especie *Aspergillus niger* (Tabla 6)

Tabla 6. Identidad de los aislados de *Aspergillus niger* y cepa ATCC 6275 mediante el alineamiento de la región ITS 1 – ITS 4 con secuencias disponibles en el Gen Bank proporcionadas mediante BLAST

Aislado	Accesión	Organismo	Max SCORE	Total SCORE	Query Cover	E-value	Identidad
A	KX253667.1	<i>Aspergillus niger</i> isolate Asp 546	555	555	100%	3E-154	100%
B	KX181866.1	<i>Aspergillus niger</i> strain Badry79	641	641	100%	3E-180	99%
C	KY031976.1	<i>Aspergillus niger</i> strain F10A	325	325	97%	2E-185	99%
D	KP172477.1	<i>Aspergillus niger</i> strain MBL1511	763	763	100%	0.0	97%

7.5. Crecimiento en el medio de cultivo con diferentes concentraciones de sacarosa

El crecimiento se evaluó mediante la determinación de la concentración de sacarosa cada 24 h por un período de 144 h utilizando la curva de calibración en el Anexo 2. En base a esto, se evidenció la degradación de sacarosa del medio de cultivo a través del tiempo (Figura 5)

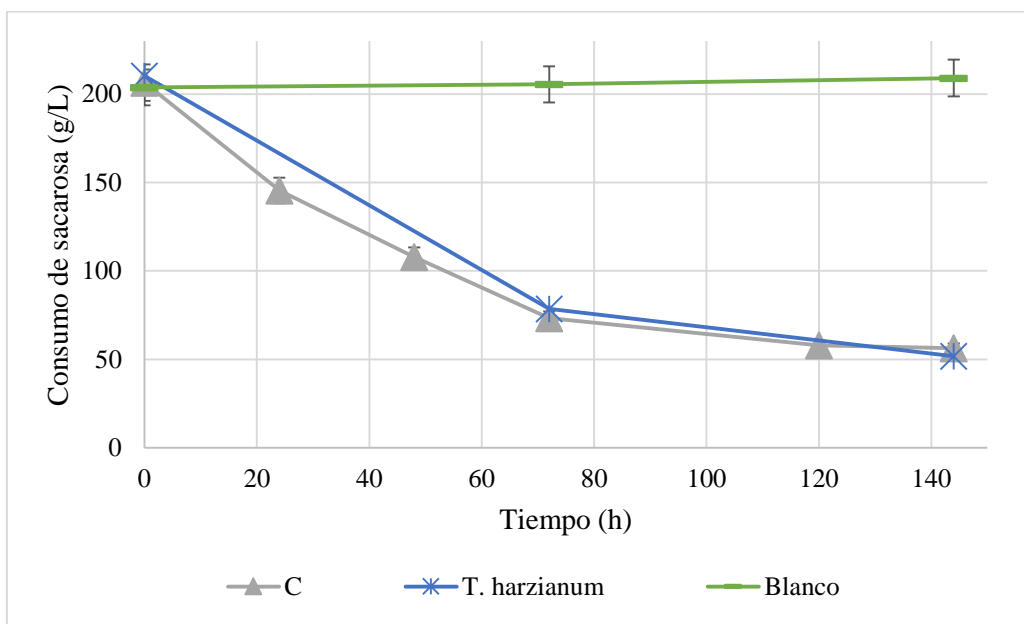


Figura 5. Curva de degradación de sacarosa por parte de la cepa C y *T. harzianum* luego de 144 h de fermentación.

Para la generación de la curva de crecimiento indirecto mostrada en la Figura 5, sólo se tomó la cepa de *Trichoderma harzianum*, la cepa C y el tratamiento abiótico (blanco) con una concentración de 200 g sacarosa / L, como una representación de todas las cepas, ya que son las que presentan más significancia en el consumo; y, las demás cepas se comportan de manera similar (Anexo 4). Se determina que existe una fase exponencial muy pronunciada desde las 24 h hasta las 27 h, posterior a esto se presenta un cambio en la pendiente dando lugar al inicio de la fase estacionaria.

En base a la concentración de azúcar, se calculó el consumo de sacarosa a las 144 h. Para esto se restó la concentración inicial de sacarosa a las 0 h menos la concentración de sacarosa residual a las 144 h. Para determinar diferencias estadísticas significativas, se comparó la media de consumo de sacarosa a las 144 h para cada cepa estudiada (Figura 6).

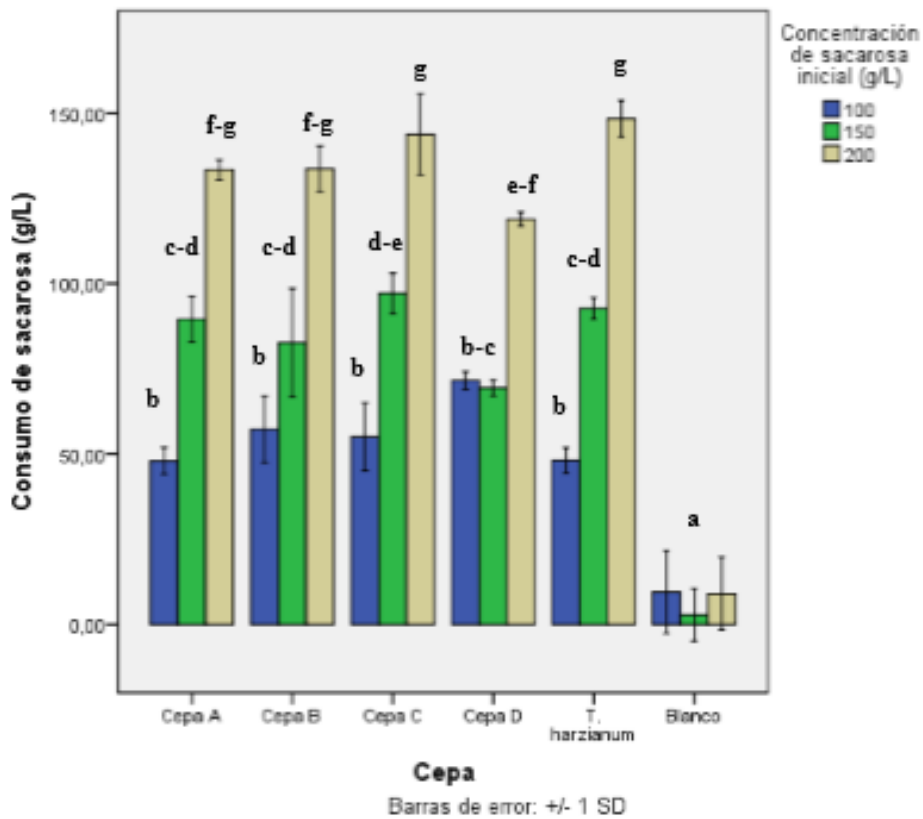


Figura 6. Consumo de sacarosa por parte de las cepas evaluadas luego de 144 h de fermentación en distintas concentraciones de sacarosa.

En base al análisis de varianza (ANOVA) (Anexo 2) y la prueba de Tukey 5% (Anexo 3) se obtuvieron 7 grupos (a, b, c, d, e, f, g) los cuales tienen medias estadísticamente iguales. Se evidencia que las cepas: *Trichoderma harzianum* y la cepa C son las que tienen un mayor consumo de sacarosa en una concentración inicial de 200 g sacarosa / L. La cepa de *T. harzianum* consumió 148,3 g de sacarosa, mientras que la cepa D consumió 143,7 g de sacarosa. Para el tratamiento abiótico (blanco), no se obtuvo una degradación significativa de sacarosa en ninguna concentración inicial en relación a los demás grupos.

7.6. Producción neta de ácido cítrico en medios de cultivo con diferentes concentraciones de sacarosa.

La producción neta de ácido cítrico se evaluó mediante la titulación del filtrado del medio de cultivo cada 24 h por 144 h. En base a esto, se evidenció la producción de ácido cítrico en el medio de cultivo a través del tiempo (Figura 7)

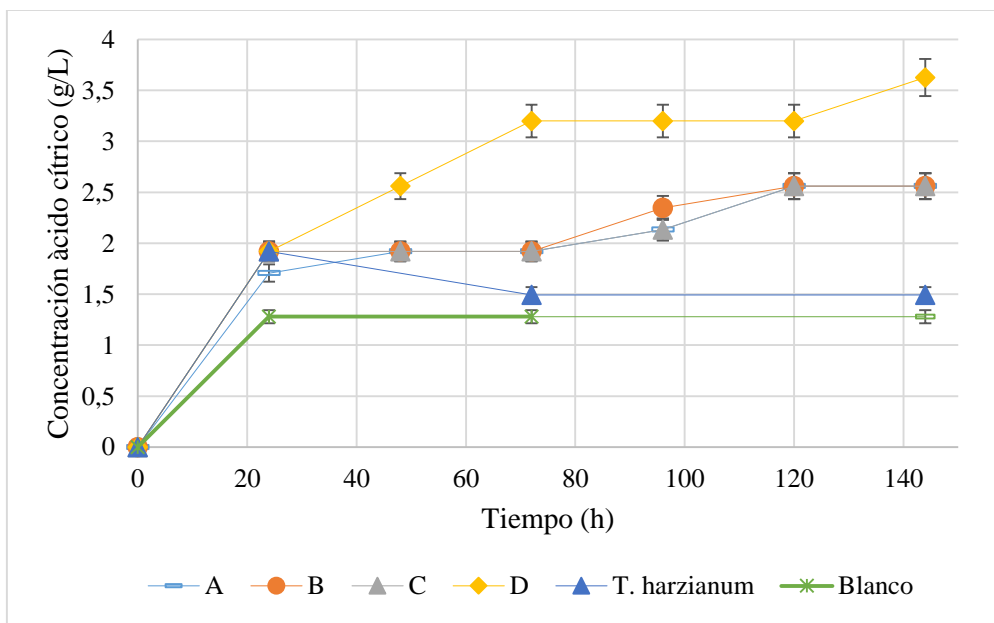


Figura 7. Producción de ácido cítrico por parte de las cepas evaluadas en una concentración de 200 g/L de sacarosa

Para la generación de la curva de producción de ácido cítrico mostrada en la Figura 7, se tomaron todas las cepas analizadas con una concentración de 200 g Sacarosa / L ya que a esta concentración se presenta una máxima producción neta en relación a otras concentraciones de sacarosa evaluadas; y, las demás cepas en concentraciones de 100 y 150 g Sacarosa / L se comportan de manera similar pero con bajas concentraciones (Anexo 7). Se determina que en las cepas A, B, C existe una fase exponencial pronunciada desde las 24 h hasta las 120 h, en la cepa D hay una fase exponencial desde las 24 h hasta las 72 h y luego otra a las 120 h. Posterior a esto se presenta una estabilización de producción ya que la pendiente cambia, dando lugar a la fase estacionaria.

En base a la concentración de ácido cítrico, se calculó la concentración de ácido cítrico a las 144 h. Para determinar diferencias estadísticas significativas, se comparó la media de concentración de ácido cítrico a las 144 h para cada cepa estudiada (Figura 8).

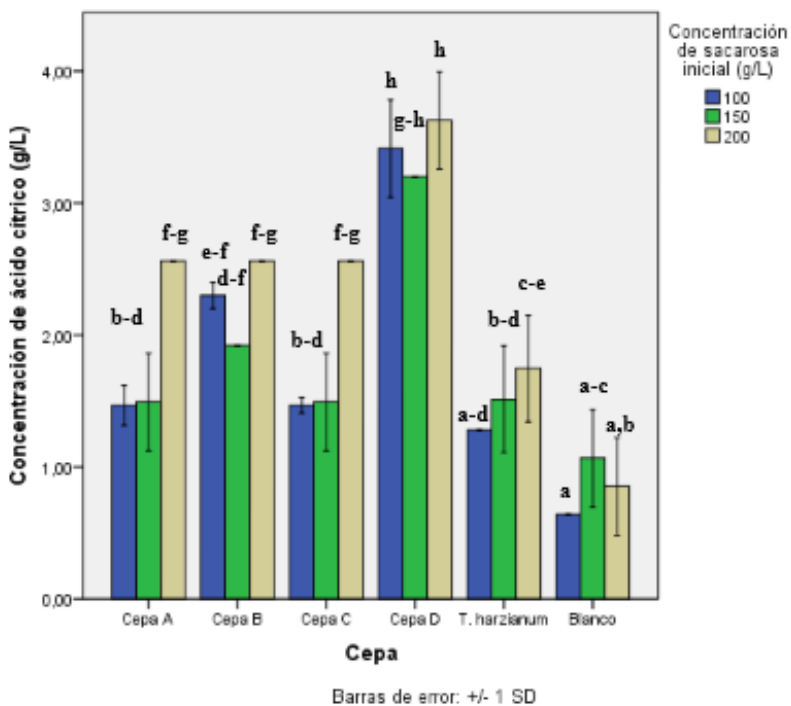


Figura 8. Producción de ácido cítrico por parte de las cepas evaluadas luego de 144 h de fermentación en distintas concentraciones de sacarosa.

En base al análisis de varianza (ANOVA) (Anexo 5) y la prueba de Tukey 5% (Anexo 6) se obtuvieron 8 grupos (a, b, c, d, e, f, g, h) los cuales tienen medias estadísticamente iguales. Se evidencia que la el tratamiento con cepa D es la que tiene un mayor producción neta de ácido cítrico de 3.5 g ácido cítrico / L. Adicionalmente, las cepas A, B y C presentan la misma concentración de 2.5 g ácido cítrico / L. Para el tratamiento abiótico (blanco) y con la cepa *T. harzianum*, no se obtuvo una concentración significativa de ácido cítrico en relación de los demás grupos.

7.7. Análisis de rendimiento de producción de ácido cítrico en relación al consumo de sacarosa

En base a los datos de consumo de sacarosa y producción de ácido cítrico es válido evaluar la cinética de las cepas evaluadas. En la Figura 9 se indica la cinética de la cepa D, en donde se aprecia que la producción de ácido cítrico es directamente proporcional al consumo de sacarosa del medio de cultivo, esto es debido a que la fase exponencial de producción de ácido cítrico se encuentra en el mismo rango de tiempo en cuanto al consumo de sacarosa. Se utiliza esta cinética como una representación de la cinética de las demás cepas analizadas ya que todas poseen el mismo patrón.

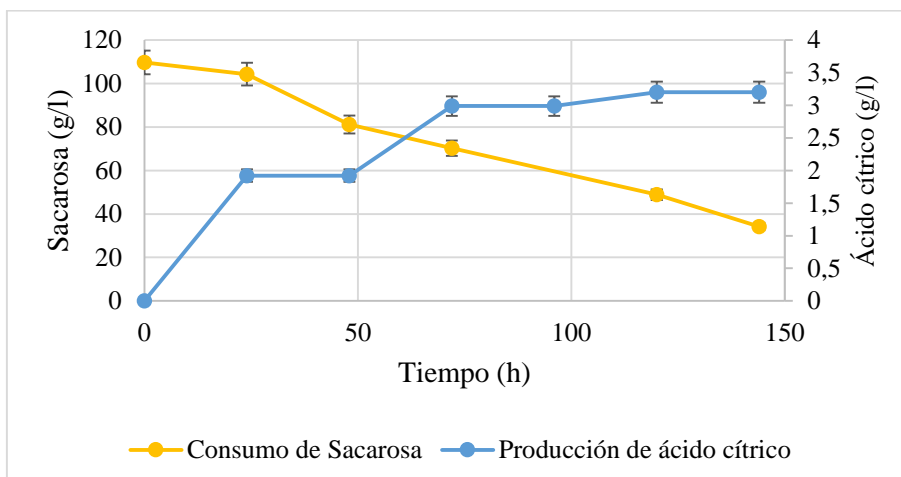


Figura 9. Cinética de producción de ácido cítrico por parte de la cepa D luego de 144 h de fermentación en 100 g Sacarosa / L.

Debido a que se demuestra la relación de producción de ácido cítrico con el consumo de sacarosa es útil analizar el rendimiento de producción. Esto se evaluó mediante la relación entre los gramos de ácido cítrico producido y los gramos de sacarosa consumida a las 144 h. En base a esto, se evidenció el rendimiento en todos los tratamientos realizados (Figura 10).

En base al análisis de varianza (ANOVA) (Anexo 9) y la prueba de Tukey 5% (Anexo 10) se obtuvieron 6 grupos (a, b, c, d, e, f) lo cuales tienen medias estadísticamente iguales. Se evidencia que todas las cepas analizadas presentan un mejor rendimiento de producción a una concentración de 100 g Sacarosa / L, a excepción de la cepa D que también presenta un alto rendimiento en una concentración de 150 g Sacarosa / L. El mejor rendimiento son de las cepas D y B ya que presentan un rendimiento de 0.045 y 0.043 g de ácido cítrico / g sacarosa consumida (Figura 10). Esto indica que la cepa aislada B presenta un rendimiento similar ante la cepa D que es el control positivo, determinando así la importancia de análisis de su rendimiento en base del consumo de sacarosa para futuros estudios.

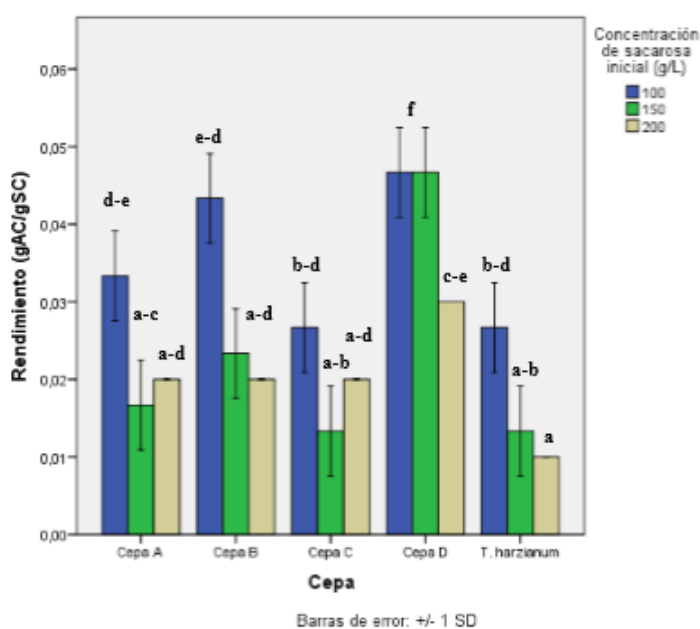


Figura 10. Rendimiento efectivo de producción de ácido cítrico en base al consumo de sacarosa por parte de las cepas evaluadas luego de 144 h de fermentación en distintas concentraciones de sacarosa.

8. DISCUSIÓN

8.1. Aislamiento e identificación de *Aspergillus* spp.

En el presente estudio para el aislamiento de *Aspergillus* spp. se tomó como sustratos: materia orgánica en descomposición (galletas y compost) y material vegetal (semillas de albahaca), lo cual concuerda con que el género *Aspergillus* es considerado saprofitos ubicuos. Los principales hábitats son: el suelo, plantas, materia orgánica en descomposición, agua y aire (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013). En estudios en los que se han realizado aislamiento de *Aspergillus niger* a partir de diferentes sustratos orgánicos se han reportado resultados similares a los del presente estudio: 1 cepa en bagazo de caña de azúcar (Tuquerres et al, 2015), 6 cepas a partir de compost (Rohit et al, 2013), 12 cepas a partir de muestras de suelo, frutas, granos y panes (Martinez et al, 2014), sin embargo, en estudios en los que se utiliza muestras de suelo se ha logrado encontrar una mayor cantidad llegando a reportarse 197 aislados (Iqbal et al, 2015). Por lo que el suelo es una fuente importante de diversidad que debe ser considerado en estudios futuros. En base a Socool et al (2006) las mejores metodologías para el aislamiento de cepas productoras de ácido cítrico es mediante la técnica de spora simple y el método de subcultivo sucesivo. En el presente estudio, se realizó mediante el método de subcultivo sucesivo con el que por medio de la selección de las colonias a partir de su morfología se logró aislar tres cepas de *Aspergillus* (Abarca, 2000). Las tres cepas concordaron con las características morfológicas esperadas para este género: colonias de conidios globulares de color negro y en el reverso de color amarillo (Figura 2). Cabe mencionar que la morfología de colonias de *A. niger* y especies uniseriadas no se pueden distinguir por su patrón de crecimiento de colonia (Samson et al, 2007). Es por ello que es necesario un análisis de microscopia, en donde se pueda diferenciar: la vesícula (extremo apical), el estípe (sección cilíndrica luego de la vesícula) y conidios. *Aspergillus niger* es una especie uniseriada ya que no presenta mótulas entre la vesícula y las fiálides, lo cual se puede corroborar en la

Aislado	Origen	Vista de la base de la colonia	Vista superior de la colonia	Microscopía (40X)
A	Compost			
B	Semilla de Albahaca			
C	Galletas			
Referencia: Cepa D				

Figura 2. La medida del ancho de las vesículas son de 30 a 75 μm (Samson et al, 2007) (Abarca, 2000). Estos datos concuerdan con lo encontrado en este estudio (Figura 3).

8.2. Identificación molecular de los aislados de *Aspergillus* spp.

Samson et al (2007) demuestran que la diferenciación morfológica de *A. niger* con otras especies de *Aspergillus* sección Nigri es muy compleja. Por ello es necesario el estudio de amplificación de regiones específicas del ADN nuclear mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Existen diferentes regiones ampliamente utilizadas para los estudios de identificación molecular como son el gen de la β -tubulina y la región Internal Transcribed Spacer (ITS). Se ha demostrado que la amplificación de la región que comprende al ITS 1, la unidad ribosomal - 5.8S y al ITS 2 es ampliamente utilizada y útil para la identificación de *A. niger* (Travis, Iwen, & Hinrichs, 2000), esto se debe a que esta región de los genes ribosomales es altamente conservada entre diferentes clado del dominio Eucaria (Turenne et al, 1999) y ha sido establecida como un marcador con la mayor probabilidad de éxito para la identificación de especies del género *Aspergillus* (Schoch et al, 2012). En el presente estudio, se realizó la amplificación de la región final del 18 S – ITS 1 – 5.8 S – ITS 2 – inicial del 28 S, utilizando los primers universales ITS 1 e ITS 4. En base a la secuencia de esa región se logró determinar a las tres cepas como *A. niger* con un nivel de identidad entre el 97% al 100%. En estudios similares en los que se evalúa la producción de ácido cítrico, se ha usado la región ITS como un marcador para la identificación de cepas de *Aspergillus niger* (Martinez et al, 2014).

8.3. Análisis consumo de sacarosa

Se evaluó tres concentraciones diferentes de sacarosa (100, 150, 200 g/L) en la producción de ácido cítrico en fermentación batch con cuatro cepas de *Aspergillus niger* y una cepa de *Trichoderma harzianum*. La concentración de sacarosa se monitoreo por 144 h en intervalos de 24 h. De esta manera se pudo determinar que la fase exponencial se dio en las primeras 24 h, con una disminución máxima de la concentración de sacarosa (Anexo 4) en relación al tiempo. No fue posible determinar las fases de adaptación ni muerte debido al intervalo de tiempo en las que se tomaron las muestras. Para poder identificar estas fases sería necesario un monitoreo en intervalos de tiempo más cortos.

El consumo de sacarosa se calculó restando la concentración inicial menos la concentración a las 144 h y se buscó diferencias estadísticas por medio de la prueba de Tukey al 5% de comparación de medias. Con esta prueba se formaron siete grupos (a, b, c, d, e, f, g).

Cuando se comparan estos grupos, se puede ver que el grupo g formado por la cepa D y *T. harzianum* con 200 g Sacarosa / L, son las que tienen el consumo de sacarosa más alto, con valores de 118,88 g/L y 148,33 g/L, respectivamente. El resto de grupos formados por otras cepas y otras concentraciones no tienen una separación clara, por lo que no se puede ver una tendencia cuando se compara entre cepa o entre concentraciones, por lo que se determina que el consumo de sacarosa fue similar entre las cepas evaluadas.

Cuando se analiza el consumo de sacarosa en el control abiótico, se puede ver un rango de variación, inclusive encontrando valores negativos entre las réplicas. Esta variación está relacionada con la metodología utilizada para determinar la concentración de sacarosa. La metodología de espectrofotometría utilizada puede tener como limitaciones el uso de una curva estándar y los errores experimentales asociados al procesamiento de la muestra. La curva de calibración que se obtuvo para este estudio presentó un coeficiente R^2 de 0,9956 cercano a 1, lo que indica que existe una alta correlación entre las absorbancias medidas y las concentraciones estándares. En otros estudios en los que se usa espectrofotometría se recomienda que el coeficiente R^2 sea superior a 0,99 por lo que el valor obtenido se encuentra dentro de los valores recomendados (Clifford et al, 2014).

El error experimental, se puede producir al momento de realizar las diluciones de las muestras para mediarlas. Esto se debe a que la curva de calibración se la realizó con un rango de 0 a 200 mg / L , mientras que las muestras tenían un valor inicial de 200.000 mg/L por lo que es necesario realizar una dilución de 10^{-3} del medio de fermentación, de esta manera es necesario diluir la muestra para determinar su concentración dentro del rango de la curva de calibración.

En base a los resultados obtenidos se determina que existe un mayor consumo de sacarosa en una concentración de 200 g/L en relación a las concentraciones de 100 y 150 g/L.

Adicionalmente, las cepas A, B, C y *Trichoderma harzianum* presentan un mayor consumo en relación a la cepa D. Adicionalmente, se puede determinar que en el control abiótico (blanco) no se dio consumo de sacarosa y que los valores encontrados son productos de la variabilidad intrínseca del método utilizado.

El consumo de sacarosa depende directamente de la actividad metabólica de las células de *A. niger*, y se relaciona con la actividad de α - y γ -amilasa que hidroliza los polisacáridos; por lo que diferentes variantes de estas dos enzimas van a tender a una mayor o menor actividad, sin embargo, en este estudio se usó como fuente de carbono a un disacárido por lo que la actividad de estas enzimas no es un factor limitante. Otra enzima que tiene una actividad importante es la invertasa extracelular (Alekseev, Dubina, & Komov, 2015). Esta enzima se produce en un 77% dentro de *A. niger* y cataliza la hidrólisis de sacarosa en fructosa y glucosa, la cual va a ser degradada en el proceso de glucólisis que dará lugar al ciclo de Krebs. El mecanismo propuesto para la activación de la invertasa se debe a receptores de membrana que reconocen la sacarosa y da lugar a una amplificación de señales por monofosfato de adenina cíclico (cAMP) en el núcleo celular y empieza la síntesis de mRNA. Posteriormente se da su traducción en el ribosoma y su excreción mediante el retículo endoplasmático, aparato de Golgi y vesículas de membrana (Veana et al, 2011). De esta manera se puede explicar que el rápido consumo de la sacarosa es debido a la enzima invertasa ya que la enzima α - y γ -amilasa no es un factor limitante.

8.4. Análisis de producción neta de ácido cítrico

La evaluación de la producción de ácido cítrico se lo realizó en función de tres concentraciones diferentes de sacarosa (100, 150 y 200 g/L) para las tres cepas aisladas de *A. niger* (A, B, C), una cepa de *A. niger* ATCC 6275 (Cepa D) como control positivo y una cepa de *Trichoderma harzianum* como control negativo. Se realizó medidas de la concentración de ácido cítrico cada 24 h durante 144 h, cuando se obtiene la máxima producción.

Para los análisis estadísticos se tomó el valor a las 144 h y se usó la prueba de Tukey al 5% para comparación de medias, con lo que se formaron en ocho grupos (a, b, c, d, e, f, g, h). En donde la cepa D presenta una mayor producción neta de ácido cítrico en todas las concentraciones de sacarosa en relación a las demás cepas. La máxima producción neta obtenida con la cepa D fue de 3,5 g/L con una concentración inicial de 200 g Sacarosa/L. La máxima producción alcanzada por parte de todas las cepas analizadas es a una concentración de sacarosa de 200 g/L. Sin embargo, bajo el análisis estadístico solo las cepas: A y C presentan una diferencia significativa de producción neta de ácido cítrico a una concentración de 200 g Sacarosa/L ya que producen 2,5 g/L; en comparación con las concentraciones de 100 y 150 g Sacarosa/L, que producen 1,5 g/L. Por otro lado, en el caso de las cepas B y D la producción de ácido cítrico no es muy significativo comparando las tres concentraciones de sacarosa ya que su producción no varía en un amplio rango. La cepa B produce una concentración de ácido cítrico de 2,3 g/L, 1,96 g/L y 2,5 g/L en una concentración de 100, 150 y 200 g Sacarosa / L respectivamente, mientras que la cepa D produce una concentración de ácido cítrico de 3,2 g/L, 3,2 g/L y 3,5 g/L en una concentración de 100, 150 y 200 g Sacarosa / L. respectivamente. De esta manera se demuestra que la producción de ácido cítrico no está determinada principalmente por la concentración de sacarosa inicial, sino más bien por el tipo de cepa con la cual se está trabajando. Estos resultados concuerdan con otros estudios que evalúan la producción de ácido cítrico bajo diferentes condiciones de cultivo, en donde establecen que la síntesis de ácido cítrico depende de la cepa, condiciones de incubación y medio de cultivo (Abín et al, 2004).

Adicionalmente, los tratamientos de la cepa de *Trichoderma harzianum* en todas las concentraciones evaluadas de sacarosa presenta una menor producción en relación a la cepa D. Sin embargo, comparando la producción de ácido cítrico en todas las concentraciones de sacarosa de la cepa de *Trichoderma harzianum* con las cepas A, B, C en una concentración de 100 y 150 g Sacarosa / L no existe una diferencia significativa.

En el caso del tratamiento abiótico se espera una producción nula de ácido cítrico. Sin embargo, en la Figura 8 se presenta una producción de ácido cítrico en todas las concentraciones de sacarosa. Esto puede ser explicado debido a errores experimentales en la técnica de titulación. Esto es debido a que el medio de fermentación inicia en un pH 4, en donde se encuentran grupos H^+ titulables que al ser multiplicado por el factor de conversión para ácido cítrico va a dar un valor sin que esté presente. Adicionalmente, debido a errores experimentales se puede exceder el volumen de NaOH necesario para alcanzar el punto de equivalencia obteniendo así una medición menos exacta (Riaño, 2007). Para alcanzar una mayor exactitud en la metodología de titulación se recomienda determinar el punto de viraje en función a una medición de pH por medio del potenciómetro, siendo así una medida más exacta en relación al cambio colorimétrico. Adicionalmente la determinación de la concentración de ácido cítrico resulta ser más precisa utilizando la técnica de cromatografía en capa líquida (Liaud et al, 2014 (Show et al, 2015).

En base a los resultados presentados, la producción de ácido cítrico no es dependiente de la concentración de sacarosa, sino más bien por el tipo de cepa. En base a esto, se puede analizar dos puntos de vista: la concentración obtenida por parte de cepas nativas anteriormente reportadas y el número de cepas de evaluadas. Para el caso de la concentración obtenida por parte de cepas nativas, la concentración que se obtuvo en el presente estudio es mayor a algunas anteriormente reportadas ya que se obtuvo un rango de producción de 1,5 a 3,5 g ácido cítrico / L. En el caso de Bhattacharjee y Baruah (2015) presenta un rango de producción de 3×10^{-4} a $3,9 \times 10^{-3}$ g de ácido cítrico / L, así mismo en el caso de Saéz, Flóres, y Cadavid (2002) presenta un rango de producción de 0,017 – 1,11 g ácido cítrico / L. Por otro lado, en el presente estudio se analizó la producción de ácido cítrico solamente en cuatro cepas de *A. niger* y se obtuvo un rango de producción de 1,5 a 3,5 g/L mientras que en el estudio reportado por Iqbal, et al. (2015) se analiza 129 cepas de *A. niger* y obtienen un rango de producción de 1 a 14,17 g/L. De esta manera es necesario considerar el número de cepas de *A. niger* evaluadas ya que si se obtiene un mayor número de cepas a evaluar existe una mayor probabilidad de encontrar una cepa que presenten una alta producción de ácido cítrico. A pesar de esto, se obtuvo un rango de producción mayor a los rangos reportados por distintos autores.

8.5. Análisis de rendimiento efectivo de producción

Para realizar una mejor comparación entre los diferentes tratamientos se realizó el cálculo del rendimiento para las 144 h dividiendo la concentración de ácido cítrico para el consumo de sacarosa. Para los análisis estadísticos se tomó el valor de rendimiento calculado a las 144 h y se usó la prueba de Tukey al 5% para comparación de medias, con lo que se formaron en seis grupos (a, b, c, d, e, f). En donde se encontró que el mayor rendimiento fue de las cepas B y D, siendo así 0,043 y 0,045 g ácido cítrico / g sacarosa consumida, respectivamente. De esta manera, se determina que la cepa aislada B presenta un rendimiento similar al control positivo, siendo así que es útil analizarla para otros estudios. Adicionalmente, a través de una comparación global entre las concentraciones de sacarosa se encontró que el rendimiento es superior en cada tratamiento de las cepas evaluadas en una concentración de 100 g Sacarosa / L y que con el aumento de la concentración de sacarosa este rendimiento disminuye notablemente. Este es un indicador importante para la industria debido a que relaciona el consumo de la materia prima que se obtiene en función de la producción del componente de interés, este es un dato más informativo en procesos de escalado. Cabe recalcar que el proceso de producción de ácido cítrico no es totalmente entendido en la actualidad, es por ello que es necesario más investigación sobre el metabolismo microbiano y su interacción con otros factores (Alekseev, Dubina, & Komov, 2015). Sin embargo, con los resultados obtenidos se puede establecer una nueva investigación en donde se evalúe una menor concentración de sacarosa y establecer si existe un mejor rendimiento de producción de ácido cítrico.

9. CONCLUSIONES

- Se logró aislar 3 cepas de *Aspergillus niger* en medio PDA a partir de muestras de los sustratos orgánicos de compost, galletas y semillas de albahaca.
- Se logró aislar ADN genómico con el Kit PowerSoil – DNA Isolation (Mo Bio Laboratories, USA) obteniendo concentraciones de 8,3 a 11,6 ng/ul y con una relación 260/280 de 2,5 siendo óptimo para análisis moleculares.
- Se amplificó la región parcial 18 S - ITS 1 – 5.8 S rRNA – ITS 2 – Parcial 28 S mediante PCR y se logró secuenciar esta región de los aislados determinando que las tres cepas aisladas son de *Aspergillus niger*.
- La mayor producción de ácido cítrico se obtuvo a una concentración de 200 g/L en comparación de 100 y 150 g/L en todos los aislados de *Aspergillus niger*.
- La mayor producción neta de ácido cítrico fue por parte de la cepa D con una concentración de 3,5 g/L.
- Las mayores productividades efectivas del proceso de producción de ácido cítrico fue por parte de la cepa D y B, con un valor de 0,045 y 0,043 gramos de ácido cítrico por cada gramos de sacarosa consumida, en una concentración de sacarosa de 100 g/l.
- Se selecciona la cepa D y B para futuras investigaciones de producción de ácido cítrico.

10. RECOMENDACIONES

- Realizar análisis filogenéticos para saber las diferencias entre cepas aisladas en el Ecuador y el resto del mundo.
- Obtener más aislado de *Aspergillus niger* a partir de residuos orgánicos (suelo).
- Evaluar la producción de ácido cítrico de los nuevos aislados y las cepas analizadas en un rango concentración de sacarosa menor a 100 g/l.
- Evaluar el efecto de metanol y componentes nutritivos del medio de cultivo en la producción de ácido cítrico.
- Evaluar la producción de ácido cítrico en un medio de cultivo complejo, como la melaza de caña de azúcar.
- Generar un diseño experimental para determinar interacción entre factores de nutrición y aislados.

11. Bibliografía

- Abarca, M. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*, 79 - 84.
- Abín, L., Coto, O., Marreno, B., & Marreno, J. (2004). Estudio fisiológico de la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* O-5. *CENIC Ciencias Biológicas*, 15 - 18.
- Acourene, S., & Ammouche, A. (2012). Optimization of ethanol, citric acid, and α -amylase production from date wastes by strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* and *Candida guilliermondii*. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology*, 759 - 766.
- Alekseev, K. V., Dubina, M. V., & Komov, V. P. (2015). Metabolic Characteristics of Citric Acid Synthesis by the Fungus *Aspergillus niger*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 857 - 865.
- Bakhiet, S., & Mokhtar, E. (2015). Production of Citric Acid by *Aspergillus niger* Using Sugarcane Molasses as Substrate. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 211 - 215.
- Bhattacharjee, I., & Baruah, P. (2015). Isolation and Screening of Citric Acid Producing *Aspergillus* Spp and Optimisation of Citric Acid Production by *Aspergillus niger* S-6. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 19-23.
- Ciriminna, R., Meneguzzo, F., Delesi, R., & Pagliaro, M. (2017). Citric acid: emerging applications of key biotechnology industrial product. *Chemistry Central Journal*, 11-22.
- Clifford, R., Head, J., Kinyanjui, J., & Talbott, M. (2014). Quantification of natural sugar in baby food products by MID FTIR Spectroscopy. *Shimadzu*.
- Dhillon, G. S., Brar, S. K., Verma, M., & Tyagi, R. D. (2011). Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, 83 - 92.

Dubois , M., Gilles , K., Hamilton, J., Rebers, P., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 350 - 356.

Encyclopedia of Life. (11 de Abril de 2017). Obtenido de

http://eol.org/pages/2920814/hierarchy_entries/57316970/overview

Gómez, A. L., Sánchez, M., Muñoz , E., & Valencia , I. (2014). Efecto del fósforo y del potasio en la producción de ácido cítrico utilizando una cepa de *Aspergillus niger*. *Acta Agronómica*, 222 - 228 .

Hermosa, M., Grondona, I., Iturriaga, E., Díaz , J., Castro, C., Monte E, & García, I.

(2000). Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of

Trichoderma spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 1890 - 1898.

Iqbal, J., Haq, I., Javed, M., Hameed, U., Khan , A., Parveen, N., & Khan, T. (2015).

Isolation of *Aspergillus niger* Strains from Soil and their Screening and Optimization for Enhanced Citric Acid Production Using Cane Molasses as Carbon Source. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 128-137.

Liaud, N., Giniés, C., Navarro, D., Fabre, N., Crapart, S., Herpoel, I., . . . Sigoillot, J.

(2014). Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi. *Fungal biology and Biotechnology*, 1- 10.

Martinez, L., Chalfoun, S., Silva de Abreu, P., Carvalho, S., Neves, M., & Teixeira, A.

(2014). Citric acid production and citrate synthase genes in strains of *Aspergillus niger*.

African Journal of Biotechnology, 2220-2226.

Mehyar, G., Delaimy , K., & Ibrahim, S. (2005). Citric acid production by *Aspergillus*

niger using based medium fortified with whey and additives. *Food Technology*, 137 - 144.

Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2013). *Microbiología Médica*. Barcelona:

Elsevier.

- Riaño, C. (2007). Fundamentos de química analítica básica. Análisis cuantitativo. Manizales: Universidad de Caldas.
- Rohit, K., Sudipta, K., Purushtham, B., & Kumara, M. (2013). Isolation, production and characterization of extracellular pectinase from *Aspergillus niger* K3. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 667- 675 .
- Saéz, A., Flóres, L., & Cadavid, A. (2002). Caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus niger* y evaluación de la producción de ácido cítrico. *Universidad EAFIT* , 33 - 43.
- Samson, R. A., Noonim , P., Meijer, M., Houbraken , J., Frisvad , J. C., & Varga, J. (2007). Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology*, 129 - 145.
- Samson, R. A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., & Vargas, J. (2007). Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Study in Mycology*, 129 - 145 .
- Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J., Levesque, A., . . . Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a univesal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 6241 - 6246.
- Show, P. L., Oladele, K. O., Siew, Q. Y., Aziz, S. A., Lan, J. C.-W., & Ling, T. C. (2015). Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. *Frontiers in Life Science*, 271-283.
- Socool, C., Vandenberghe, L., Rodrigues, C., & Pandey, A. (2006). New Perspectives for Citric Acid Production and Application. *Food Technology and Biotechnology*, 141-149.
- Torres, N. (1994). Modeling approach to control of carbohydrate metabolism during citric acid accumulation by *Aspergillus niger*, II. *Biotechnology Bioengineering*, 112-118.

Travis, H., Iwen, P., & Hinrichs, S. (2000). Identification of *Aspergillus* Species Using Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology*, 1510 - 1515.

Tuquerres, H., Carrera, A., Piedra, A., Tenemaza, V., Cazco, G., Bravo, L., . . . Torres, R. (2015). Isolation of native *Aspergillus niger* from Ecuadorian Amazon to produce citric acid from sugarcane bagasse. *Mol2Net*, 1-5.

Turenne, C., Sanche, S., Hoban, D., Karlowsky, J., & Kabani, A. (1999). Rapid Identification of Fungi by Using the ITS2 Genetic Region and an Automated Fluorescent Capillary Electrophoresis System. *Journal of Clinical Microbiology*, 1846 - 1851.

Veana, F., Aguilar, C., Viader, J., & Rodriguez, R. (2011). Invertasa del género *Aspergillus* y su impacto biotecnológico. *Biotecnología*, 11 - 29.

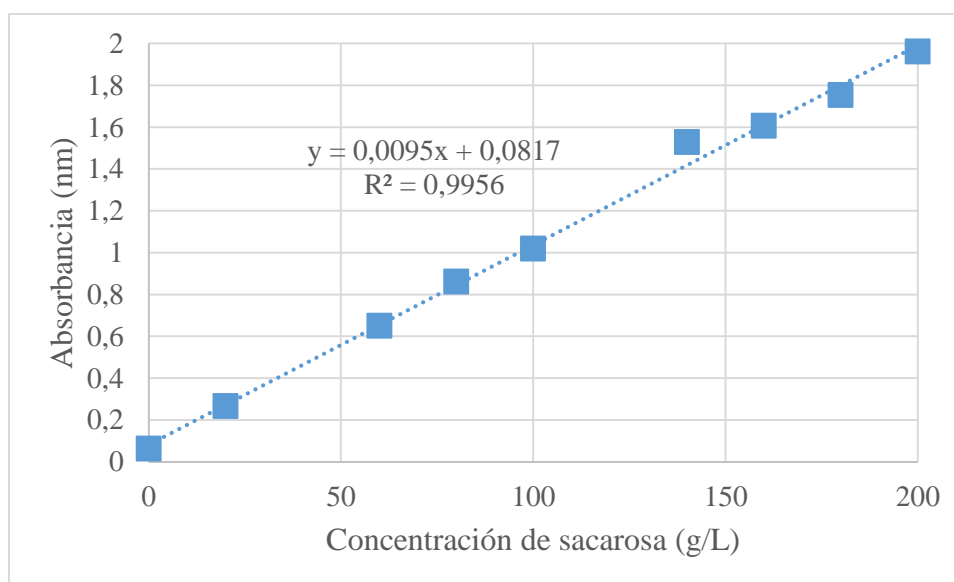
12. ANEXOS

Anexo 1. Secuencias en formato FASTA de la región ITS 1 – ITS 4 de las cepas de *Aspergillus niger* analizadas

Cepa	ITS 1
A	<p>ACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAC ATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGC TGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCCGGGG GGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGT ATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGT TTTCCA</p>
B	<p>GATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAC TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACAT TGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTG CCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCCGGGGGA CGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATG GGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTT CCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCCGCTG AACTTAAGCATATCTAAGGCCGGAAGAAAATTTCCAAGAGCGGGTCCC TTGGGCCACC</p>

C	<p>AACTGGATTGCATTCAATCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGT GTTTCGTGTTGGGGTCTCCGGCGGGCACGGGCCCGGGGGGCAAAGG CGCCCCCGGGCGGCCGACAAGCGGGCGGGCCCCCAAGCAACAG GGTACAATAGACACGGATGGGAAGTTGGGCCCCAAGGACCC</p>
D	<p>ATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAT TGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTC CGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGATCC TCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCG CCTGCCGACGTTTTCCAACCATTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAG GTAGGGATAACCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGGCGGAAGAA TCATTACTAAGTGCGGGTACCTTGGGCCCAACCTCCCGGCCATGTC TATAAAACCCTGTTGCTACGGCGGGCCC</p>

Anexo 2. Curva de calibración para la medición de sacarosa



Anexo 3. Análisis de varianza para el consumo de sacarosa por parte de las cepas evaluadas

ANOVA

Consumo de sacarosa (g/L)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	107429,259	17	6319,368	100,772	,000
Dentro de grupos	2257,546	36	62,710		
Total	109686,805	53			

Anexo 4. Prueba de Tukey 5% para el consumo de sacarosa por parte de las cepas evaluadas

Consumo de sacarosa (g/L)

HSD Tukey^a

Código	N	Subconjunto para alfa = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
Blanco 150	3	2,8433						
Blanco 200	3	9,0533						
Blanco 100	3	9,5167						
A100	3		47,9500					
T.harzianum 100	3		48,1267					
C100	3		55,0033					
B100	3		57,2067					
D150	3		69,3333	69,3333				
D100	3		71,5667	71,5667				
B150	3			82,6100	82,6100			
A150	3			89,5300	89,5300			
T. harzianum 150	3			92,7133	92,7133			
C150	3				97,1100	97,1100		
D200	3					118,8800	118,8800	
A200	3						133,3800	133,3800
B200	3						133,6933	133,6933
C200	3							143,7567
T. harzianum 200	3							148,3367
Sig.		1,000	,063	,069	,715	,121	,684	,669

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Anexo 5. Curvas de crecimientos de las cepas evaluadas

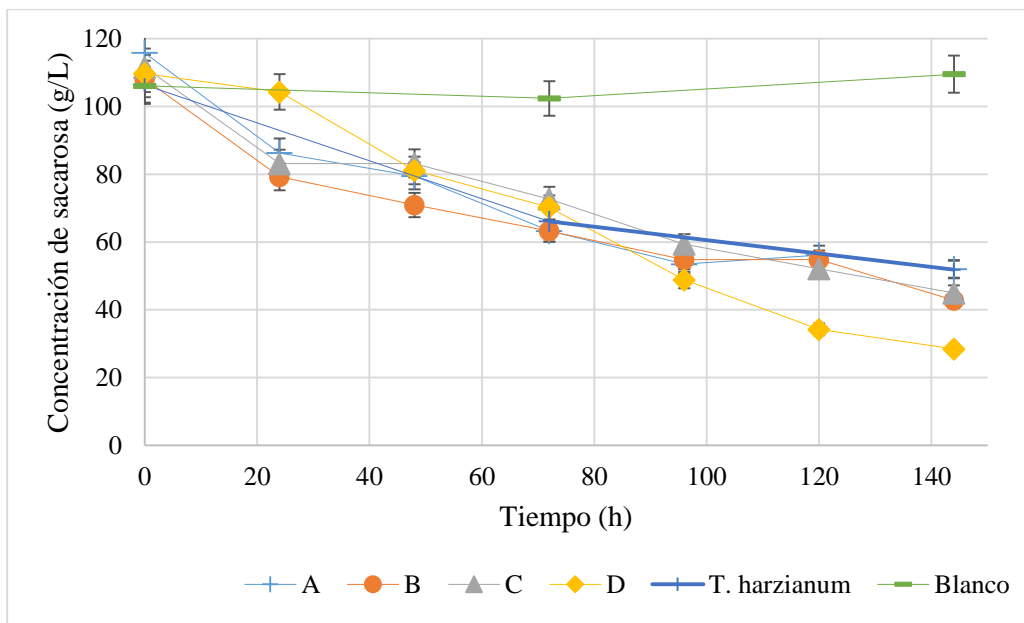


Figura 5. Consumo de sacarosa por parte de las cepas evaluadas en una concentración inicial de 100 gSacarosa/L

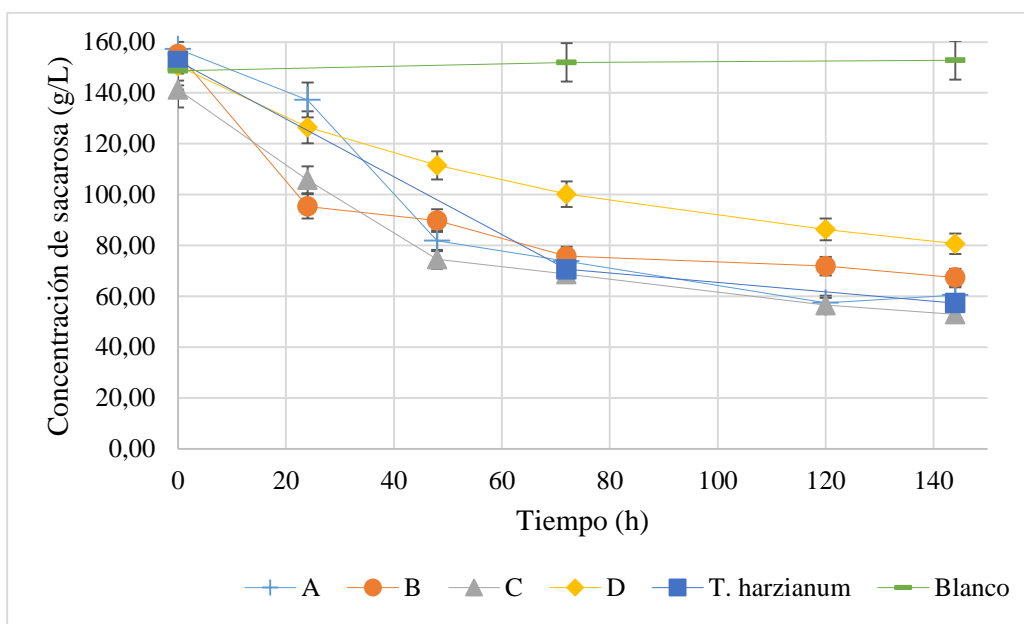


Figura 6. Consumo de sacarosa por parte de las cepas evaluadas en una concentración inicial de 150 gSacarosa/L

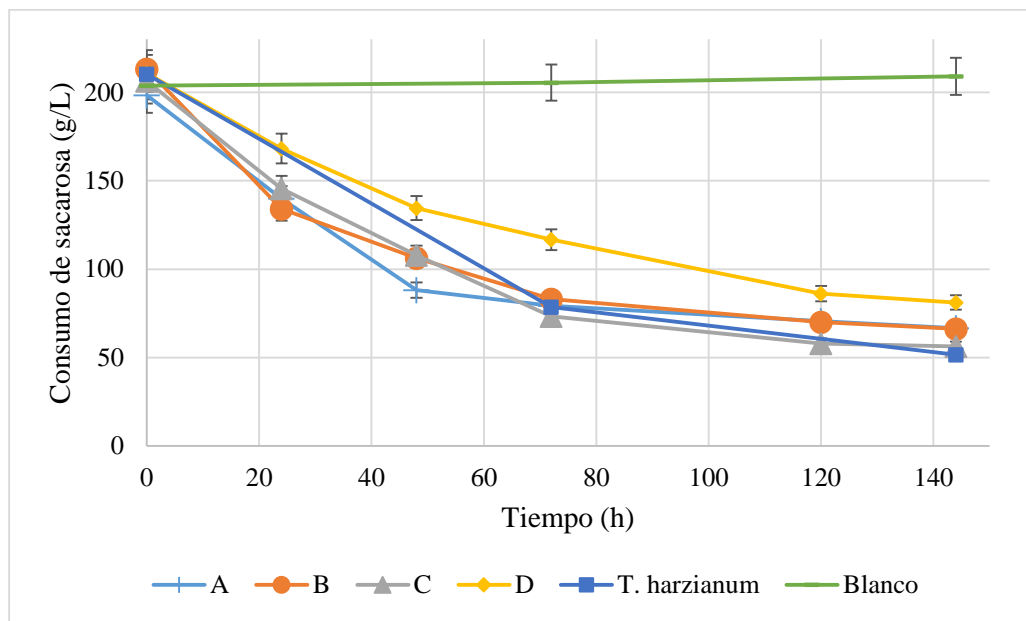


Figura 7. Consumo de sacarosa por parte de las cepas evaluadas en una concentración inicial de 200gSacarosa/L

Anexo 6. Análisis de varianza para la producción de ácido cítrico a partir de las cepas evaluadas

ANOVA

Concentración de ácido cítrico (g/L)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	39,057	17	2,297	34,971	,000
Dentro de grupos	2,365	36	,066		
Total	41,422	53			

Anexo 7. Prueba de Tukey 5% para la producción de ácido cítrico por parte de las cepas evaluadas

Concentración de ácido cítrico (g/L)

HSD Tukey^a

Código	N	Subconjunto para alfa = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Blanco 100	3	,6400							
Blanco 200	3	,8533	,8533						
Blanco 150	3	1,0667	1,0667	1,0667					
T.harzianum 100	3	1,2800	1,2800	1,2800	1,2800				
A100	3		1,4667	1,4667	1,4667				
C100	3		1,4667	1,4667	1,4667				
A150	3		1,4933	1,4933	1,4933				
C150	3		1,4933	1,4933	1,4933				
T. harzianum 150	3		1,5133	1,5133	1,5133				
T. harzianum 200	3			1,7467	1,7467	1,7467			
B150	3				1,9200	1,9200	1,9200		
B100	3					2,3000	2,3000		
A200	3						2,5600	2,5600	
B200	3						2,5600	2,5600	
C200	3						2,5600	2,5600	
D150	3							3,2000	3,2000
D100	3								3,4133
D200	3								3,6267
Sig.		,226	,188	,155	,226	,450	,226	,226	,831

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Anexo 8. Curvas de producción neta de ácido cítrico de las cepas evaluadas

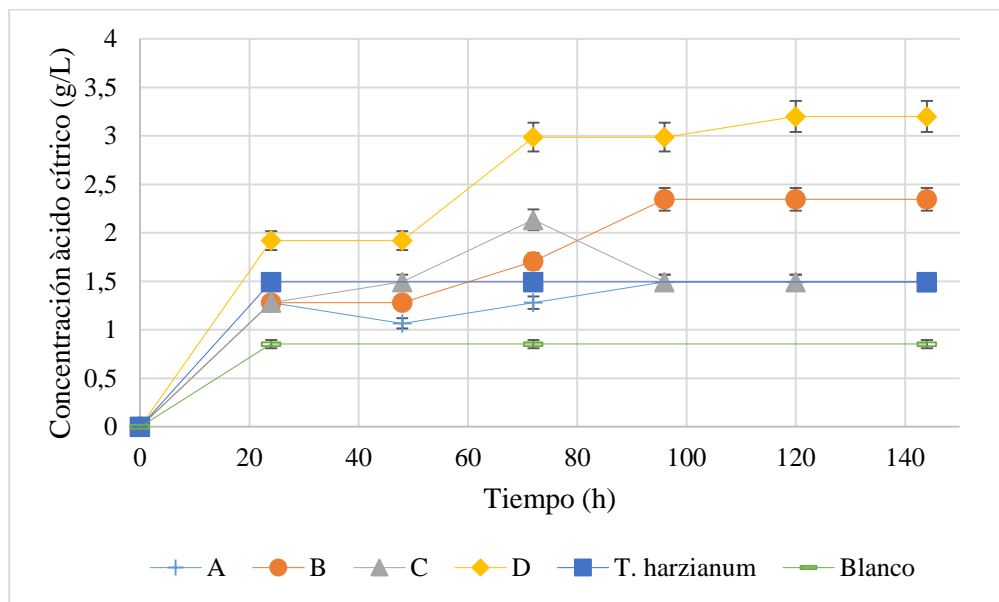


Figura 8. Producción neta de ácido cítrico por parte de las cepas evaluadas en una concentración de 100 g/L de sacarosa

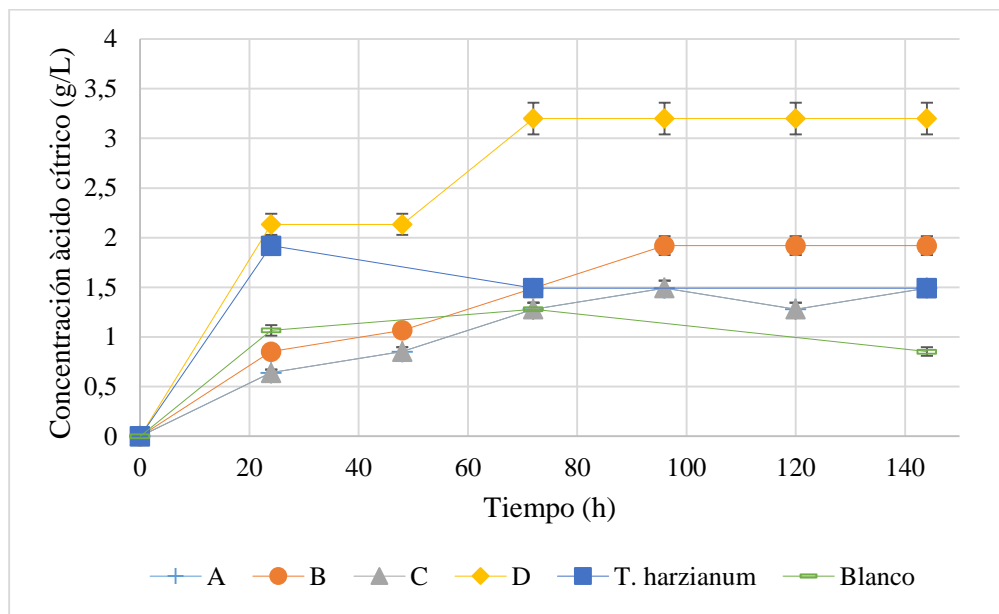


Figura 9. Producción neta de ácido cítrico por parte de las cepas evaluadas en una concentración de 150 g/L de sacarosa

Anexo 9. Análisis de varianza del rendimiento de producción de ácido cítrico a partir de las cepas evaluadas

ANOVA

Rendimiento (gAC/gSC)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,006	14	,000	19,329	,000
Dentro de grupos	,001	30	,000		
Total	,007	44			

Anexo 10. Prueba de Tukey 5% del rendimiento de producción de ácido cítrico a partir de las cepas evaluadas

Rendimiento (gAC/gSC)

HSD Tukey^a

Código	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
T. harzianum 200	3	,0100					
C150	3	,0133	,0133				
T. harzianum 150	3	,0133	,0133				
A150	3	,0167	,0167	,0167			
A200	3	,0200	,0200	,0200	,0200		
B200	3	,0200	,0200	,0200	,0200		
C200	3	,0200	,0200	,0200	,0200		
B150	3	,0233	,0233	,0233	,0233		
C100	3		,0267	,0267	,0267		
T.harzianum 100	3		,0267	,0267	,0267		
D200	3			,0300	,0300	,0300	
A100	3				,0333	,0333	,0333
B100	3					,0433	,0433
D100	3						,0467
D150	3						,0467
Sig.		,082	,082	,082	,082	,082	,082

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Anexo 11. Producción de ácido cítrico reportada en la literatura

Autor	Producción de ácido cítrico (g/l)	Fuente de Carbono	Número de cepas de <i>A. niger</i>	Tipo de fermentación
(Bhattacharjee & Baruah, 2015)	3E-4 – 3,9E-3 g/L	Sacarosa	8	Sumergida
(Saéz et al, 2002)	0,017 - 1,11 g/L	Sacarosa	1	Sumergida
Presente estudio	1,5 – 3,5 g/L	Sacarosa	4	Sumergida
(Iqbal et al, 2015)	1 – 14,17 g/L	Melaza de caña de azúcar	129	Sumergida