



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA
QUÍMICA**

Maestría en Ciencias en Ingeniería Química

**Valorización de residuos de la industria de confitería
para la producción de poliácido málico (PMA).**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
QUE PRESENTA:**

I.A. Doriscelda Ponce Amador

Director de tesis:

Dr. Mario Moscosa Santillán

Co-director de tesis:

M.C. Rosa Elena Delgado Portales

Sinodales:

Dr. Mario Moscosa Santillán

M.C. Rosa Elena Delgado Portales

Dr. Raúl González García



SAN LUIS POTOSÍ, JULIO 2020

El Programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 000896.



Valorización de residuos de la industria de confitería para la producción de poliácido málico (PMA). by Doriscelda Ponce Amador is licensed under a [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

-Lo que realmente embellece al desierto es el pozo que se oculta en algún sitio.

El principito. Antoine de Saint-Exupéry

DEDICATORIA

A Dios que me mantuvo en su mano y me puso en el camino a las personas correctas, que me probó y me permitió reconocer mis debilidades y lo que mi vida es gracias a Él.

Para Pedro y Daniel, que cuando pensaba en darme por vencida su recuerdo me devolvía la fortaleza de seguir adelante, en donde quiera que esten, siempre los llevo en mi corazón.

Doriscelda Ponce Amador

Mi principal agradecimiento es a Dios, por brindarme todos los medios y materiales para lograr este objetivo, así como la fortaleza para creer en su palabra y en mi misma.

A mis padres por apoyarme en mi decisión, confiar en mí y ofrecerme lo que está a su alcance para facilitarme el camino. Son mi mayor fuente de inspiración, y siempre les estaré agradecida por su amor, porque gracias a ustedes soy lo que soy.

A mis hermanos; Dora, por ser ejemplo y mi apoyo lejos de casa, porque aunque a veces ha sido difícil, siempre estuvo ahí cuando más la necesité y sé que sin ella no habría sido igual. Y Luis Francisco, porque lo que hago espero sea un ejemplo para ti y te motive a superarte.

A Gabriel, mi compañero de aventura, por ser mi apoyo incondicional en este proceso, sin duda esta experiencia no hubiera sido la misma sin ti, gracias por compartir tu tiempo, los éxitos y frustraciones del camino, ser mi ejemplo y motivación.

Un agradecimiento especial a Canel's, por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de posgrado, y la oportunidad de desarrollarme profesionalmente fuera de sus instalaciones. Al Ingeniero José de Jesús García Zermeño por la confianza otorgada para desarrollar mis actividades laborales a la par de una maestría de tiempo completo y a mis compañeros del área técnica, por el apoyo brindado cuando requería ausentarme de mi puesto de trabajo, la realización de algunas técnicas experimentales requeridas en este trabajo y el ánimo brindado para su culminación.

A Nayeli Mendoza, mi mano derecha en el laboratorio, espero que puedas alcanzar tus metas y que lo realizado en estos meses haya sido de gran aprendizaje.

A Liliana Ramírez por compartir sus conocimientos y experiencia dentro del laboratorio, a las chicas de servicio social y a todos en el laboratorio de Microbiología en Alimentos por su apoyo brindado.

A la familia Maldonado Soto, por abrirme las puertas de su hogar y brindarme su confianza, apoyo y cariño. Mi eterna gratitud.

A mis amigos IA´s por los ánimos brindados, y no dudar de mí aún cuando yo lo hacía, mi agradecimiento infinito por su apoyo incondicional y su amistad.

A mis amigas de danza, por entender mi ausencia y motivarme a seguir mis metas.

A mis compañeros del posgrado por los momentos dentro y fuera de las aulas que me permitieron sentir parte del grupo y me motivaron para mantener un buen desempeño.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al Posgrado de Ciencias en Ingeniería Química y su planta de docentes por las facilidades otorgadas para permitirme realizar mis estudios de posgrado con la flexibilidad que mis actividades laborales me permitieron.

Al Dr. Mario Moscosa Santillán y la M.C. Rosa Elena Delgado, por el apoyo brindado y las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

A la I.A. Alejandra Loredo Becerra por el apoyo brindado en la capacitación en técnicas de análisis microbiológico utilizadas en el proyecto.

Al Dr. Marco Martín González Chávez por el apoyo para el uso de equipos necesarios para este trabajo de investigación.

RESUMEN

Los residuos de confitería son ricos en azúcares fermentables, con potencial para la bioconversión y obtención de productos con alto valor agregado, como los ácidos orgánicos.

La bioproducción del polímero de ácido málico ha tomado relevancia en los últimos años, a partir del cual es posible obtener ácido málico, cuyo uso como acidulante es amplio en la industria de los alimentos.

Mediante la utilización de una cepa de *Aureobasidium pullulans* actuando sobre un medio modelo, se obtuvieron rendimientos en el rango de 0.2-0.4 g_{PMA}/g_{Sustrato} al evaluar la relación glucosa-sacarosa del medio, y el contenido de citrato y malato de sodio en un diseño experimental factorial. Al escalar el experimento a nivel piloto y utilizando jarabes a base de residuos de confitería en un reactor tipo batch el rendimiento fue de 0.81 g_{PMA}/g_{Sustrato}.

Los datos experimentales obtenidos a nivel piloto de crecimiento microbiano, producción del polímero y producción de biomasa se ajustaron al modelo de Gompertz, con valores de R² superiores a 0.97

La utilización de residuos de confitería presenta la ventaja de no requerir pre tratamientos, además de brindar una opción para la disminución de costos por almacenamiento, transporte y tratamiento de estos productos.

Palabras Clave: Poliácido málico, ácido málico, *Aureobasidium pullulans*, confitería, fermentación.

ABSTRACT

Confectionery waste is rich in fermentable sugars, with the potential for bioconversion and obtaining products with high added value, such as organic acids.

The bioproduction of the malic acid polymer has become relevant in recent years, in order to produce malic acid, this acid is highly used as an acidulant on food industry.

Through the use of a strain of *Aureobasidium pullulans* acting on a model environment, yields between 0.2-0.4 g_{PMA} / g_{Substrate} were obtained by evaluating the glucose-sucrose ratio of the environment and the content of citrate and sodium malate on a factorial experimental design. After the experiments were scaled up to a pilot level and using syrups based on confectionery waste in a batch reactor, the yield obtained was 0.81 g_{PMA} / g_{Substrate}.

The experimental data obtained for microbial growth, polymer production and biomass production at the pilot level were adjusted to the Gompertz model, with R² values higher than 0.97

The use of confectionery waste has the advantage of not requiring pre-treatments, also offers an option to reduce costs of storage, transportation and treatment of these products.

Key Words: Poly acid malic, malic acid, *Aureobasidium pullulans*, Confectionery, Fermentation

CONTENIDO

RESUMEN.....	viii
INDICE DE TABLAS.....	xiii
INDICE DE FIGURAS.....	xv
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xviii
INTRODUCCIÓN.....	1
1. ANTECEDENTES.....	5
1.1. LA INDUSTRIA DE LA CONFITERIA	5
1.1.1. Principales materias primas utilizadas en confitería.....	6
Edulcorantes.....	6
Grasas vegetales.....	7
Aditivos	8
1.1.2. Los acidulantes usados en alimentos	8
1.2. ÁCIDO MÁLICO	10
1.2.1. Producción industrial del ácido málico	11
1.2.2. Métodos alternativos de producción	14
1.2.3. Obtención de poliácido málico (PMA).....	16
1.2.4. <i>Aureobasidium spp</i>	17
1.3. MODELADO MATEMÁTICO	20
1.3.1. Curva de crecimiento microbiano.....	21
1.3.2. Modelos de crecimiento microbiano.....	22
1.3.2.1. Modelos primarios de crecimiento microbiano	23
1.3.3. Cinéticas de producción de metabolito y biomasa	24
2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	26
3. OBJETIVOS	28
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	28
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	29
4.1. ESTANDARIZACIÓN A NIVEL LABORATORIO.....	29
4.1.1. Caracterización fisicoquímica del medio prueba	29
Azúcares reductores totales (AR) y azúcares totales (AT)	33

Porcentaje de sólidos solubles (°Brix)	34
pH	34
Densidad	35
4.1.2. Selección de la cepa.....	35
4.1.2.1. Fermentación.....	35
4.1.2.2. Seguimiento de la fermentación.....	37
Cuenta Total para Mohos (CT)	37
Biomasa (DCW).....	38
Concentración de polímero por gravimetría (PMA)	38
4.1.3. Estudio del proceso de fermentación en el medio modelo.	39
4.1.3.1. Diseño de experimentos	40
4.1.3.2. Selección de los rangos de las variables	41
4.1.4. Estudio del proceso de fermentación en el medio prueba.....	43
4.1.4.1. Aplicación del modelo de rendimiento.....	43
4.1.4.2. Validación contra datos experimentales.....	43
4.2. EXPERIMENTO DE VALIDACIÓN A NIVEL PILOTO.....	44
4.2.1. Descripción del sistema.....	45
4.2.2. Parámetros de operación.....	48
4.2.3. Seguimiento de la fermentación.....	49
4.3. MODELADO MATEMÁTICO	49
4.3.1. Cinéticas de crecimiento microbiano	50
4.3.1.1. Ecuación Logística.....	50
4.3.1.2. Función de Gompertz.	51
4.3.1.3. Modelo de Baranyi y Roberts.....	52
4.3.2. Cinéticas de producción de PMA	54
4.3.2.1. Función de Gompertz	54
4.3.2.2. Ecuación de Özilgen.....	55
4.3.2.3. Ecuación de Peleg.....	55
4.3.3. Cinética de producción de biomasa	56
4.3.4. Validación de modelos cinéticos	56
Error cuadrado medio de regresión (MSE).....	56

Coeficiente de determinación (R^2)	57
Coeficiente de determinación ajustado (R^2_{adj})	57
5. RESULTADOS	59
5.1. ESTANDARIZACIÓN A NIVEL LABORATORIO.....	59
5.1.1. Caracterización fisicoquímica del medio de fermentación.....	59
5.1.2. Selección de la cepa.....	61
Morfología y descripción del crecimiento	61
Seguimiento de la fermentación.....	63
5.1.3. Estudio del proceso de fermentación en el medio modelo	69
Análisis Estadístico y modelo para rendimiento	69
Curvas de crecimiento	74
5.1.4. Estudio del proceso de fermentación en el medio prueba.....	78
Rendimiento teórico.....	78
Rendimiento experimental	79
Selección del jarabe para prueba piloto	82
5.2. EXPERIMENTO DE VALIDACIÓN A NIVEL PILOTO.....	84
5.2.1. Seguimiento de la fermentación.....	84
5.2.2. Rendimiento obtenido.....	87
5.3. MODELADO MATEMÁTICO	88
5.3.1. Cinética de crecimiento microbiano	88
5.3.2. Cinéticas de producción de PMA.....	93
5.3.3. Cinética de producción de biomasa	96
5.3.4. Acoplamiento de cinéticas	97
CONCLUSIONES.....	99
REFERENCIAS	101

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Clasificación de los principales carbohidratos encontrados en alimentos	7
Tabla 1.2 Propiedades de algunos acidulantes utilizados en alimentos.	9
Tabla 1.3 Taxonomía de <i>Aureobasidium spp.</i>	17
Tabla 4.1 Composición de las diferentes materias primas utilizadas en el proceso de recuperación de merma de dulce.	30
Tabla 4.2 Especificaciones de los jarabes obtenidos del proceso de recuperación.	32
Tabla 4.3 Composición teórica de los diferentes jarabes obtenidos del proceso de recuperación.	39
Tabla 4.4 Composición teórica para medios de fermentación a base de jarabes de recuperación.	41
Tabla 4.5 Nomenclatura y límites para las variables a evaluar en el diseño de experimentos.	42
Tabla 4.6 Diseño experimental codificado para el estudio del rendimiento de la fermentación en el medio modelo.	42
Tabla 4.7 Composición del medio de fermentación utilizado para el experimento a nivel piloto	48
Tabla 5.1 Valor promedio de los parámetros fisicoquímicos evaluados en cada jarabe obtenidos del proceso de recuperación.	59
Tabla 5.2 Composición de los jarabes obtenidos del proceso de recuperación en base a los parámetros experimentales promedio.	60
Tabla 5.3 Composición teórica de los medios de cultivo para la fermentación en medio prueba.	61
Tabla 5.4 Morfología y descripción del crecimiento de las dos cepas utilizadas en la fermentación.	62
Tabla 5.5 Resultados de los experimentos correspondientes al DOE para Rendimiento de la fermentación en el medio modelo	69
Tabla 5.6 Resultados del ANOVA correspondiente al análisis del DOE para Rendimiento de la fermentación por <i>A. pullulans</i> .	70
Tabla 5.7 Coeficientes de la ecuación del comportamiento para el rendimiento de la fermentación en el medio modelo.	71
Tabla 5.8 Valores codificados para cada variable estudiada de los medios de fermentación a base de jarabe obtenido del proceso de recuperación.	78

Tabla 5.9 Valores codificados todas las variables introducidas al modelo del rendimiento de la fermentación.	79
Tabla 5.10 Composición teórica de los jarabes utilizados para la preparación de medios de fermentación a nivel laboratorio.	80
Tabla 5.11 Composición teórica de los medios de fermentación utilizados para prueba a nivel laboratorio.	80
Tabla 5.12 Rendimiento promedio de la fermentación respecto al PMA obtenido.	81
Tabla 5.13 Cantidad de merma producida y recuperada mensual por tipo de dulce.	84
Tabla 5.14 Perfil de carbohidratos típico de un jarabe de glucosa utilizado en confitería.	85
Tabla 5.15 Ajuste de los datos experimentales de crecimiento microbiano de <i>A. pullulans</i> en reactor tipo batch a los modelos Logístico, Gompertz y Baranyi & Roberts.	89
Tabla 5.16 Parámetros estadísticos del ajuste de datos experimentales a los modelos Logístico, Gompertz y Baranyi & Roberts para crecimiento microbiano de <i>A. pullulans</i> en reactor tipo batch.	91
Tabla 5.17 Parámetros estadísticos del ajuste de datos experimentales a los modelos Gompertz, Özilgen y Peleg para producción de PMA por <i>A. pullulans</i> en reactor tipo batch.	95
Tabla 5.18 Ajuste de los datos experimentales de producción de PMA por <i>A. pullulans</i> en reactor tipo batch al modelo de Gompertz.	95
Tabla 5.19 Parámetros estadísticos del ajuste de datos experimentales al modelo de Gompertz para la producción de biomasa de <i>A. pullulans</i> en reactor tipo batch.	97

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Valor total de producción en la elaboración de dulces, chicles y productos de confitería distintos al chocolate (millones de pesos corrientes).	5
Figura 1.2 Ácidos orgánicos más comunes utilizados en alimentos.	8
Figura 1.3 Producción de ácido DL-málico a partir de fuentes fósiles.	12
Figura 1.4 Ruta metabólica para la síntesis de los ácidos succínico, fumárico y málico.	14
Figura 1.5 Los tres diferentes isómeros de poliácido málico.	17
Figura 1.6 Rutas propuestas para la biosíntesis de PMA en <i>A. pullulans</i> , tomado de Wei <i>et al</i> , 2018.	19
Figura 1.7 Curva de crecimiento microbiano típico para una población bajo condiciones ambientales constantes.	21
Figura 4.1 Diagrama de bloques del proceso de transformación de la Merma de Dulce.	30
Figura 4.2 Componentes principales del sistema utilizado para la fermentación a nivel piloto.	46
Figura 4.3 Diagrama del sistema global utilizado para la fermentación a nivel piloto.	47
Figura 5.1a y 5.1b. Cultivos de <i>Aureobasidium melanogenum</i> (a) y <i>Aureobasidium pullulans</i> (b) en Agar Papa Dextrosa por 10 días a 25 °C, seguido de 2 días en refrigeración (4 - 7°C).	62
Figura 5.2a y 5.2b. Cultivos de <i>Aureobasidium pullulans</i> en Agar Papa Dextrosa, (a) después de 5 días a 25 °C, (b) después de 10 días a 25 °C y 2 días en refrigeración (4 - 7°C).	63
Figura 5.3 Evolución de pH del medio de Fermentación utilizando las dos cepas de <i>Aureobasidium</i> evaluadas.	64
Figura 5.4 Consumo de sustrato durante la fermentación por <i>Aureobasidium melanogenum</i> en un medio de sacarosa.	65
Figura 5.5 Consumo de sustrato durante la fermentación por <i>Aureobasidium pullulans</i> en un medio de sacarosa.	65
Figura 5.6 Curva de crecimiento microbiano para <i>Aureobasidium melanogenum</i> en medio de sacarosa a 30-35 °C.	66
Figura 5.7 Curva de crecimiento microbiano para <i>Aureobasidium pullulans</i> en medio de sacarosa a 25-28 °C.	67

Figura 5.8 Generación de Biomasa y poliácido málico en la fermentación de sacarosa por <i>Aureobasidium melanogenum</i> .	68
Figura 5.9 Generación de Biomasa y poliácido málico en la fermentación de sacarosa por <i>Aureobasidium pullulans</i> .	68
Figura 5.10 Efecto de los factores analizados para el modelo del rendimiento de la fermentación por <i>A.pullulans</i> en el medio modelo.	72
Figura 5.11 Efecto de la concentración de citrato de sodio y dextrosa sobre el rendimiento de la fermentación en el medio modelo.	73
Figura 5.12 Comparación del rendimiento experimental y teórico para la obtención de PMA por <i>A. pullulans</i> .	73
Figura 5.13 Comparativo de las curvas de crecimiento obtenidas del DOE para el rendimiento de la fermentación en el medio modelo.	74
Figura 5.14 Evolución del crecimiento microbiano respecto a la concentración microbiana inicial para los medios sin concentración de malato y citrato de sodio.	75
Figura 5.15 Evolución del crecimiento microbiano respecto a la concentración microbiana inicial para los medios 120 g/L dextrosa.	77
Figura 5.16 Evolución del crecimiento microbiano respecto a la concentración microbiana inicial para los medios 120 g/L sacarosa.	78
Figura 5.17 Rendimiento obtenido mediante el uso del modelo obtenido del DOE para rendimiento de la fermentación en el medio modelo.	79
Figura 5.18 Desviación de los valores promedio de los rendimientos de la fermentación respecto a la producción de PMA obtenidos experimentalmente.	82
Figuras 5.19a y 5.19b. Consumo de Azúcares totales, evolución de Sólidos Soluble Totales (°Brix) y Azúcares Reductores para la fermentación a nivel laboratorio.	83
Figura 5.20 Evolución de sustrato, PMA y biomasa durante la fermentación con <i>Aureobasidium pullulans</i> en reactor tipo batch.	85
Figura 5.21 Evolución de los componentes del sustrato en el medio de fermentación a base de jarabes de recuperación por acción de <i>A. pullulans</i> en reactor tipo batch.	86
Figura 5.22 Evolución de la cuenta microbiana (MYL) contra la producción de biomasa (DCW) en el medio de fermentación a base de jarabes de recuperación por <i>A. pullulans</i> en reactor tipo batch.	87
Figura 5.23 Comparación de la cuenta microbiana teórica y experimental para <i>A. pullulans</i> empleando el modelo Logístico.	90

Figura 5.24 Comparación de la cuenta microbiana teórica y experimental para <i>A. pullulans</i> empleando el modelo Gompertz.	90
Figura 5.25 Comparación de la cuenta microbiana teórica y experimental para <i>A. pullulans</i> empleando el modelo Baranyi y Roberts.	91
Figura 5.26 Curvas de crecimiento microbiano para <i>A. pullulans</i> en reactor tipo batch, datos experimentales y ajustados a los modelos Logístico, Gompertz y Baranyi & Roberts.	92
Figura 5.27 Comparación de cinéticas de producción de PMA por <i>A. pullulans</i> teórico y experimental empleando el modelo Gompertz.	93
Figura 5.28 Comparación de cinéticas de producción de PMA por <i>A. pullulans</i> teórico y experimental empleando el modelo Özilgen.	94
Figura 5.29 Comparación de cinéticas de producción de PMA por <i>A. pullulans</i> teórico y experimental empleando el modelo Peleg.	94
Figura 5.30 Cinética de producción de PMA por <i>A. pullulans</i> en reactor tipo batch, datos experimentales y ajustados a los modelos Gompertz, Özilgen y Peleg.	96
Figura 5.31 Ajuste de datos experimentales de producción de biomasa de <i>A. pullulans</i> en reactor tipo batch al modelo de Gompertz.	97
Figura 5.32 Cinéticas obtenidas con el ajuste de datos experimentales de la fermentación para la producción de PMA por <i>A. pullulans</i> en reactor tipo batch.	98

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Abreviaturas

°Brix	Grados Brix
APD	Agar papa dextrosa
AR	Azúcares reductores totales
AT	Azúcares totales
CC	Tipo de dulce caramelo macizo CC
DCW	Biomasa por peso seco celular
DE	Dextrosa equivalente
FDA	Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos
GNA	Gauss-Newton
GRG	Generalizado de gradiente reducido
JR	Tipo de dulce caramelo macizo JR
LM	Levenberg-Marquardt
MFAm	Medio de fermentación para <i>Aureobasidium melanogenum</i>
MFAp	Medio de fermentación para <i>Aureobasidium pullulans</i>
N	Tipo de dulce caramelo suave N
PMA	Poli(β)ácido málico
RPM	Revoluciones por minuto
SCAm	Inóculo inicial para <i>Aureobasidium melanogenum</i>
SCAp	Inóculo inicial para <i>Aureobasidium pullulans</i>
TCA	Ciclo de los ácidos tricarbóxicos
vvm	Volumen de aireación por volumen de medio de fermentación

Símbología

<i>a</i>	Volumen de la solución de la muestra
<i>A</i>	Parámetro aproximadamente igual a y_0
AR	Azúcares reductores totales
AT	Azúcares totales
<i>b</i>	Factor de Fehling
<i>B</i>	Velocidad de crecimiento relativo
<i>c</i>	Volumen gastado
<i>C</i>	Recuentos microbianos
<i>C(t)</i>	Concentración al tiempo t
<i>C(t)_{exp}</i>	Concentración experimental

$C(t)_{teoG}$	Concentración teórica ajustada al modelo de Gompertz
$C(t)_{teoO}$	Concentración teórica ajustada al modelo de Ozilgen
$C(t)_{teoP}$	Concentración teórica ajustada al modelo de Peleg
C_0	Concentración inicial
C_{max}	Concentración máxima
CT	Cuenta total de Mohos
d	Peso de la muestra
DCW	Concentración de peso seco celular
DCW_f	Cantidad de biomasa final
DE	Dextrosa equivalente
DEI	Porcentaje de dextrosa equivalente de la muestra invertida
DF	Grados de libertad
e	Peso de la muestra
F	Parámetro de distribución de Fisher
f_i	Datos calculados con el modelo
k_i	Constantes del modelo
K_p	Constante de Michaelis-Menten
m	Masa de la muestra
M	Tiempo para alcanzar tasa de crecimiento máxima
m_i	Masa de concentración i
MS	Mínimo cuadrado
MST	Error cuadrado medio total
MSE	Error cuadrado medio de regresión
MYL	Cuenta microbiana
n	Número total de variables
$N(t)$	Tamaño de la población microbiana
Ne	Número total de experimentos
n_i	Parámetros del modelo
n_t	Número total de datos
o	Número de datos
o_i	Numero de datos de la muestra
p	Número de variables independientes del modelo
P	Probabilidad
$P(t)$	Parámetro del modelo de Baranyi y Roberts
pC	Número de puntos centrales
PMA	Poliácido málico
PMA_f	Cantidad de poli(β)ácido málico final

<i>R</i>	Rendimiento
<i>R</i>²	Coefficiente de determinación
<i>R</i>^{2adj}	Coefficiente de determinación ajustado
<i>R</i>_{b/s}	Rendimiento de la biomasa
<i>R</i>_{p/s}	Rendimiento del producto
<i>SD</i>	Desviación estándar
<i>SE</i>	Error Estándar
<i>SS</i>	Suma de cuadrados
<i>SST</i>_c	Sólidos solubles totales consumidos
<i>SST</i>_f	Sólidos solubles totales finales
<i>SST</i>_m	Máximo de sólidos solubles totales
\hat{S}_i^2	Varianza de la muestra para prueba t
<i>t</i>	Tiempo
<i>t</i>[*]	Valor t de la distribución t-student
<i>V</i>	Volumen de la muestra
<i>V</i>_i	Volumen de concentración i
<i>V</i>_m	Volumen de la muestra (DCW)
<i>W</i>_f	Peso final (DCW)
<i>W</i>_i	Peso inicial (DCW)
<i>x</i>	Variable real
<i>X</i>	Densidad microbiana
<i>x</i>[*]	Variable transformada por escalamiento
<i>X</i>_m	Densidad microbiana máxima
\bar{X}_i	Valor promedio de la muestra
<i>y(t)</i>	Logaritmo natural de la densidad microbiana al tiempo t
<i>y</i>₀	Logaritmo natural de la densidad microbiana inicial
<i>y</i>_{exp}	Valores experimentales de crecimiento microbiano
<i>y</i>_i	Datos experimentales obtenidos
<i>y</i>_{max}	Logaritmo natural de la densidad microbiana máxima
<i>y</i>_{teob}	Valores teóricos ajustados al modelo de Baranyi-Roberts
<i>y</i>_{teog}	Valores teóricos ajustados al modelo de Gompertz
<i>y</i>_{teol}	Valores teóricos ajustados al modelo logístico
$\alpha(t)$	Tasa de crecimiento en la fase de latencia
β	Parámetro
$\gamma(t)$	Tasa de crecimiento en la fase estacionaria

λ	Tiempo de latencia
μ	Tasa de crecimiento específica
μ	Tasa de crecimiento específica máxima
μ_{\max}	Tasa de crecimiento exponencial
ρ	Densidad
σ^2	Varianza

INTRODUCCIÓN

La confitería es un área de la tecnología de alimentos referida a aquellos productos cuyo componente principal y básico es un edulcorante, principalmente azúcar. Los productos de confitería datan desde hace 3000 años en Egipto, y su evolución y diversificación se encuentra ligada al desarrollo de la industria del azúcar (Bedolla, 2004).

Dentro de las materias primas utilizadas para la elaboración de estos productos se encuentran los ácidos orgánicos. Entre los compuestos que entran en esta categoría destacan los ácidos: acético, adípico, benzoico, cítrico, fumárico, láctico, propiónico, tartárico y málico.

La finalidad de la adición de estos compuestos en los alimentos es principalmente reducir el pH, sin embargo, cumplen con otras funciones como: amortiguadores de pH, conservadores, saborizantes, promotor de reacciones, secuestradores de iones, inhibidor de reacciones, etc. (Badui, 2006).

En confitería su uso principal es acidular, es decir otorgar sabor ácido a los productos, que conlleva a mejorar o redondear las notas frutales y como efectos secundarios reduce el pH, en muchos casos contribuyendo al aumento de vida de anaquel.

Aunque muchos de estos ácidos se encuentran presentes de manera natural en diferentes vegetales, su uso extendido en la industria demanda altos volúmenes que solo son satisfechos mediante su producción química a gran escala.

En este trabajo de investigación se aborda el caso específico del ácido málico que, en conjunto con los ácidos cítrico, láctico y fumárico, corresponde a los ácidos orgánicos de mayor uso en confitería. El ácido málico en particular presenta la ventaja de otorgar un sabor ácido suave que se retiene en las papilas gustativas durante más tiempo que otros ácidos, permitiendo alcanzar las notas deseadas sin la adición de

grandes cantidades. Esto permite entre otras cosas, valores de acidez menores, que en el caso particular de confitería permiten retardar la inversión de la sacarosa.

Actualmente, la producción habitual de este compuesto es a partir de ácido fumárico, mediante una transformación enzimática o por hidratación de este y/o del ácido maleico a altas temperaturas y presiones, ambos derivados del anhídrido maleico. A su vez el anhídrido maleico se puede producir ya sea por oxidación selectiva de n-butano o por oxidación selectiva de benceno, ambos derivados directos de hidrocarburos.

Debido a las materias primas requeridas para su obtención, la producción de ácido málico conlleva altos costos en consumo de energía y medioambientales al requerir derivados de petróleo en su elaboración. La búsqueda de procesos libres de petroquímicos ha generado la investigación sobre otros mecanismos de obtención.

Directamente, este ácido orgánico puede ser obtenido mediante biocatálisis y/o fermentación. La conversión del ácido fumárico en ácido málico es catalizada por la enzima fumarasa y su producción mediante fermentación conlleva una ruta metabólica común al ácido succínico y fumárico (Presecki, 2005).

A partir de ácido fumárico, presenta la desventaja que este compuesto comparte la ruta química a partir de petroquímicos. En el caso de la bioproducción se han seguido dos estrategias principales: la utilización de microorganismos hiperproductores y la creación de nuevas cepas productoras mediante el empleo de técnicas de ingeniería metabólica (Werpy, 2004).

Sin embargo, la obtención directa del ácido mediante fermentación requiere mejoras importantes en la tolerancia a los ácidos de los microorganismos, lo que sigue representando un reto importante para su obtención por esta vía (Cao, 2011). A la fecha, no se ha desarrollado un proceso de fermentación para producción industrial de este ácido.

En años recientes, la bioproducción del polímero de ácido málico ha tomado relevancia, al no contar con la desventaja de inhibir el crecimiento de la biomasa y ser por si solo un compuesto con un campo de aplicación prometedor.

El poli β -L-ácido málico, es un polímero conformado por repetitivas unidades de L-malil, que son ligadas mediante enlaces de éster entre un grupo carboxilo y un grupo hidroxilo, los cuales forman una molécula adyacente de ácido L-málico (Li, 2015). Es un biopolímero natural con características sobresalientes de biocompatibilidad, biodegradabilidad, solubilidad en agua, y no-inmunogenicidad, además de ser fácilmente modificable químicamente y disponible como materia prima sustentable. También cuenta con aplicaciones en la producción de detergentes, plásticos biodegradables u otros biomateriales (Liu, 1997), además que como producto de su hidrólisis se obtiene ácido L-málico (Chi, 2016a).

Los mayores productores de PMA son cepas de *Aureobasidium spp.* aisladas de diferentes ambientes. Altas concentraciones (40-124 g/L), rendimiento (0.3-0.87 g/g) y productividad (0.3-1.22 g/Lh) de PMA, pueden ser producidos por este microorganismo mediante fermentación, utilizando glucosa como sustrato (Cao, 2012; 2014; Chi, 2016b; Ma, 2013; Wang, 2015; Zhang, 2011; Zou, 2013), y con la finalidad de utilizar sustratos de bajo costo se han realizado estudios a partir de desperdicio de papa (Zan, 2013), molasa de soya (Cheng, 2016), olote (Zou, 2015; 2016) y paja de trigo (Manichotpisit, 2013). Sin embargo, todos ellos tienen que pasar por un proceso previo, enzimático y térmico para obtener los azúcares fermentables, lo cual añade costo al proceso y la posible generación de químicos perjudiciales inhibiendo el crecimiento del microorganismo (Zhang, 2016).

Por lo que la búsqueda de materias primas que no impliquen procesos previos ha tomado relevancia, algunos pioneros en este tema son Wei (2016) con el uso de jugo de caña de azúcar, además de Zeng (2018,2019) y colaboradores que han obtenido buenos resultados utilizando jarabe de malta. Además de los residuos de industrias

primarias, es interesante analizar los residuos de otras industrias de transformación como materia prima potencial para estos procesos.

La industria de la confitería representa un área de oportunidad importante, al generar residuos ricos en azúcares fermentables, resultado de producto terminado fuera de especificación.

La empresa con quien en conjunto se elaboró este trabajo de investigación se dedica a la elaboración de productos de confitería, y como parte de su actual proceso productivo, existen diversos factores que pueden afectar la calidad del producto disminuyéndola al grado de no poder ser destinado al consumidor final.

Siempre y cuando no represente un riesgo de inocuidad, y con la finalidad de reducir costos por desperdicio, el producto que no cumple con las especificaciones de calidad (textura, sabor, color, etc.), al cual se le denominará merma, es destinado a un proceso de recuperación.

Dicho proceso tiene como objetivo recuperar el contenido de azúcares presente en la merma, obteniéndose un jarabe rico en azúcares, que formara parte del contenido inicial de sólidos en las primeras etapas de la producción principal.

Debido a especificaciones de calidad del producto final, no es posible recuperar toda la merma producida, por lo que en la búsqueda de diversificar el aprovechamiento de estos residuos se ha planteado la producción de poliácido málico a través de fermentación de los jarabes obtenidos en el proceso de recuperación.

1. ANTECEDENTES

1.1. LA INDUSTRIA DE LA CONFITERIA

Debido a su estructura, los productos de confitería se pueden agrupar en dos categorías: cristalinos y no cristalinos, entre los primeros se encuentran los chocolates, cremas, mazapán, tabletas de azúcar comprimida, nougats, fudge; los productos no cristalinos o amorfos corresponden a productos como los caramelos, chiclosos, gelatinas, gomas y paletas (Bedolla, 2004).

En México, la industria de la confitería se segmenta en dos áreas principales; golosinas o dulces de azúcar y chocolate. La primera, a su vez, se divide en: caramelo duro, caramelo suave, comprimidos, paletas, gomitas, confitados, goma de mascar, entre otros (Legiscomex, 2009)

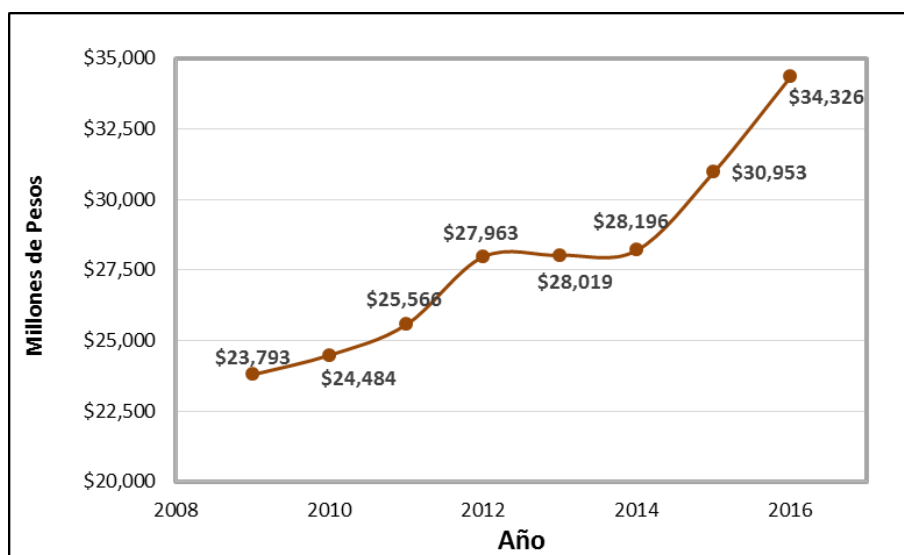


Figura 1.1 Valor total de producción en la elaboración de dulces, chicles y productos de confitería distintos al chocolate (millones de pesos corrientes). Fuente: INEGI.

Haciendo un especial enfoque en la elaboración de golosinas o dulces de azúcar, en la Figura 1.1, se puede apreciar la evolución del valor de este segmento de la industria alimentaria a través del tiempo a nivel nacional, pudiendo observar un comportamiento constante hasta 2012 (INEGI), cuando comienza la depreciación de

la moneda nacional y se realizan reformas importantes para la venta de productos con altos contenidos calóricos (Morales, 2016). Sin embargo, en la misma figura se observa la recuperación del comportamiento creciente después del año 2014.

1.1.1. Principales materias primas utilizadas en confitería

La elaboración de los productos de confitería se basa en la preparación de jarabes concentrados de azúcar, los que posteriormente son sometidos a cocción lenta, sostenida y cuidadosa, que los convierte en una masa que adquiere la textura característica del tipo de dulce deseado (Bedolla, 2004).

Las principales materias primas utilizadas son:

- Edulcorantes: azúcar (sacarosa), jarabes de maíz (glucosa), azúcar invertido, miel, almidón y melazas.
- Sólidos de leche
- Grasas
- Aditivos, como potenciadores de sabor, antioxidantes, gelificantes, saborizantes y colorantes, acidulantes
- Otros

Edulcorantes

La industria de la confitería se ha desarrollado alrededor de las propiedades de su principal ingrediente: la sacarosa, un disacárido no reductor, cuyos monosacáridos constituyentes son la glucosa (dextrosa) y la fructosa, ambos reductores (Edwards, 2000).

Se utiliza este ingrediente en varias formas, que varían en tamaño de partícula según las necesidades del producto a elaborar. Este puede ser granulado (azúcar molido en estado cristalino), azúcar glass y jarabes de sacarosa, generalmente al 66% p/v (Edwards, 2000).

Otra fuente importante de sólidos y azúcares, que representan la segunda materia prima utilizada en los productos de confitería, son los jarabes de glucosa. También conocidos como jarabes de maíz, debido a que en su mayoría derivan de la hidrólisis ácida del almidón obtenido por molienda húmeda de este grano. (Badui, 2006).

No obstante su nombre, el principal componente no es la glucosa, sino la maltosa y su especificación está en términos de “dextrosa equivalente”, abreviado como DE (Badui, 2006), la cual representa una medida del grado de hidrólisis de la molécula de almidón y el contenido de azúcares reductores directos, expresado como un porcentaje en base seca (Badui, 2006). El jarabe de glucosa más común utilizado en confitería tiene un valor de DE de 42 o cercano (Edwards, 2000).

Los productos de confitería pueden contener distintos tipos de carbohidratos, los cuales se clasifican de acuerdo a la Tabla 1.1. El almidón del cual derivan los jarabes de glucosa, está conformado por polisacáridos cuya unidad fundamental son moléculas de glucosa, como resultado de su hidrólisis estos jarabes contienen tanto el monosacárido como oligosacáridos de 2 hasta n unidades de glucosa y maltodextrinas.

Tabla 1.1 Clasificación de los principales carbohidratos encontrados en alimentos,

Monosacáridos	Oligosacáridos	
	Disacáridos	Polisacáridos
Glucosa	Maltosa	Almidón
Fructosa	Sacarosa	Glucógeno
Galactosa	Lactosa	Celulosa

Grasas vegetales

Su uso en confitería tiene la finalidad de sustituir otras grasas, como la grasa butírica. Contribuyen a brindar textura, y en general, al resto de las propiedades sensoriales, por lo que se utilizan en pequeñas proporciones para no transmitir sabores indeseables a los productos (Edwards, 2000; Badui, 2006).

Las grasas vegetales más utilizadas en confitería son de palma, algodón, coco y soya, según el uso estos pueden ser o no hidrogenados (Badui, 2006).

Aditivos

Según la FDA (Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos), un aditivo es un material que se añade de manera intencionada, generalmente en pequeñas cantidades, a otra sustancia para mejorar su apariencia, sabor, color o estabilidad (Edwards, 2000).

En la elaboración de productos de confitería, se pueden encontrar una cantidad importante de estas sustancias. Dentro de los más importantes se encuentran los saborizantes, colorantes, acidulantes, estabilizantes, amortiguadores de pH, entre otros (Edwards, 2000).

1.1.2. Los acidulantes usados en alimentos

En general, además de reducir el pH, cumplen con otras funciones como: amortiguadores de pH, conservadores, saborizantes, promotor de reacciones, sequestradores de iones, inhibidor de reacciones, etc. (Badui, 2006). En los productos de confitería, su uso se enfoca en brindar sabor ácido al producto, además, tienen como efecto secundario la disminución del pH que, en conjunto con otros factores, otorga una vida de anaquel prolongada a los dulces y golosinas (Edwards, 2000).

Entre los compuestos que entran en esta categoría destacan los ácidos orgánicos: acético, adípico, benzoico, cítrico, fumárico, láctico, propiónico, tartárico y málico. Algunos de estos se representan en la Figura 1.2 (Badui, 2006).

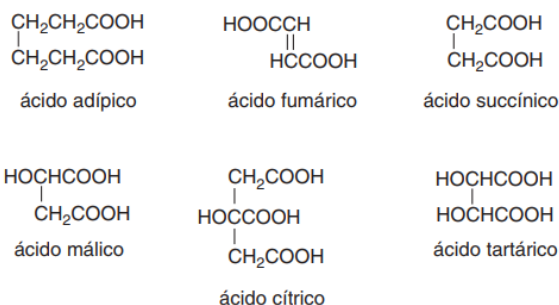


Figura 1.2 Ácidos orgánicos más comunes utilizados en alimentos.

Con excepción del fumárico, la mayoría de ellos son solubles en agua. De hecho, la selección para su uso está dada por su solubilidad, así como la compatibilidad con otros ingredientes, el costo, el sabor, etc. En la Tabla 1.2 se presentan algunas de las propiedades fisicoquímicas de los ácidos con mayor uso en alimentos (García, 2005).

Tabla 1.2 Propiedades de algunos acidulantes utilizados en alimentos.

Ácido	Málico	Fumárico	Cítrico	Tartárico
Sabor	ácido suave	ácido	ácido	ácido amargo
Punto de fusión °C	130	286	153	168
Densidad relativa de soluciones saturadas a 25°C	1.25	1	1.28	1.27
Solubilidad en agua a 25°C (g/100 ml H ₂ O)	60	<5	60	138
Calor de solución kcal/mol a 25°C	4.9	-	3.9	3.3
Viscosidad de soluciones acuosas a 25°C (centipoises)	6.5	-	6.5	6.5

Fuente: Johnson, A. & Peterson M., Encyclopedia of Food Technology, 1974.

El uso de compuestos acidulantes en la conservación y mejora de propiedades organolépticas en alimentos es extenso. Estas sustancias, denominadas genéricamente ácidos orgánicos, son intermediarios o productos terminales de ciclos metabólicos básicos, que ocurren en gran variedad de organismos vivos (García, 2005).

Cada ácido utilizado en la industria de alimentos cuenta con ventajas o desventajas en su aplicación de acuerdo al producto donde se aplique, en la industria de la confitería los ácidos más utilizados son cítrico, málico, láctico y fumárico. Siendo el uso de ácido cítrico más extenso debido a su disponibilidad y reducido costo, no obstante el ácido málico confiere un sabor ácido suave a los productos, el cual se retiene en las papilas gustativas durante más tiempo que el ácido cítrico. Esto promueve un aumento

en la duración del sabor, sin embargo la limitante del costo hacia el producto final puede tener un peso importante al momento de seleccionarlo.

1.2. ÁCIDO MÁLICO

El ácido málico, es un compuesto orgánico ópticamente activo. Es decir, presenta enantiómeros o isómeros ópticos, que son dos imágenes especulares de la molécula o dos estructuras espaciales no superponibles. Las moléculas quirales tienen la propiedad de desviar (rotar) el plano de luz polarizada un cierto ángulo. Si rota la luz hacia la derecha se le denomina dextrógiro (D) o (+) y si lo desvía hacia la izquierda se le llama levógiro (L) o (-). La importancia de estos compuestos radica en que los isómeros pueden presentar diferentes interacciones moleculares afectando así su actividad biológica y/o química.

Para el caso del ácido málico, es solo el isómero óptico de la serie (L) producido naturalmente en un ciclo de reacciones bioquímicas, trascendentales para el metabolismo de animales y plantas, conocido con el nombre de ciclo del ácido cítrico, o ciclo de Krebs (CORDIS, 2005), sin embargo por síntesis química no es posible obtener un solo isómero, por lo que siempre se obtendrán mezclas (DL), conocidas como racémicas, que no producen desvío de la luz polarizada.

El mercado global de ácido málico ha sido valuado en 159 millones de dólares en 2016 (Grand View Research, 2018), el cual va en aumento debido a sus diversas aplicaciones. Su uso más extendido es como acidulante en bebidas carbonatadas y no carbonatadas, mejorando el perfil de sabor acercándolo más al natural y otorga estabilidad al pH. El éxito en estas aplicaciones se le atribuye entre otras razones, a que logra enmascarar resabios desagradables de edulcorantes artificiales y algunas sales, y se le atribuye sinergia con algunos edulcorantes artificiales. Cerca del 52% del consumo global de DL-ácido málico es destinado a estos productos (IHS, 2016).

También es utilizado en sidras y vinos para mantener un sabor consistente y en confitería debido a su alta solubilidad, sabor ácido suave y bajo punto de fusión

(Thirumalai Chemicals, 2017). Adicionalmente se le han encontrado otros usos en cosmética y farmacia, a partir de él se pueden obtener diversos derivados, comunes a los producidos a partir de ácido succínico y fumárico, tales como 1,4-butanodiol, tetrahidrofurano, butirolactona y pirrolidinonas. Sus propiedades quirales son de especial interés en la obtención de derivados ópticamente activos. Una aplicación de creciente importancia es su uso como monómero en la síntesis de poliésteres, tal como el poliácido málico y sus derivados. (Polynt S.p.A., 2016)

Los cristales de ácido málico en solución acuosa son blancos, mientras que sus cristales anhidros son traslucidos, no higroscópicos (en condiciones normales) y no volátiles, con un punto de fusión de 130°C. Su primera constante de disociación ($K_1=4 \times 10^{-4}$ a 25°C) otorga al ácido málico relativamente fuertes propiedades acidas, suficientes para dar una concentración bastante alta de iones hidrógeno, pero al mismo tiempo, débiles como para crear una solución tampón efectiva. (Polynt S.p.A., 2016)

La producción habitual de este compuesto es a partir de ácido fumárico, mediante una transformación enzimática o por hidratación de este y/o del ácido maleico a altas temperaturas y presiones, ambos derivados del anhídrido maleico.

1.2.1. Producción industrial del ácido málico

El ácido málico es producido industrialmente a partir de otros compuestos, tal como se esquematiza en la Figura 1.3, partiendo de fuentes fósiles, la materia prima principal para la síntesis química de los precursores o intermediarios en la producción del ácido DL-málico son el alcano butano y el hidrocarburo aromático benceno. A partir de ambos es posible la obtención del anhídrido maleico, el cual es precursor de un sinnúmero de compuestos químicos, debido a su doble enlace insaturado y a su ácido anhídrido que intervienen en una gran variedad de reacciones químicas.

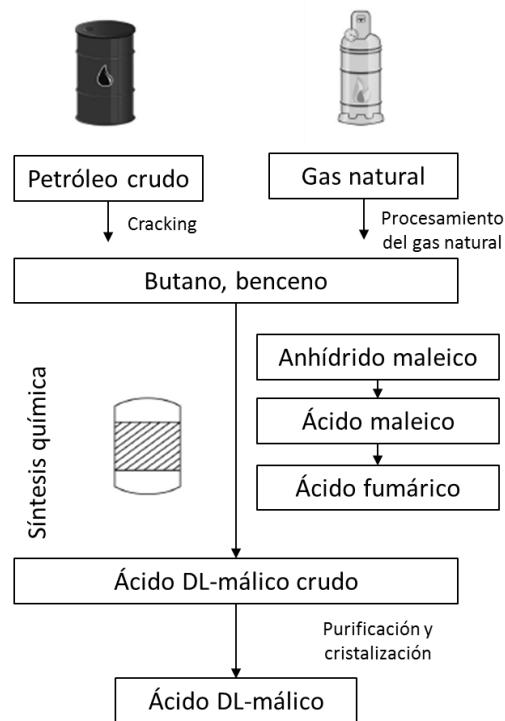


Figura 1.3 Producción de ácido DL-málico a partir de fuentes fósiles.

El anhídrido maleico se puede producir ya sea por oxidación selectiva de n-butano o por oxidación selectiva de benceno.

Producción de anhídrido maleico a partir de benceno

La vía benceno es el proceso más antiguo, industrialmente utilizado desde 1933. La reacción se lleva a cabo en fase gas, entre 400-450 °C, en un reactor tubular, con el uso de un catalizador de óxido mixto Mo/V. La conversión es casi total (96% aprox.), la selectividad del anhídrido puede ser hasta del 73%. (USA Patente no. 4 855 459, 1989).

No obstante que, la cantidad de benceno sin reaccionar es baja, este debe ser adsorbido y reciclado, o quemado. Las emisiones de este compuesto a la atmósfera no pueden ser superiores a 5 µg/m³ debido a regulaciones ambientales. (USA Patente no. 4 941 895, 1989).

Producción de anhídrido maleico a partir de n-butano

La vía n-butano es utilizada desde 1974, se realiza a 400 °C en fase gas con un catalizador de óxido mixto de V/P (Asghar, 2010). La conversión alcanzada varía dependiendo las tecnologías empleadas, desde un 65 hasta un 80%, sin embargo, la selectividad del anhídrido alcanza hasta el 86%. (Turton, 2003). Para el 2011, el 80% del anhídrido maleico se producía a partir de n-butano, el restante por la vía del benceno. (Shekari, 2011).

Mediante la hidrólisis del anhídrido se obtiene el ácido maleico, el cual es un ácido dicarboxílico, cis-isómero del ácido butenodioico, donde el ácido fumárico es el isómero trans. En relación a su anhídrido, el ácido maleico tiene pocas aplicaciones.

Es menos estable que el ácido fumárico, pero más soluble. Ambas propiedades se le atribuyen a la unión intramolecular que se lleva a cabo en el ácido maleico a expensas de las interacciones intermoleculares, las cuales no son posibles en el caso del ácido fumárico por razones geométricas (Shekari, 2011).

Su principal uso industrial es su conversión a ácido fumárico, mediante la isomerización cis-trans del ácido maleico, catalizada por una variedad de reactivos como ácidos minerales y tiourea. La reacción es casi cuantitativa y se realiza en disolución acuosa, a 150°C sin catalizador, y a 100°C con catalizador (H₂O₂, tiourea, persulfato amónico, etc.) (Weissermel, 1981). La baja solubilidad del ácido fumárico permite su purificación.

Más del 40% de la producción de ácido fumárico se emplea para producir poliésteres, entre el 10 y 20% se destina para la obtención de ácido L-málico o D-málico, la cual se realiza por hidratación catalizada por protones a altas temperaturas y presiones. También puede ser producido mediante biotransformación de fumarato usando células inmovilizadas o fumarasa.

Sin embargo, todos los medios descritos requieren derivados del petróleo, por lo que debido al costo medioambiental y a la búsqueda de procesos libres de petroquímicos se ha generado investigación sobre otros mecanismos de obtención.

1.2.2. Métodos alternativos de producción

El ácido málico (ácido hidroxibutanodióico o hidroxisuccínico) en conjunto con el ácido succínico y fumárico, forman los ácidos C4 dicarboxílicos, que pueden ser obtenidos mediante procedimientos biotecnológicos con potencial de aplicación como productos químicos básicos. Se agrupan debido a que comparten rutas de producción biológica muy similares y a partir de ellos puede obtenerse una gama común de compuestos químicos derivados, su ruta metabólica se describe en la Figura 1.4.

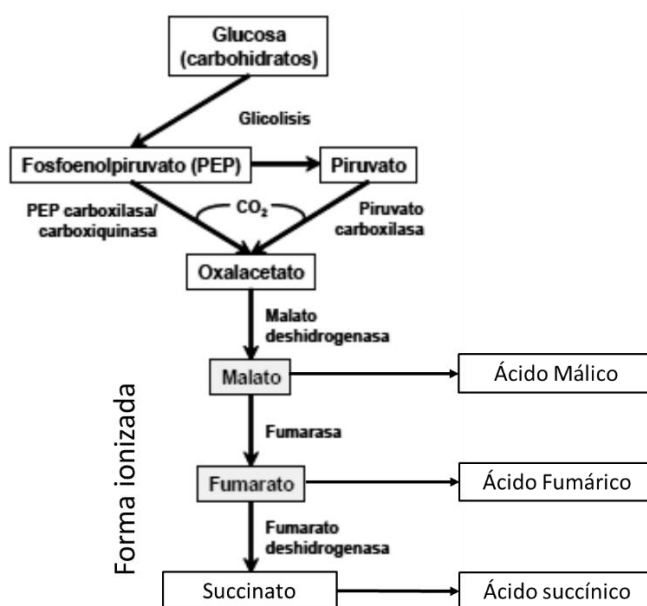


Figura 1.4 Ruta metabólica para la síntesis de los ácidos succínico, fumárico y málico.

El ácido málico al ser un compuesto quiral puede presentarse en cualquiera de sus dos configuraciones (L o D), siendo la L específicamente la sintetizada por los sistemas biológicos (Magnuson, 2004). Este ácido puede ser obtenido mediante biocatálisis y/o fermentación. La primera consiste en la conversión del ácido fumárico en ácido málico catalizada por la enzima fumarasa, utilizando células permeabilizadas de la levadura *Saccharomyces bayanus* se han logrado conversiones de hasta 82%.

La producción mediante fermentación conlleva una ruta metabólica común al ácido succínico y fumárico (Presecki, 2005). Se han seguido dos estrategias principales para la producción de este ácido: la utilización de microorganismos hiperproductores de un modo natural y la creación de nuevas cepas productoras mediante el empleo de técnicas de ingeniería metabólica (Werpy, 2004).

Algunos microorganismos que pueden producir este ácido, vía fermentativa a partir de glucosa y otros carbohidratos, son varias especies de *Aspergillus* (Battat., 1991; West, 2011), *Zygosaccharomyces rouxii* (Taing, 2007), *Schizophyllum commune* (Kawagoe, 1997) y algunas especies de *Rhizopus*, aunque éstos últimos producen más otros ácidos como el láctico y el fumárico (Magnuson, 2004).

Uno de los microorganismos con mejores rendimientos es *Aspergillus flavus*, el cual puede producir hasta 113 g/L con una productividad de 0.59 g/L-h (Battat, 1991). Sin embargo, debido a su patogenicidad, está limitado su uso para aplicaciones industriales. Otro problema que presenta la obtención de ácido málico por fermentación es la coproducción de otros ácidos orgánicos, como los ácidos succínico y acético (Goldberg, 2006), lo que vuelve el proceso de purificación complejo y costoso (Zhang, 2011).

Utilizando cepas genéticamente modificadas, la fermentación se ve severamente limitada por productos inhibidores, resultando en bajas producciones (menores de 60 g/L). La ingeniería metabólica y evolutiva ofrece estrategias prometedoras para mejorar la fermentación industrial de ácidos orgánicos, sobre concentración del producto, rendimiento y productividad a niveles económicos. Sin embargo, requiere mejoras importantes en la tolerancia a los ácidos de los microorganismos, lo que sigue representando un reto importante (Cao, 2011). Algunos microorganismos recombinantes con una producción elevada de ácido málico incluyen a *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli* (Moon, 2008; Zelle, 2008; Zhang, 2011b). A pesar de los estudios al respecto, a la fecha, no se ha desarrollado un proceso de fermentación para producción industrial directa de este ácido.

1.2.3. Obtención de poliácido málico (PMA)

La bioproducción del polímero de ácido málico ha tomado relevancia en los últimos años, al no contar con la desventaja de inhibir el crecimiento de la biomasa y por si solo ser un compuesto con un campo de aplicación prometedor.

El poli β -L-ácido málico, es un polímero conformado por repetitivas unidades de L-malil, que son ligadas mediante enlaces de éster entre un grupo carboxilo y un grupo hidroxilo, los cuales forman una molécula adyacente de ácido L-málico (Li, 2015). Los α -carboxilatos están libres e ionizados a pH neutro.

Es un biopolímero natural con características sobresalientes de biocompatibilidad, biodegradabilidad, solubilidad en agua, y no-inmunogenicidad, además de ser fácilmente modificable químicamente y disponible como materia prima sustentable. También cuenta con aplicaciones en la producción de detergentes, plásticos biodegradables u otros biomateriales (Liu, 1997), como sistema de entrega de fármacos (Holler, 1992), además que como producto de su hidrólisis se obtiene ácido L-málico (Chi, 2016).

Éste compuesto químicamente puede ser sintetizado por dos vías, polimerización de anillo-abierto y policondensación directa a altas temperaturas (110-140 °C) (Vert, 1979; Kajiyama, 2004). Sin embargo, los procesos químicos son muy complicados e implican un alto costo energético, las condiciones de reacción no son amigables con el medio ambiente y el material de inicio es el anhídrido maleico, un derivado del petróleo (Kajiyama, 2004).

Es por ello, la importancia de generar un proceso técnicamente factible y económicamente rentable para la producción de este polímero a partir de fuentes de carbono como la glucosa mediante fermentación de un solo paso.

Mediante fermentación, los mayores productores de PMA son cepas de mohos del género *Aureobasidium* aisladas de diferentes ambientes. En la Figura 1.5 se

presentan los diferentes isómeros del poliácido málico, solo el tipo β es producido por *Aureobasidium spp.*

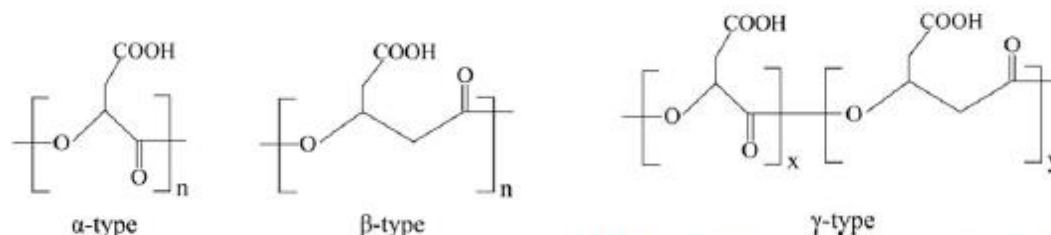


Figura 1.5 Los tres diferentes isómeros de poliácido málico.

En años recientes, varias cepas de *Aureobasidium pullulans*, capaces de producir polímeros extracelulares, incluyendo PMA, han sido aisladas (Li *et al*, 2015). Altas concentraciones (40-124 g/L), rendimiento (0.3-0.87 g/g) y productividad (0.3-1.22 g/Lh) de PMA con un peso molecular de 4000-200,000 Da, pueden ser producidos por este microorganismo mediante fermentación, utilizando glucosa como sustrato (Cao, 2012; 2014; Chi, 2016b; Ma, 2013; Wang, 2015; Zhang, 2011; Zou, 2013). En los últimos años otra especie, *Aureobasidium melanogenum*, ha demostrado también la capacidad para la producción de este polímero (Zeng, 2018, 2019).

1.2.4. *Aureobasidium spp*

El género *Aureobasidium* incluye entre 14 y 26 especies (UniProt Consortium, 2009). La base de datos de la Asociación Micológica Internacional lista 6 variedades de *A. pullulans* (Robert, 2005; Zelle, 2008), dentro de las que hasta hace pocos años se incluía *melanogenum* como una de sus variedades y que actualmente se considera como nueva especie. En la Tabla 1.3 se describe la taxonomía de este género.

Tabla 1.3 Taxonomía de *Aureobasidium spp.*

Reino	<i>Fungí</i>	Orden	<i>Dothideales</i>
Filo	<i>Ascomycota</i>	Familia	<i>Dothioraceae</i>
Clase	<i>Dothideomycetes</i>	Género	<i>Aureobasidium</i>

Fuente: Instituto Nacional de Salud Pública de Québec

Aureobasidium es un moho saprófito ubicuo (Samson, 2004), que generalmente se considera como un contaminante ambiental (Larone, 1987; Patterson, 2009). Es común en zonas templadas, encontrado en el suelo de bosques, fuentes de agua

dulce, en porciones aéreas y superficies foliares de las plantas, así como en semillas de trigo, cebada, avena y algunas nueces (Hawkes, 2005; Patterson, 2009; Samson, 2004; Taylor, 2006). También puede encontrarse como agente de descomposición en frutas (peras, uvas y tomates) y en bebidas de frutas (EMLAB, 2007; Samson, 2004), asociándose con su deterioro durante su almacenamiento y transporte.

Las especies de este género crecen bien dentro de un amplio rango de temperaturas, entre 2 y 35°C, con una temperatura óptima de 25°C. *A. pullulans* requiere altas humedades para germinar y crecer, es decir, actividad de agua (aw) entre 0.89 y 0.9 a 25°C (Grant, 1989). Este microorganismo es capaz de producir diferentes bioproductos incluyendo pululano, PMA, xilanasa y lipasa (Liu, 2008; Manichotpsit, 2011, 2012; Wu, 2012).

Algunas cepas sintetizan PMA a partir de un solo monómero de ácido málico y lo secretan dentro del medio de fermentación (Cao, 2012, 2012b; Leathers, 2013; Liu, 1997; Manitchotpsit, 2012; Zhang, 2011a). A diferencia del ácido málico, su polímero no es tóxico para las células y puede ser fácilmente aislado del medio de fermentación por precipitación con etanol (Holler, 2010).

Hoy en día, se conocen tres rutas metabólicas para la síntesis de malato a partir de glucosa en microorganismos, incluyendo la vía oxidativa, la vía no oxidativa y el ciclo del glioxilato. (Chi, 2016).

En la Figura 1.6, se representan estas rutas, asociadas a la producción de PMA a partir de sacarosa. La primera parte del esquema representa la glucólisis mediante la cual se obtiene el piruvato que es la materia prima inicial para el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), también conocido como ciclo de Krebs o del ácido cítrico. Esencialmente el conjunto de reacciones que lo conforman, se lleva a cabo para la generación de las moléculas necesarias para el transporte de electrones de alta energía (NAD⁺, FAD) que se requerirán en la membrana mitocondrial, donde finalmente se genera la mayor cantidad de energía para el funcionamiento celular (ATP). (Zou, 2013).

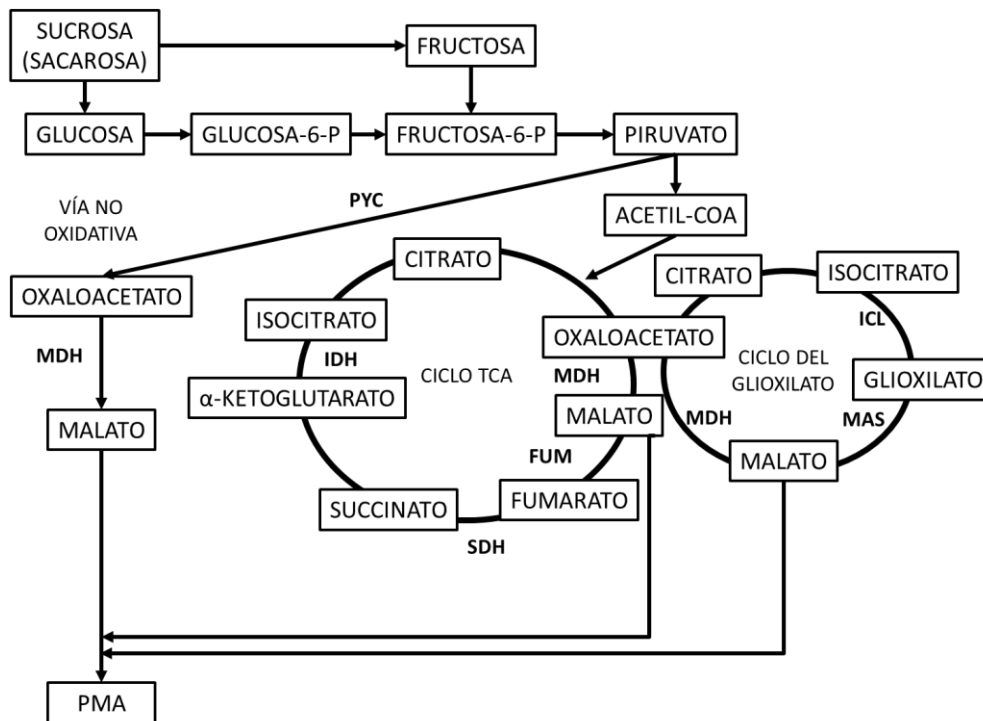


Figura 1.6 Rutas propuestas para la biosíntesis de PMA en *A. pullulans*, tomado de Wei *et al*, 2018. PYC, piruvato carboxilasa; MDH, malato deshidrogenasa; IDH, isocitrato deshidrogenasa; SDH, succinato deshidrogenasa; FUM, fumarasa; ICL, isocitrato liasa; MAS, malato sintetasa.

Este ciclo corresponde a la ruta oxidativa, donde la acetil-coenzima A y el oxaloacetato son condensados a citrato, el cual es oxidado a malato, y este finalmente puede romper el ciclo al convertirse en PMA.

Por la ruta no oxidativa, el piruvato es descarboxilado a oxaloacetato por una enzima biotín-dependiente llamada piruvato carboxilasa, entonces se reduce al malato mediante una malato deshidrogenasa NADH-dependiente. Recientemente, se ha observado que el ciclo del glioxilato también podría estar involucrado en la obtención del malato necesario para la síntesis del polímero. Esta ruta es complementaria al ciclo TCA, con la conversión del isocitrato a malato por la isocitrato liasa y la malato sintetasa. (Zeng, 2018).

Debido a que no se ha llegado a detallar la ruta metabólica que conlleva a la producción del polímero diversos estudios se han centrado en el efecto de inhibidores

y precursores del ciclo de los ácidos tricarbóxicos en el proceso de fermentación utilizando *Aureobasidium melanogenum* (Zeng, 2018) y con *Aureobasidium pullulans* (Liu, 1997).

Otras investigaciones se han llevado a cabo para la producción de PMA mediante fermentación a partir de sustratos de bajo costo como desechos de papa (Zan, 2013), molasa de soya (Cheng, 2016), olote (Zou, 2015; 2016) y paja de trigo (Leathers, 2013). Sin embargo, todos ellos tienen que pasar por un proceso previo, enzimático y térmico para obtener los azúcares fermentables. Esto añade costo al proceso y puede generar químicos perjudiciales inhibiendo al microorganismo de fermentación (Zhang, 2016).

Por lo que la búsqueda de materias primas que no impliquen procesos previos ha tomado relevancia. El uso de jugo de caña de azúcar ha brindado buenos resultados: concentraciones de 116 g/L, rendimiento de 0.54 g/g y productividad de 0.66 g/Lh (Wei, 2016). Zeng (2018,2019) y colaboradores han obtenido buenos resultados utilizando jarabe de malta y *A. melanogenum*, concentraciones de 64.06 g/L en promedio, altos rendimientos de 0.81 g/g y productividades de 0.56 g/Lh.

Además de los residuos de industrias primarias, es interesante analizar los residuos de otras industrias de transformación como materia prima potencial para estos procesos. La industria de la confitería representa un área de oportunidad importante, al generar residuos ricos en azúcares fermentables, resultado de producto terminado fuera de especificación.

1.3. MODELADO MATEMÁTICO

Para el estudio de los procesos de fermentación es común utilizar modelos matemáticos que permiten, mediante la correlación de datos experimentales, tener una visión más acertada del proceso en cuestión, realizar predicciones cuantitativas y por lo tanto reducir costos en el diseño experimental y de proceso mediante la consideración de variables que afecten el desarrollo experimental y, la utilización del

modelamiento matemático para escalar procesos realizados a nivel laboratorio (Duarte, 2011).

Los modelos son hipótesis existentes entre las relaciones matemáticas de las variables medibles y no medibles en un sistema, proceso o experimentación. Permiten la simplificación de un sistema biológico a través de la utilización de funciones matemáticas, especificándose las condiciones previas el proceso.

1.3.1. Curva de crecimiento microbiano

Para realizar el modelado de un proceso fermentativo, debido a que la producción de metabolitos depende de la producción celular, es importante conocer la evolución del crecimiento del microorganismo utilizado.

Este suele ilustrarse a través de la curva de crecimiento, que es la representación de la evolución de la población con respecto al tiempo. Se obtiene graficando el logaritmo del número de microorganismos a diferentes tiempos. En la Figura 1.7 se ilustra la forma sigmoideal que usualmente describen estas curvas bajo condiciones constantes y favorables para el crecimiento.

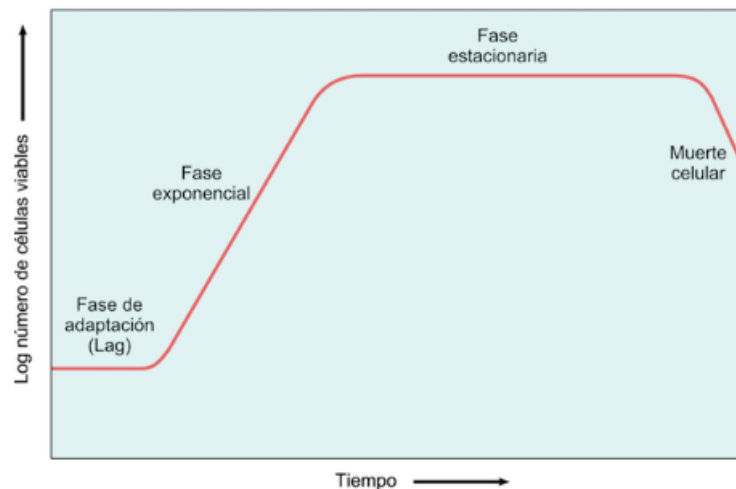


Figura 1.7 Curva de crecimiento microbiano típico para una población bajo condiciones ambientales constantes.

Aun en un medio bajo las condiciones favorables para su crecimiento, el microorganismo necesita un tiempo de adaptación a ese nuevo ambiente antes de comenzar el crecimiento. Esta etapa se conoce como fase de adaptación, latencia o fase lag. A continuación, la población microbiana entra en la denominada fase exponencial o logarítmica, caracterizada por un crecimiento exponencial con tasa constante (μ_{\max}). Este crecimiento se mantiene hasta que la población microbiana se estabiliza, deteniéndose el crecimiento. Esta nueva fase se denomina fase estacionaria. Por último, la población microbiana decae cuando se consumen todos los recursos del medio, y se conoce como fase de muerte.

1.3.2. Modelos de crecimiento microbiano

En las fermentaciones, es una constante que los modelos matemáticos tengan uno o varios parámetros que los describan y que su valor numérico sea desconocido antes de aplicarlo y no sea medible.

Dada a la complejidad de los sistemas biológicos, su modelado debe incluir inevitablemente idealizaciones simplificadas (Baranyi, 1995). Estas consideraciones o suposiciones, aunque introducen inexactitud a los modelos respecto a ciertas variables, no inciden considerablemente, por ejemplo, en la descripción de las etapas de crecimiento microbiano u otras variables importantes (Calderon, 2017).

Las suposiciones básicas que se hacen en el desarrollo de un modelo matemático son:

1. No existe distribución de estados, es decir, se discrimina la existencia de diferentes formas, edades y tamaños de las células, asumiendo todo el conjunto como homogéneo.
2. La segregación, toda la población microbiana se asume como discreta.
3. El crecimiento microbiano sigue un modelo determinístico, aun cuando se ha demostrado que, a través de las generaciones de células, la tasa de crecimiento microbiano varía gradualmente.

4. La estructura celular interna es la misma para todo el conjunto celular, despreciando las diferencias tanto en composición como en distribución a lo largo del espacio y tiempo de la fermentación. (Calderon, 2017)

En base a estas consideraciones, pueden describirse dos tipos principales de modelos matemáticos de crecimiento de una población de microorganismos:

- Estructurados: Estos consideran los aspectos básicos de la célula y su especie química en cuestión, despreciando o agrupando los demás componentes en grupos generalizados que pueden llamarse lípidos, proteínas, etc.
- No estructurados: Para la mayoría de casos de fermentaciones, este tipo de modelos puede describir adecuadamente el desarrollo del proceso, considerando que los microorganismos y/o células poseen una composición fija y simple. Este tipo de modelos desprecia los cambios en el medio de cultivo producto de la concentración de biomasa (Esener, 1983).

Ambos tipos de modelos, además pueden identificarse como segregados y no segregados. Los primeros hacen referencia a una población de microorganismos heterogénea, donde se distinguen en la población diferentes entidades con edades, formas, tamaños y composiciones internas variables; mientras que los no segregados, consideran que el comportamiento celular se aproxima al de una sola célula promedio que permita agrupar el desempeño de ciertas variables durante la fermentación (Fredrickson, 1970).

1.3.2.1. Modelos primarios de crecimiento microbiano

Los modelos primarios se utilizan en general para representar la inactivación o crecimiento de un microorganismo, estudian la cinética de un proceso con el objeto de, con el menor número posible de parámetros, ser capaces de definir con precisión las distintas fases de crecimiento e inactivación microbiana. Son particularmente útiles cuando se quiere predecir el cambio en el crecimiento microbiano de forma cuantitativa.

Su objetivo principal es describir matemáticamente la curva de crecimiento generada por los microorganismos de interés bajo condiciones ambientales definidas con el objeto de estimar los parámetros cinéticos que caracterizan dicha curva: tiempo de latencia, máxima velocidad específica de crecimiento y máxima densidad celular.

Con el objeto de estimar los parámetros cinéticos de crecimiento de forma objetiva, desde 1980 se han propuesto una serie de modelos matemáticos. Baty y Delignette-Müller (2004) clasificaron a los modelos primarios como:

- Modelos sigmoidales, entre los que se encuentran las versiones modificadas de los modelos Logístico y de Gompertz;
- Modelos con una función de ajuste, como los propuestos por Baranyi y Roberts (1994) y Buchanan (1997)
- Modelos de compartimentos como el propuesto por Hills y Wrigth (1994).

La propiedad más importante de un modelo primario es que describa de forma adecuada el crecimiento de los microorganismos y permita obtener estimaciones precisas de los parámetros que caracterizan dicho crecimiento. La variabilidad de las estimaciones depende de la técnica usada para monitorear el crecimiento y del modelo usado (Dalgaard, 2001; Baty, 2002).

1.3.3. Cinéticas de producción de metabolito y biomasa

Al igual que el comportamiento del crecimiento microbiano, la producción de metabolitos y biomasa, así como el consumo de sustrato, pueden ser modelados mediante ecuaciones establecidas en la literatura. La importancia de describir estos comportamientos radica en definir sobre que ruta el microorganismo está desarrollándose, si bien el sustrato es consumido en mayor medida para la producción celular o por el contrario este es metabolizado en su mayoría para la generación de los metabolitos deseados.

Muchos de los modelos básicos pueden explicar el comportamiento tanto del crecimiento microbiano, como de la producción y consumo de sustrato, dando indicios

de la relación que existe entre estos mecanismos. La finalidad de encontrar un modelo en común que pueda explicar las cinéticas involucradas en la fermentación puede permitir el modelado del proceso global y por consiguiente definir las variables de operación requeridas a una escala superior.

Las ecuaciones correspondientes a los modelos utilizados para este trabajo de investigación se describirán posteriormente en la sección 4.3.

2. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

Justificación

La empresa con la que se colabora en la realización de este proyecto, representa a un grupo de plantas productoras dedicadas a la elaboración de golosinas desde hace más de 90 años, siendo algunas de sus líneas de producción: goma de mascar, dulces de leche, caramelo macizo, caramelo suave, gomas de almidón, pastillas refrescantes, etc.

Como parte de su actual proceso productivo, existen diversos factores que pueden afectar la calidad del producto final, tales como: la calidad de la materia prima empleada, las variaciones en los parámetros de operación (presiones, tiempos, flujos y temperaturas), fallas en equipos, etc. Todo lo anterior repercute en una disminución de la calidad del producto obtenido, el cual no puede ser destinado al consumidor final. Al no representar un riesgo de inocuidad, y con la finalidad de reducir costos por desperdicio, el producto que no cumple con las especificaciones de calidad (textura, sabor, color), al cual se le denominará merma, es destinado a un proceso de recuperación.

Dicho proceso tiene como finalidad recuperar el contenido de azúcares presente en la merma, obteniéndose un jarabe rico en azúcares, que representará un porcentaje del contenido inicial de sólidos en las primeras etapas de la producción principal. A grandes rasgos, este proceso consiste en la disolución de la merma, la separación de grasas mediante flotación, la eliminación de colorantes y saborizantes mediante adsorción-filtración y finalmente, su neutralización para evitar la inversión de la sacarosa.

A pesar de que el proceso de recuperación ha permitido mitigar el desperdicio generado por las líneas de producción mediante su reproceso, no toda la merma puede ser recuperada. Esto se debe a que, por motivos de control de alérgenos, el

producto con presencia de ciertos ingredientes, como la leche o la albúmina de huevo, no puede ser reprocesado. Debido a esto, este producto es almacenado y vendido como forraje, o bien confinado. Esto representa costos importantes de almacenamiento y transporte.

La opción de generar un subproducto con valor agregado, es decir valorizar el producto no conforme, es a través de la bioconversión de estos desechos. Lo cual representa para la empresa un área importante de oportunidad para disminuir la producción de residuos sólidos, disminuir costos de almacenamiento y transporte, además de desarrollar su estrategia tecnológica.

Hipótesis

Es posible la generación de un producto de alto valor agregado (poliácido málico) mediante un proceso de fermentación, utilizando la merma de distintas líneas de producción de una empresa de confitería.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

- Establecer vías biotecnológicas viables para la obtención de productos con alto valor agregado, a partir de la fermentación de residuos ricos en azúcares de la industria de confitería, para su aprovechamiento.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar las condiciones a nivel laboratorio para la obtención del producto de interés.
- Validar los resultados a nivel piloto.
- Modelar las cinéticas de crecimiento microbiano y de producción de la sustancia de interés.

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1. ESTANDARIZACIÓN A NIVEL LABORATORIO

Para el cumplimiento del primer objetivo planteado la primera parte de la metodología se divide en las siguientes etapas:

1. Caracterización del medio prueba
2. Selección de la cepa.
3. Estudio de la fermentación en un medio modelo
4. Estudio de la fermentación en el medio prueba

Estas etapas se describen a continuación.

4.1.1. Caracterización fisicoquímica del medio prueba

De acuerdo a la clase de confitería de la que procede, se definieron tres tipos de jarabes ricos en azúcares que son productos del proceso de recuperación de la merma de confitería siguiente:

- JR, corresponde a una mezcla de caramelo macizo con un contenido relativamente alto de ácidos, colorantes y saborizantes, 35-37% de jarabe de glucosa y 58-60% de azúcar.
- CC, caramelo macizo con bajos contenidos de ácidos, colorantes y saborizantes, 50-54% de jarabe de glucosa y 40-44% de azúcar.
- N, caramelo suave con contenido de grasas vegetales, 49-50% de jarabe de glucosa y 37-38% de azúcar.

La composición teórica del tipo de producto que se utiliza como materia prima, se desglosa en la Tabla 4.1

Tabla 4.1 Composición de las diferentes materias primas utilizadas en el proceso de recuperación de merma de dulce.

Componente/Tipo de dulce	% Composición		
	Caramelo Macizo (JR)	Caramelo Macizo (CC)	Caramelo Suave (N)
Carbohidratos totales	95.08%	97.02%	86.49%
Dextrosa	6.57%	9.73%	5.72%
Maltosa	2.89%	4.28%	11.96%
Sacarosa	58.99%	43.56%	37.17%
Azúcares totales	68.44%	57.56%	54.85%
Azúcares reductores	9.46%	14.01%	17.68%
Grasa vegetal			3.14%
Ácido cítrico		0.36%	1.53%
Ácido málico	2.27%		
Agua	1.99%	1.64%	8.40%
Saborizantes	0.39%	0.97%	0.11%
Sales	0.270%		0.305%
Colorantes	0.005%	0.005%	0.027%

El propósito del proceso de transformación al que se somete la merma es eliminar los compuestos no deseados para el cumplimiento de las especificaciones del producto recuperado que se pretende utilizar como materia prima dentro del proceso productivo (Maldonado, 2020). En la Figura 4.1 se presenta el diagrama de bloques correspondiente al proceso de recuperación.

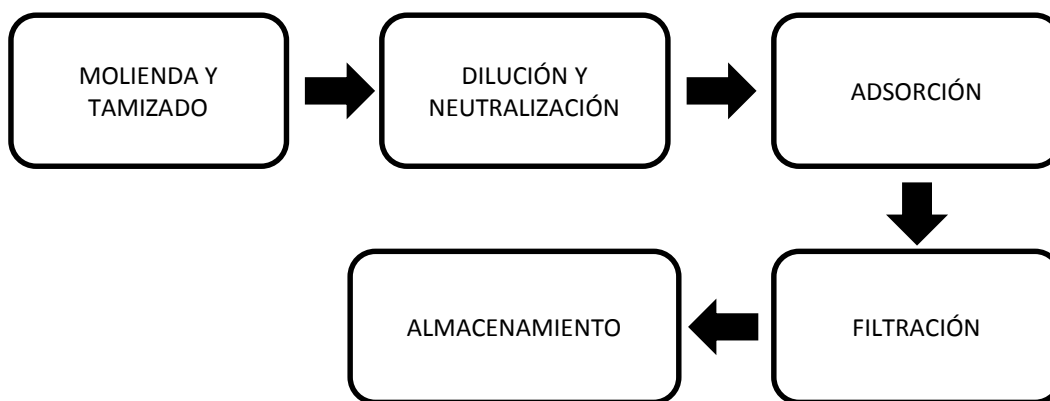


Figura 4.1 Diagrama de bloques del proceso de transformación de la merma de dulce.

La recuperación de la merma comienza con la molienda y separación del dulce de la envoltura, para posteriormente alimentar de manera intercalada cantidades de dulce y agua (disolvente utilizado) en un tanque de dilución hasta completar esta etapa del proceso, misma que tiene una duración de 10 a 21 horas para el caramelo suave y de 6 a 11 horas para el caramelo duro. Las cantidades totales de dulce y agua se definen de acuerdo a la concentración de sólidos que se desea obtener (Maldonado, 2020).

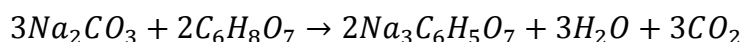
Para el dulce del caramelo suave, su disolución se realiza mediante un aumento de la temperatura (50°C) y la inyección de aire, que al generar turbulencia facilita la separación de la grasa presente mediante flotación, la cual finalmente es contenida y retirada utilizando una canastilla. Para el caramelo duro esta etapa se lleva a cabo a temperatura ambiente y no requiere inyección de aire, esta etapa del proceso finaliza hasta diluir completamente las partículas de dulce. (Maldonado, 2020).

A continuación, la solución obtenida se somete a una evaluación de pH para poder continuar con la siguiente etapa del proceso. Los valores de pH dentro de especificación son los siguientes:

- Dulce caramelo suave: 5.5 - 7
- Dulce caramelo duro: 5.8 - 6.3

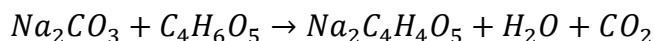
Los valores más bajos de pH se deben a la presencia de ácidos orgánicos en la materia prima, que según el tipo de dulce pueden ser ácido cítrico o ácido málico. Estos compuestos pueden generar un valor de pH inferior al rango de especificación, en cuyo caso se requiere una neutralización, lo cual se lleva a cabo adicionando una solución de carbonato de sodio. Las reacciones que se llevan a cabo en el proceso dependen del tipo de ácido:

- **Ácido Cítrico:**



Carbonato de Sodio + Acido Cítrico = Citrato de Sodio + Agua + Dióxido de Carbono (g)

- **Ácido Málico:**



Carbonato de Sodio + Acido Málico = Malato de Sodio + Agua + Dióxido de Carbono

La confirmación del valor de pH dentro del rango de especificación determina la continuación del proceso. Concluida la etapa de dilución y neutralización, la solución obtenida es sometida a la etapa de adsorción, con la finalidad de remover color, olor y sabor (Castellar, 2013).

Para el dulce de caramelo suave se le añaden entre 30 y 40 kg de carbón activado 0.61C, el proceso de adsorción se lleva a cabo durante 1 hora, mientras que en el caso del caramelo duro se le añaden 50 kg de carbón activado y el proceso toma entre 1 y 1.5 horas.

Terminada la adsorción, la solución de dulce con los sólidos de carbón activado en suspensión es alimentada a un filtro prensa. El medio filtrante en el equipo utilizado es capaz de soportar 4 cargas de suspensión hasta su sustitución, es gracias a esto que el proceso tiene una duración de 1 a 4 horas.

De esta manera se obtienen filtrados incoloros y sin saborizantes que se espera cumplan con las especificaciones mostradas en la Tabla 4.2 para su posterior uso en el proceso de producción.

Tabla 4.2 Especificaciones de los jarabes obtenidos del proceso de recuperación.

Tipo de dulce	Especificación			
	Dextrosa equivalente (%)	Sólidos (%)	pH	Densidad a 20°C (g/mL)
JR	ND	65-67	5.8-6.3	ND
CC	ND	65-67	5.8-6.3	ND
N	Max 28	55-67	5.5-7	1.259-1.303

ND: No definido

Por lo tanto, se realizó la caracterización fisicoquímica de estos jarabes a través de la medición de las siguientes características:

- Azúcares reductores totales
- Azúcares totales
- Porcentaje de sólidos solubles
- pH
- Densidad

Los cuales se describen a continuación.

Azúcares reductores totales (AR) y azúcares totales (AT)

La dextrosa, maltosa y fructosa pertenecen a un tipo de azúcares conocidos como reductores, los cuales tienen un grupo carbonilo intacto que les permite reaccionar como reductores con otras moléculas que actuarán como oxidantes (Lehninger, 1988). La sacarosa, por el contrario, es una unión entre glucosa y fructosa mediante un enlace O-glucosídico, dicho enlace es dicarbonílico ya que son los dos carbonos reductores de ambos monosacáridos los que forman el enlace, por lo que no cuenta con la particularidad del poder reductor. Por tal motivo, la determinación de azúcares reductores tiene como finalidad cuantificar, en este trabajo, la dextrosa, maltosa y fructosa presente en la muestra, esta última como consecuencia de la inversión de la sacarosa en el transcurso de la fermentación debido al metabolismo del propio microorganismo.

Los azúcares reductores son calculados como un porcentaje de la sustancia seca y se expresan como dextrosa equivalente. Las fórmulas utilizadas para su cálculo se presentan en las Ecuaciones 1 y 2:

$$\%D.E. = \frac{(a)(b) * 10000}{(c)(d)(e)} \quad (1)$$

%D.E. corresponde al porcentaje de dextrosa equivalente, *a* es el volumen de la solución de la muestra, *b* es el factor de Fehling para 12.5 o 5 ml, *c* el volumen gastado, *d* es el peso de la muestra y *e* es el % de sólidos (°Brix).

$$\%A.R. = \frac{(\%D.E.) * E}{100} \quad (2)$$

Donde %A.R es el porcentaje de azúcares reductores, %D.E. es el porcentaje de dextrosa equivalente y E corresponde al porcentaje de sólidos de la muestra.

A través de una hidrólisis ácida es posible la separación de las moléculas de glucosa y fructosa de la sacarosa, permitiendo obtener un porcentaje de azúcares totales siguiendo la metodología para azúcares reductores. La fórmula correspondiente se presenta en la Ecuación 3:

$$\%A.T. = \frac{(\%D.E.I) * E}{100} \quad (3)$$

Donde %A.T. es el porcentaje de azúcares totales, %D.E.I. es el porcentaje de dextrosa equivalente de la muestra invertida y E corresponde al porcentaje de sólidos de la muestra.

Porcentaje de sólidos solubles (°Brix)

En alimentos, la medición indirecta de la densidad de un líquido mediante un refractómetro se refiere principalmente al azúcar presente. Según la escala de estos equipos 1°Brix corresponde a un índice de refracción de una solución de sacarosa en agua al 1%. Así, los °Brix fueron determinados con la ayuda de un refractómetro RHW-25Brix ATC, marca LUMEN. Este parámetro se consideró como la concentración total de sólidos solubles.

pH

El pH en un medio de cultivo puede variar por la secreción de sustancias al medio producto del metabolismo del microorganismo. Sin embargo, bajos valores de pH pueden inhibir su crecimiento e incluso ser responsable de la muerte celular. En general, los mohos presentan alta resistencia a medios ácidos, pero la variación del pH y/o acidez interviene en su desarrollo.

Para este trabajo de investigación se utilizó el pHmetro Orion 3 Star™, ThermoFisher Scientific, para el monitoreo del pH tanto en la materia prima como a lo largo del proceso de biotransformación.

Densidad

Se determinó a partir de la medición experimental de la masa y el volumen de una muestra, de acuerdo con la metodología utilizada en el Laboratorio Interno, a cargo del monitoreo de la calidad de los jarabes de recuperación.

4.1.2. Selección de la cepa

Se utilizaron dos cepas del género *Aureobasidium*, la primera fue la cepa FM 986 proporcionada por la Universidad Nacional Autónoma de México (cepario de la Facultad de Medicina) y la segunda fue proporcionada por la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (cepario Laboratorio de Micología, Facultad de Ciencias Químicas).

Ambas cepas fueron identificadas mediante secuenciación genética en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. El análisis de identificación mostró que se trata de las especies *Aureobasidium melanogenum* y *Aureobasidium pullulans*, respectivamente

4.1.2.1. Fermentación

La productividad de las cepas se determinó mediante la fermentación en medios de cultivo apropiados para cada microorganismo. Esto, debido a que se han reportado diferencias en las condiciones óptimas para cada especie. Estos estudios permitieron determinar la cepa más adecuada para el proceso de producción de ácido málico.

MEDIOS DE CULTIVO

La metodología de fermentación se realizó con base en el estudio de W. Zeng y col. (2018) para *Aureobasidium melanogenum* y, de P. Wei y col. (2017) para el caso del *Aureobasidium pullulans*.

Aureobasidium melanogenum

No requiere acondicionamiento previo en medio sólido, por lo que se preparó el inóculo inicial (SCAm) con los siguientes componentes: dextrosa 80 g/L, KH_2PO_4 0.1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, KCl 0.5 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L, NaNO_3 2 g/L, CaCO_3 20 g/L (Zeng, 2018). Este medio se esterilizó a 121°C/15 min, posteriormente se inocularon 100 mililitros con *A. melanogenum*, y se incubó a 30°C/180 RPM por 36 horas.

Para el caso del medio de fermentación (MFAm), este se preparó con los siguientes componentes: dextrosa 120 g/L, KH_2PO_4 0.1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, KCl 0.5 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, NaNO_3 4 g/L, CaCO_3 40 g/L (Wei, 2018). Como en el caso anterior este medio se esterilizó a 121 °C/15 min, posteriormente fue inoculado con 5%v/v del inóculo inicial e incubado a 30°C/180 RPM por 10-15 días.

Aureobasidium pullulans

Esta cepa requiere un acondicionamiento previo en medio sólido. Por ello, se utilizó Agar Papa Dextrosa con 3 resiembras, antes de la preparación del inóculo inicial en medio líquido (SCAp).

El inóculo en medio líquido se preparó con los siguientes componentes: dextrosa 10 g/L, Peptona 5g/L, Extracto de Levadura 1 g/L, KH_2PO_4 0.1 g/L, $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, KCl 0.75 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L (Wei, 2017). El medio se esterilizó a 121 °C/15 min. Posteriormente, 100 mililitros fueron inoculados con la última resiembra de *A. pullulans* y se incubó a 25°C/220 RPM por 24 horas.

Finalmente, el medio de fermentación (MFAp) fue preparado con los siguientes componentes: dextrosa 120 g/L, KH_2PO_4 0.1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, KCl 0.75 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, NH_4NO_3 2 g/L, Ácido Cítrico 5 g/L, CaCO_3 30 g/L (Wei, 2017). Como en los casos anteriores, el medio se esterilizó a 121 °C/15 min. Posteriormente, fue inoculado con 5% v/v del inóculo inicial e incubado a 25°C/220 RPM por 10 días.

4.1.2.2. Seguimiento de la fermentación

A lo largo de la fermentación se midieron las siguientes variables:

- pH
- Porcentaje de sólidos solubles(°Brix)
- Azúcares totales (AT)
- Azúcares reductores totales (ART)
- Cuenta Total para Mohos (CT)
- Biomasa (DCW)
- Masa de polímero obtenido por gravimetría (PMA)

La determinación de °Brix y cuenta total se realizó cada 24 h, el resto de las variables de determinaron cada tercer día a lo largo del tiempo total de fermentación. La descripción para la medición de los primeros 4 parámetros ya han sido descrito, y continuación, se describen los análisis restantes:

Cuenta Total para Mohos (CT)

Ya que *Aureobasidium* no es un moho de crecimiento extensivo, se pudo utilizar la técnica de siembra de Miles & Misra (1938), para cuantificar la carga microbiana. Se inocularon gotas de 20µL por triplicado en la superficie de placas con Agar Papa Dextrosa estéril solidificado (DIFCO™, FisherScientific). Posteriormente, las placas se incubaron a 25°C durante 24 h para *A. melanogenum* y 36-48 h para *A. pullulans*.

Biomasa (DCW)

Se utilizó la técnica de peso seco celular o DCW por sus siglas en inglés (Dry Cell Weight). Para ello, se realizó la centrifugación de 20 mL de muestra (15000 g/20 min). Posteriormente, el sobrenadante fue separado para realizar la determinación de azúcares totales, azúcares reductores totales y PMA. El precipitado fue tratado con HCl 3M para eliminar el CaCO₃ en la muestra. A continuación, se centrifugó nuevamente (8000 RPM/10 min) para eliminar el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con agua destilada, para eliminar las sales que pudieran quedar en el precipitado, empleando ciclos de agitación (10 min) y centrifugación (8000 RPM/10 min) (Zou, 2016)

El precipitado restante libre de sales es sometido a secado a peso constante en estufa a 55°C/24 h, el cálculo se realiza por medio de la Ecuación 5:

$$DCW = \frac{(W_f - W_i)}{V_m} [=] \frac{g}{mL} \quad (5)$$

Donde, W_f corresponde a Peso final + Peso del tubo, W_i indica el Peso del tubo y V_m representa el Volumen de la muestra del cultivo de fermentación. Por lo que se obtiene un porcentaje en W/V.

Concentración de polímero por gravimetría (PMA)

El poliácido málico tiene la particularidad de precipitar al disminuir su punto de solubilidad, mediante el uso de bajas temperaturas y compuestos polares como el etanol, esta característica la comparte con un importante número de exopolisacáridos (Portilla, 2008).

Asumiendo que se están generando las condiciones ideales para favorecer el metabolismo por el cual se genera PMA, presencia de CaCO₃ (Lee, 1999; Zhang, 2011), se considera que el precipitado corresponde solo a este compuesto.

Primeramente, se realizó su precipitación mediante la adición de 2.5 volúmenes de etanol siguiendo la metodología planteada por Liu y colaboradores (1996), seguida de un reposo de 24 h para continuar con la separación mediante centrifugación 15000 g/20 min/4°C, y el secado hasta peso constante en estufa a 55°C/24 h. El cálculo se realiza por medio de la Ecuación 6:

$$PMA = \frac{(W_f - W_i)}{V_m} [=] \frac{g}{mL} \quad (6)$$

Donde, W_f corresponde a Peso final + Peso del tubo, W_i indica el Peso del tubo y V_m representa el Volumen de la muestra del cultivo de fermentación. Por lo que se obtiene un porcentaje en W/V.

4.1.3. Estudio del proceso de fermentación en el medio modelo.

Mediante la realización de balances de materia se obtuvo la composición teórica de los jarabes, la cual se muestra en la Tabla 4.3, que nos brinda un aproximado de la relación Dextrosa-Sacarosa presente en cada uno, así como la presencia de las sales residuales producto de la neutralización.

Tabla 4.3 Composición teórica de los diferentes jarabes obtenidos del proceso de recuperación.

Componente/Jarabe	% Composición Final		
	JR	CC	N
Carbohidratos totales	62.02%	66.03%	62.05%
Dextrosa	4.28%	6.62%	4.10%
Maltosa	1.88%	2.91%	8.58%
Sacarosa	38.48%	29.64%	26.67%
Azúcares totales	44.65%	39.18%	39.36%
Azúcares reductores	6.17%	9.53%	12.68%
Agua	35.74%	33.22%	36.26%
Sales	0.28%	0.06%	0.22%
Citrato de sodio		0.49%	1.64%
Malato de sodio	1.96%		

4.1.3.1. Diseño de experimentos

Diferentes estudios reportan que las distintas rutas metabólicas de malato para la síntesis de PMA difieren según la cepa con la que se trabaje (Liu, 1997; Cao, 2014; Wei, 2018), por lo que una vez seleccionada la cepa, es necesario revisar su funcionalidad en el rango de componentes presentes en los jarabes obtenidos mediante recuperación de la merma de confitería y analizar si es posible el incremento de la producción en base a la posible ruta metabólica que rija en ella. Por lo tanto, se propone un Diseño experimental factorial $2^n + 3$ puntos centrales para evaluar las variables de interés en el medio modelo que se enlistan a continuación:

- Relación de concentración de azúcares Dextrosa-Sacarosa
- Concentración de inhibidores (Citrato de Sodio)
- Concentración de precursores (Malato de Sodio)

Con un total de 11 experimentos, producto de la Ecuación 7:

$$Ne = 2^n + pC \quad (7)$$

Donde Ne es el número total de experimentos, n el número de factores y pC el número de puntos centrales. Como parámetros fijos se considera:

- Temperatura de incubación (25°C)
- Sin agitación
- Volumen vacío de matraz (150 mL/500 mL)
- Tiempo de incubación (10 días)
- Concentración del resto de los componentes del caldo de fermentación.

La finalidad es la obtención de altos rendimientos, que en el caso de reacciones biológicas este corresponde a la fracción de sustrato consumido para sobre el producto de interés producido. Por lo que será esta la variable de respuesta a analizar, y se calcula utilizando la Ecuación 8:

$$R = \frac{PMA}{Azúcar\ consumido} \quad (8)$$

Donde R, corresponde al rendimiento, PMA a la concentración final del políacido y Azúcar consumido a la diferencia entre la concentración inicial de azúcares totales menos la concentración final de los mismos como se expresa en la Ecuación 9:

$$Azúcar\ consumido = [AT\ inicial] - [AT\ final] \quad (9)$$

4.1.3.2. Selección de los rangos de las variables

Para fijar los rangos de las variables a evaluar, se partió de lo mencionado en la bibliografía, considerando las concentraciones que cada componente pueda presentar en un medio de fermentación a base de los jarabes obtenidos del proceso de recuperación. En la Tabla 4.4 se presentan los porcentajes de composición asumiendo una concentración de 120 g/L de azúcares totales, lo cual requiere diluir cada jarabe.

Tabla 4.4 Composición teórica para medios de fermentación a base de jarabes de recuperación.

Componente/Tipo de dulce	% Composición Final		
	Caramelo Macizo (JR)	Caramelo Macizo (CC)	Caramelo Suave (N)
Carbohidratos totales	16.67%	20.23%	18.92%
Dextrosa	1.15%	2.03%	1.25%
Maltosa	0.51%	0.89%	2.62%
Sacarosa	10.34%	9.08%	8.13%
Azúcares totales	12.00%	12.00%	12.00%
Azúcares reductores	1.66%	2.92%	3.87%
Agua	83.56%	81.23%	80.56%
Sales	0.07%	0.02%	0.07%
Citrato de sodio		0.14%	0.50%
Malato de sodio	0.50%		

La concentración de malato y citrato están por debajo de lo reportado en la literatura para estudios de los efectos de inhibidores e intermediarios del ciclo TCA en

la producción del poli ácido (Zeng, 2019), por lo que los rangos seleccionados de las variables son los que se presentan en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5 Nomenclatura y límites para las variables a evaluar en el diseño de experimentos.

Variables	Nomenclatura	Límite superior	Límite inferior
Relación Glucosa:Sacarosa*	X ₁	1:0	0:1
Concentración de Citrato de Sodio	X ₂	5 g/L	0 g/L
Concentración de Malato de Sodio	X ₃	7 g/L	0 g/L

* La concentración total de Glucosa: Sacarosa siempre corresponderá a 120 g/L, donde 1 corresponde al 100% del componente y 0 al 0% en la composición total.

El orden de la elaboración de los experimentos se llevó a cabo al azar y en la Tabla 4.6 se muestra el diseño experimental codificado.

Tabla 4.6 Diseño experimental codificado para el estudio del rendimiento de la fermentación en el medio modelo.

No de Experimento	Variable		
	X ₁	X ₂	X ₃
1	1	1	1
2	1	1	-1
3	1	-1	1
4	1	-1	-1
5	-1	1	1
6	-1	1	-1
7	-1	-1	1
8	-1	-1	-1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

La relación correspondiente de Glucosa y Sacarosa se aplicó desde el acondicionamiento en medio sólido, para la preparación del medio con sacarosa se realizó la infusión de una papa limpia y pelada.

Esta relación también se aplicó en la preparación del inóculo inicial en medio líquido y en los experimentos donde correspondía la adición de citrato y/o malato de sodio,

este se adicionó desde el inicio de la fermentación. El seguimiento de la fermentación se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.1.2.2.

4.1.4. Estudio del proceso de fermentación en el medio prueba.

Definido el comportamiento de la cepa en el medio modelo, el siguiente paso es corroborar que el medio prueba, es decir el jarabe de recuperación, permita que el microorganismo prolifere y, al aplicar el resto de las condiciones requeridas, brinde los rendimientos esperados para considerar la viabilidad del uso de estos jarabes como materia prima para el bioproceso planteado.

4.1.4.1. Aplicación del modelo de rendimiento

Una vez definido el modelo del comportamiento del rendimiento obtenido mediante la acción de la cepa estudiada en el medio prueba, se determinó el valor de la respuesta teórico en función de la composición del medio prueba usando los tres diferentes tipos de dulce.

Los valores necesarios se alimentaron al modelo, previamente utilizando las Ecuaciones 10, 11 y 12 de transformación para cada variable mostradas a continuación:

$$X_1^* = \frac{(X_1 - 0 \text{ g/L}) * 2}{120 \text{ g/L}} - 1 \quad (10)$$

$$X_2^* = \frac{(X_2 - 0 \text{ g/L}) * 2}{5 \text{ g/L}} - 1 \quad (11)$$

$$X_3^* = \frac{(X_3 - 0 \text{ g/L}) * 2}{7 \text{ g/L}} - 1 \quad (12)$$

Donde X^* corresponde al valor real de la variable en g/L y X su valor transformado según el escalamiento utilizado (1,-1).

4.1.4.2. Validación contra datos experimentales

A continuación, en función de la composición teórica de cada tipo de jarabe, se realizó la preparación de los medios de fermentación para cada clase de dulce, con la finalidad de corroborar la funcionalidad del modelo con el medio prueba. La metodología utilizada fue la misma llevada a cabo para el estudio del proceso de fermentación en el medio modelo.

La cantidad de jarabe necesario se calculó con las Ecuaciones 13 y 14:

$$\frac{m_1}{V_1} = \frac{m_2}{V_2} \quad (13)$$

$$V_2 = V_1 \frac{m_2}{m_1} \quad (14)$$

Donde m_1 es la masa de Azúcares Totales en 100 mL de jarabe, V_1 es 100 mL, m_2 la masa fijada de Azúcares Totales en el medio de fermentación (120 g/L=12 g en 100 mL) y V_2 el volumen requerido para proporcionar 12 gramos.

El volumen de jarabe requerido se modifica para la cantidad total de medio a preparar con el uso de la Ecuación 15:

$$V_j = \frac{V_2 V_T}{100} \quad (15)$$

Donde V_T es el volumen total del medio de fermentación, y V_j el volumen de jarabe requerido.

Con la finalidad de corroborar la importancia del resto de las sales añadidas para su metabolismo, se llevaron a cabo experimentos simultáneos con el tipo de dulce JR con y sin las sales añadidas. El monitoreo se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que el resto de los experimentos comparando crecimiento y rendimiento final obtenido.

4.2. EXPERIMENTO DE VALIDACIÓN A NIVEL PILOTO.

Para el cumplimiento del segundo objetivo, y en base a el jarabe que obtuvo mejores resultados, se realizó una corrida del experimento a nivel piloto utilizando un

sistema del tipo reactor de tanque agitado (batch) el cual se presenta en la Figura 4.2 y se describirá a continuación.

4.2.1. Descripción del sistema

Biorreactor

El biorreactor (Bioreactor MBF-500ME, Wheaton, Japón) consiste en un recipiente de vidrio de 5 L de capacidad enchaquetado. El recipiente tiene un diámetro interno de 15 cm y un largo de 33.5 cm. La chaqueta posee dos entradas, una en la parte inferior y otra en la parte superior. Además, el equipo cuenta con un agitador de turbina y su sistema de agitación, el cual será descrito en breve, además de un rotámetro para el control del flujo de aire.

Baño térmico y monitoreo de temperatura

Debido a que la actividad dentro del biorreactor conlleva la generación de calor, este debía ser retirado para evitar un aumento de temperatura sobre el límite máximo que el microorganismo puede resistir (30°C). De tal manera que, las fluctuaciones no fueran mayores a dos grados centígrados sobre la temperatura óptima de crecimiento (25°C). La temperatura del tanque se mantuvo con ayuda de un baño térmico (Digital Polystat PolyScience Cole-Parmer 2002).

Para el monitoreo de temperatura dentro del biorreactor, se utilizó un termómetro de varilla de vidrio y depósito de alcohol el cual se introdujo al termo-pozo del biorreactor. La temperatura se mantuvo dentro del rango establecido a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Sistema de agitación

El biorreactor cuenta con un eje de agitación conformado por 3 agitadores de turbinas tipo Rushton de diferente tamaño, distribuidos a lo largo del eje, los cuales son puestos en marcha gracias al motor incluido en el equipo principal.

El uso del sistema de agitación fue indispensable, debido a que el carbonato de calcio presente en el medio de fermentación, necesario para la bioproducción del metabolito deseado, es soluble solo en pequeñas proporciones, sin embargo, la alta

concentración de este componente no permite mantener su disolución durante todo el tiempo que dura la fermentación. Además, la agitación permite mejorar la aireación en el medio, también indispensable para el óptimo crecimiento de la biomasa.

Sistema de aireación

Se cuenta con un sistema de aireación donde el flujo de aire fue proporcionado por un compresor de aire (Husky, TAW-1524 P, China). Para asegurar la esterilidad del aire y evitar la contaminación del medio de fermentación, a la salida del rotámetro se conectó un filtro de aire, con un tamaño de poro de 0.4 μm , y mediante una manguera estéril se realizó la conexión final al distribuidor o entrada de aire al biorreactor.

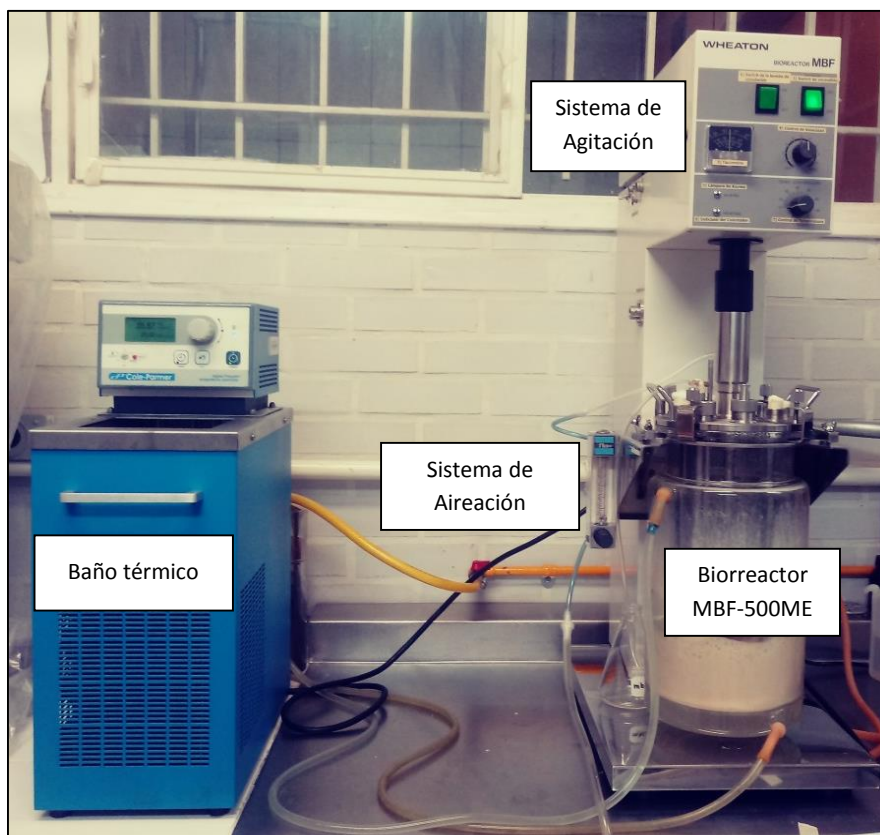


Figura 4.2 Componentes principales del sistema utilizado para la fermentación a nivel piloto.

El diagrama del sistema global se esquematiza en la Figura 4.3, identificando las partes de cada sistema descrito.

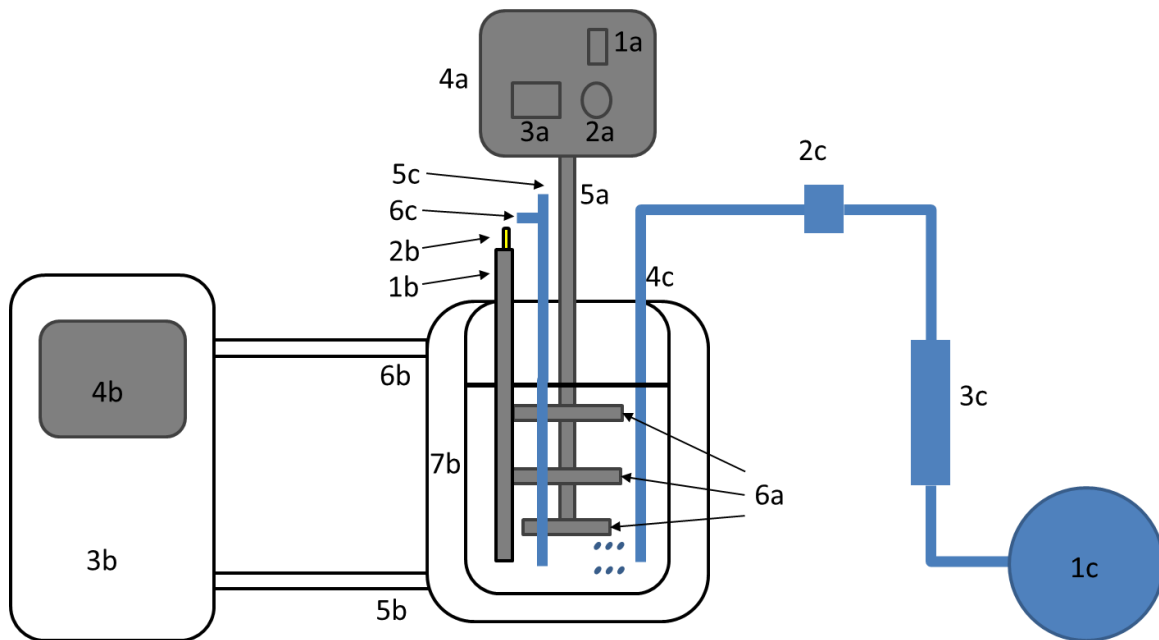


Figura 4.3 Diagrama del sistema global utilizado para la fermentación a nivel piloto.

Sistema de agitación

- 1a. Interruptor de encendido/apagado
- 2a. Intensidad de agitación
- 3a. Tacómetro
- 4a. Motor
- 5a. Eje de agitación
- 6a. Agitador de turbinas

Baño térmico y monitoreo de temperatura

- 1b. Termo-pozo
- 2b. Termómetro
- 3b. Baño térmico
- 4b. Control de temperatura (fluido de servicio)
- 5b. Entra de fluido de servicio
- 6b. Salida de fluido de servicio
- 7b. Chaqueta con fluido de servicio

Sistema de aireación

- 1c. Compresor de aire
- 2c. Filtro de aire
- 3c. Rotámetro
- 4c. Entrada de aire
- 7c. Salida de aire
- 8c. Purga de condensado

4.2.2. Parámetros de operación

Después de la esterilización por autoclave (121°C, 15 psig, 30 min). El biorreactor conteniendo el medio fue inoculado con 5% (v/v) del cultivo semilla de 24 horas.

Los parámetros de operación fueron los siguientes, basados en Wei y colaboradores (2017):

- Flujo de aireación: 3 vvm
- Temperatura: de 25°C \pm 2°C
- Velocidad de agitación: 400 RPM.

La velocidad de agitación fue modificada respecto a la literatura ya el eje de agitación presentaba fluctuaciones en velocidades superiores a 400 RPM. El volumen utilizado fue de 2 Litros, conservando la composición planteada en el resto de los experimentos, en la Tabla 4.7 se indica su composición.

Tabla 4.7 Composición del medio de fermentación utilizado para el experimento a nivel piloto

Componentes	g/L
Jarabe JR	204.04
KH ₂ PO ₄	0.10
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20
KCl	0.75
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.10
NH ₄ NO ₃	2.00
Ácido Cítrico	5.00
CaCO ₃	30.00

La cantidad de jarabe corresponde a la estandarización a una concentración de 120 g/L de azúcares totales, considerando el contenido de este componente en el jarabe de recuperación (58.81 %). El experimento conservo las condiciones indicadas durante los 10 días que duró la fermentación.

4.2.3. Seguimiento de la fermentación

A lo largo del tiempo que duro la fermentación se tomaron muestras cada 12 hrs (primeras 48 hrs), posteriormente cada 24 hrs, y se realizaron las mismas determinaciones analíticas efectuadas para los experimentos a nivel laboratorio:

- pH
- Porcentaje de Sólidos Solubles(°Brix)
- Azúcares totales (AT)
- Azúcares reductores totales (AR)
- Cuenta Total para Mohos (CT)
- Biomasa (DCW)
- Polímero obtenido por gravimetría (PMA)

La toma de muestra fue realizada asegurando la esterilidad del área con materiales estériles y recipientes a peso constante según se requirió. Para el posterior tratamiento de la muestra el volumen tomado fue de 40 mL repartido en 2 recipientes. Cada muestra fue tomada por duplicado, es decir cada muestreo represento 80 mL de medio de fermentación. Todas las pruebas fueron realizadas por duplicado. La temperatura y pH fueron monitoreados cada 8 y 12 horas respectivamente, para asegurar el cumplimiento de los rangos de operación planteados.

4.3. MODELADO MATEMÁTICO

Para el ajuste de los datos a los modelos planteados, se utilizaron los softwares Polymath Educational Versión 6.0, y Microsoft Excel 2019.

En el primero se empleó el módulo de Nonlinear Regression, el cual utiliza el Algoritmo de Levenberg-Marquardt (LM), también conocido como método de mínimos cuadrados amortiguados, para el ajuste de la curva.

Por otro lado, el ajuste al modelo correspondiente con el uso de Microsoft Excel, se llevó a cabo con el complemento SOLVER, utilizando el método de solución GRG

NONLINEAR. Los métodos generalizados de gradiente reducido (GRG por sus siglas en inglés) son algoritmos para resolver ecuaciones no lineales y son una generalización del método de gradiente reducido al permitir restricciones no lineales y límites arbitrarios en las variables.

Como objetivo para la activación del SOLVER, se definió el mínimo de la suma de los residuales al cuadrado.

Una vez arrojados los valores de los parámetros que permitirían encontrar el objetivo planteado con el uso de ambos software, se realizó al cálculo de los siguientes parámetros estadísticos:

- MSE (Error cuadrado medio)
- R^2 (coeficiente de determinación)
- R^2_{adj} (coeficiente de determinación ajustado)

Una vez obtenido el ajuste de los datos a cada modelo planteado, se procedió a la validación de cada uno y a la selección de aquel con los valores de R^2 , R^2_{adj} mayores y MSE menores.

4.3.1. Cinéticas de crecimiento microbiano

Una vez terminados los experimentos, se procedió con el análisis de los datos con la finalidad de obtener un modelo cinético que mejor se ajustará a los datos obtenidos.

Para el crecimiento microbiano se consideraron los siguientes modelos teóricos encontrados en la bibliografía:

- Ecuación Logística.
- Función de Gompertz.
- Modelo de Baranyi y Roberts

4.3.1.1. Ecuación Logística.

Esta ecuación, describe el comportamiento de la biomasa en distintos procesos de fermentación, se representa mediante la Ecuación 16.

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \left(1 - \frac{N}{N_{max}} \right) \quad (16)$$

Donde N_{max} hace referencia a la máxima densidad microbiana en el proceso fermentativo, μ es la tasa de crecimiento específica (h^{-1}) y N la densidad microbiana (UFC/mL). (Cordon, 2016)

Al integrar la Ecuación 16 en las condiciones de frontera $N=N_0$ y $t=t_0=0$, se obtiene la Ecuación 17, correspondiente al crecimiento de biomasa en función del tiempo.

$$N = \frac{N_0 N_{max} e^{\mu t}}{N_{max} - X_0 + X_0 e^{\mu t}} \quad (17)$$

La forma de la ecuación utilizada para la elaboración de este trabajo (Zwietering, 1990) se presenta en la Ecuación 18:

$$y(t) = + \frac{y_{max} - y_0}{1 + \exp\left(\frac{4\mu_{max}(\lambda - t)}{y_{max} - y_0} + 2\right)} \quad (18)$$

Donde $y(t) = \ln N(t)$, siendo $N(t)$ la densidad microbiana (UFC/mL) al tiempo t ; $y_0 = \ln N_0$, siendo N_0 el valor asintótico inferior y aproximadamente igual a la densidad microbiana inicial (UFC/mL); $y_{max} = \ln N_{max}$, siendo N_{max} el valor asintótico superior y aproximadamente igual a la máxima densidad microbiana (UFC/mL); μ_{max} = máxima velocidad específica de crecimiento ($tiempo^{-1}$); λ = tiempo de latencia (tiempo).

4.3.1.2. Función de Gompertz.

La función de Gompertz es un tipo de modelo matemático para una serie temporal. Describe el crecimiento en una función sigmoidea, como más lento al comienzo y al final de un período de tiempo dado.

El modelo de Gompertz fue desarrollado inicialmente para describir los procesos de mortalidad en poblaciones humanas (Garre, 2016). La asíntota de la función hacia

la derecha o el valor futuro de la función se aproxima de manera mucho más gradual por la curva que la asíntota de la mano izquierda o de valor inferior. Esto contrasta con la función logística simple en la que ambas asíntotas se acercan simétricamente a la curva. Es un caso especial de la función logística generalizada.

Posteriormente, se ha modificado para que se aplique en otras áreas, por lo que se desarrolló como un modelo cinético capaz de describir la concentración de biomasa a lo largo del tiempo. (Solano, 2017) Este modelo es descrito mediante la Ecuación 19.

$$y(t) = A + C e^{-e^{-B(t-M)}} \quad (19)$$

Donde $y(t) = \ln N(t)$, siendo $N(t)$ la densidad microbiana (UFC/mL); C , M y B corresponden a recuentos microbianos cuando el tiempo crece indefinidamente (\ln UFC/mL), tiempo para alcanzar la tasa de crecimiento específica máxima (h) y la velocidad de crecimiento relativo (\ln UFC/mL/h) y finalmente A que corresponde aproximadamente al $\ln N(t_0)$ densidad microbiana inicial. Variables que, a su vez representan expresiones matemáticas que permiten encontrar parámetros cinéticos de interés, como se muestra en las Ecuaciones 20, 21 y 22.

Expresión matemática para obtener tasa de crecimiento específica.

$$\mu_{max} = \frac{BC}{e} \quad (20)$$

Expresión matemática para obtener la duración de la fase de latencia.

$$\lambda = \frac{M - 1}{B} \quad (21)$$

Expresión matemática para obtener la máxima densidad de población microbiana.

$$y_{max} = A + C \quad (22)$$

4.3.1.3. Modelo de Baranyi y Roberts

El modelo propuesto por Baranyi y Roberts (1994), representado en la Ecuación 23, describe el crecimiento como una cinética de primer orden de relación $\mu(t)$, que varía en función de las condiciones ambientales y según la fase en que se encuentre la población. Durante la fase exponencial este coeficiente es igual a μ_{max} mientras que durante las fases de latencia y estacionaria se reduce por medio de los coeficientes $\alpha(t)$ y $\gamma(t)$, ambos comprendidos entre cero y uno.

$$\frac{dN}{dt} = \alpha(t) \cdot \mu_{max} \cdot \gamma(t) \cdot N(t) \quad (23)$$

N indica la densidad microbiana a tiempo t . En este modelo se describe la fase de adaptación asumiendo que existe una sustancia ficticia $P(t)$ que hace de cuello de botella. El crecimiento de esta sustancia sigue una cinética de Michaelis-Menten, lo que se ve reflejado en el parámetro $\alpha(t)$ tal y como define la Ecuación 24.

$$\alpha(t) = \frac{P(t)}{K_p + P(t)} = \frac{P(t)/K_p}{1 + P(t)/K_p} = \frac{Q(t)}{1 + Q(t)} \quad (24)$$

La variable $Q(t)=P(t)/K_p$, sin significado microbiológico, caracteriza el estado fisiológico de la célula. Esta variable crece exponencialmente a lo largo del experimento con tasa v , tal y como se describe en la Ecuación 25. Usualmente se considera que $v = \mu_{max}$ para reducir la complejidad del modelo.

$$\frac{dQ}{dt} = v \cdot Q(t) \quad (25)$$

La fase estacionaria se modela a través del parámetro $\gamma(t)$, que introduce una regulación interna de la población de manera que no puede exceder un valor determinado (N_{max}), tal y como se muestra en la Ecuación 26

$$\gamma(t) = \left(1 - \frac{N(t)}{N_{max}}\right)^m \quad (26)$$

El parámetro m define la suavidad de la transición entre la fase exponencial y la estacionaria. Este parámetro se suele considerar igual a la unidad. La forma de la ecuación utilizada para la elaboración de este trabajo (Baranyi, 1994) se presenta a continuación en la Ecuación 27:

$$y(t) = y_{max} + \ln \left(\frac{(-1 + \exp(\mu_{max} \cdot \lambda) + \exp(\mu_{max} \cdot t))}{-1 + \exp(\mu_{max} \cdot t) + \exp(\mu_{max} \cdot \lambda + y_{max} - y_0)} \right) \quad (27)$$

Donde $y(t) = \ln N(t)$, siendo $N(t)$ la densidad microbiana (UFC/mL) al tiempo t ; $y_0 = \ln N_0$, siendo N_0 el valor asintótico inferior y aproximadamente igual a la densidad microbiana inicial (UFC/mL); $y_{max} = \ln N_{max}$, siendo N_{max} el valor asintótico superior y aproximadamente igual a la máxima densidad microbiana (UFC/mL); μ_{max} = máxima velocidad específica de crecimiento (tiempo⁻¹); λ = tiempo de latencia (tiempo).

4.3.2. Cinéticas de producción de PMA

Para el ajuste de los datos de producción del polímero se consideraron los siguientes modelos teóricos encontrados en la bibliografía:

- Función de Gompertz.
- Ecuación de Özilgen
- Ecuación de Peleg

4.3.2.1. Función de Gompertz

Esta función ha sido utilizada para describir el comportamiento o evolución de los productos sintetizados mediante bioprocesos, es el caso del ácido láctico (Solano, 2017), de donde se toma para la aplicación a la producción de PMA en este trabajo de investigación. Esta función se describe con mayor detalle en la sección 5.3.1.2 y se representa mediante la Ecuación 28:

$$C(t) = A + C e^{-e^{-B(t-M)}} \quad (28)$$

Donde $C(t)$ es la concentración de PMA al tiempo t (g/mL); t es el Tiempo (h); A , B , C y M son parámetros de la ecuación.

4.3.2.2. Ecuación de Özilgen

Inicialmente desarrollada como una variante de la ecuación logística para simular la oxidación de lípidos en sistemas alimentarios, fue desarrollada originalmente por Özilgen en 1990, sin embargo, su uso se ha extendido a explicar la evolución de la producción de algunos metabolitos producto de fermentación, como el ácido láctico (Solano, 2017).

En la Ecuación 29 se muestra la forma utilizada para el ajuste de los datos de producción de PMA:

$$C(t) = \frac{C_0 e^{kt}}{1 - \frac{C_0}{C_{max}} (1 - e^{kt})} \quad (29)$$

Donde $C(t)$ es la concentración de PMA al tiempo t (g/mL); t es el Tiempo (h); C_0 es la concentración inicial de PMA (g/mL); C_{max} es la concentración máxima alcanza de PMA (g/mL) y k es la constante del modelo.

4.3.2.3. Ecuación de Peleg

La ecuación de Peleg (1997) ha sido utilizada para describir el secado e hidratación de alimentos (Puscaselu, 2018), y otras aplicaciones respecto a la absorción de agua. Originalmente consiste en un modelo empírico, que al ampliar sus aplicaciones hacia el modelamiento de crecimiento microbiano (Peleg, 1997) se familiariza con una versión modificada de la ecuación logística.

En la Ecuación 30 se presenta la utilizada para el ajuste en la producción de ácido láctico (Solano, 2017) que ha sido retomada en este trabajo de investigación:

$$C(t) = k_1 t^{n_1} + k_2 t^{n_2} \quad (30)$$

Donde $C(t)$ es la concentración de PMA al tiempo t (g/mL); t es el Tiempo (h); k_1 , k_2 , n_1 y n_2 son parámetros del modelo.

4.3.3. Cinética de producción de biomasa

Debido a los resultados obtenidos respecto a las cinéticas de crecimiento y de producción de PMA, se optó por ajustar los datos de producción de biomasa solo utilizando el modelo de Gompertz, ya descrito, en este caso las variables y ecuación quedan como se describe en la Ecuación 31.

$$C(t) = C_0 + C e^{-e^{-B(t-M)}} \quad (31)$$

Donde $C(t)$ es la concentración de biomasa al tiempo t (g/mL); t es el Tiempo (h); C_0 es la concentración inicial de biomasa, B , C y M son parámetros de la ecuación.

4.3.4. Validación de modelos cinéticos

Dada la existencia de diferentes modelos, se hace necesario comparar el comportamiento de los mismos a fin de seleccionar el que asegure mejores resultados para un conjunto determinado de datos. La validación de los modelos es uno de los pasos necesarios para realizar esta comparación, siendo de gran importancia en este tipo de investigaciones (Sargent, 2000).

En la actualidad, no hay un criterio publicado y aceptado internacionalmente que pueda establecer cuándo un modelo es válido, es decir, cuando su aplicación es precisa y cuyos resultados pueden inferirse al mundo real, y cuando no (Buchanan, 1997; Giffel, 1999).

Tradicionalmente, se utilizan parámetros estadísticos como el coeficiente de determinación o la MSE (mean square error) para evaluar la validez del modelo (Ross, 1996; McClure et al. 1994). A continuación, se describen los parámetros estadísticos que se emplearon en esta parte del trabajo de investigación:

Error cuadrado medio de regresión (MSE)

Se trata de una medida de la variabilidad que no se debe a cambios en los factores extrínsecos (Giffel, 1999), sino a la variabilidad inherente a la biología o a

errores sistemáticos. Así, cuanto menor sea el valor de la MSE, mayor es la adecuación del modelo y sus resultados (Sutherland, 1994; Giffel, 1999).

Se calcula sumando los cuadrados de los errores y dividiendo entre el número total de datos, representado en la Ecuación 32, indicando la diferencia entre los valores estimados y los reales u observados (Buchanan, 1997).

$$MSE = \left(\frac{\sum (y_i - f_i)^2}{n_t} \right) \quad (32)$$

Donde y_i , f_i y n_t corresponden a los datos experimentales obtenidos, datos calculados con el modelo y número total de datos, respectivamente.

Coefficiente de determinación (R^2)

Esta medida indica el ajuste de los datos obtenidos a un modelo lineal; es decir, nos informa sobre qué cantidad de la variabilidad observada se debe al ajuste lineal de los datos en el modelo (Giffel, 1999). Por lo que, cuanto más cercano a la unidad sea el valor de este estadístico, mejor será la predicción del modelo (Grau, 1993; Duffy, 1994; Sutherland, 1994; Giffel, 1999). Se representa en la Ecuación 33.

$$R^2 = 1 - \frac{MSE}{MST} \quad (33)$$

Donde R^2 corresponde al coeficiente de determinación, MSE es el error cuadrado medio de regresión y MST es el error cuadrado medio total.

Coefficiente de determinación ajustado (R^2_{adj})

De mayor uso en la regresión múltiple, el R cuadrado ajustado (o coeficiente de determinación ajustado) expresado en la Ecuación 34, se utiliza para ver el grado de intensidad o efectividad que tienen las variables independientes en explicar la variable dependiente. Es decir, indica que porcentaje de variación de la variable dependiente es explicado colectivamente por todas las variables independientes. (Martínez, 2005)

$$R^2_{adj} = 1 - \left[\left(\frac{o - 1}{GL} \right) * (1 - R^2) \right] \quad (34)$$

Donde R^2_{adj} corresponde al coeficiente de determinación ajustado, R^2 corresponde al coeficiente de determinación, o es el número de datos y GL es el número de grados de libertad en el modelo.

5. RESULTADOS

5.1. ESTANDARIZACIÓN A NIVEL LABORATORIO

Como se describió en la sección anterior, la composición del medio de fermentación interviene en el comportamiento del microorganismo, por lo que antes de realizar pruebas con el medio prueba, es decir con los jarabes de recuperación de la merma de confitería, se realizó su caracterización fisicoquímica. Principalmente, la composición de azúcares, así como su contenido en malato y citrato de sodio.

5.1.1. Caracterización fisicoquímica del medio de fermentación

Al visualizar los promedios obtenidos con su respectiva desviación estándar, se puede determinar mediante la Tabla 5.1, que la única diferencia significativa se encuentra en los valores de azúcares reductores y pH. Los primeros están directamente relacionados con la distribución del tipo de carbohidratos presentes en el jarabe. Por otro lado, el pH puede indicar diferencias importantes entre la presencia de las sales de sodio.

Tabla 5.1 Valor promedio de los parámetros fisicoquímicos evaluados en cada jarabe obtenidos del proceso de recuperación.

TIPO DE DULCE	Sólidos Totales Disueltos (°BRIX)	Azúcares Reductores (%)	Azúcares Reductores Totales (%)	pH
CC	66.24 ± 2.11	11.67 ± 1.39	49.46 ± 5.51	5.98 ± 0.16
JR	65.48 ± 1.60	11.00 ± 2.39	48.03 ± 2.75	6.10 ± 0.18
N	66.24 ± 2.11	15.33 ± 1.96	50.84 ± 7.51	7.48 ± 0.48

Utilizando los valores obtenidos experimentalmente, el resto de los componentes de los medios fueron calculados, considerando el balance de masa del proceso de obtención. Los resultados se presentan en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2 Composición de los jarabes obtenidos del proceso de recuperación en base a los parámetros experimentales promedio.

Componente/Tipo de Jarabe	% Composición Final		
	JR	CC	N
Carbohidratos totales	63.20	65.70	64.32
Dextrosa	7.63	8.11	4.96
Maltosa	3.35	3.56	10.37
Sacarosa	37.03*	37.79*	35.51*
Azúcares totales	48.03*	49.46*	50.84*
Azúcares reductores	11.00*	11.67*	15.33*
Agua	34.52*	33.76*	33.76*
Sales	2.28	0.54	1.92
Citrato de sodio		0.49	1.70
Malato de sodio	2.00		

Experimentalmente se pueden cuantificar, directa o indirectamente, sólo los valores marcados con un asterisco (*). El resto de los constituyentes fueron calculados en base a los balances de materia del proceso de recuperación (Maldonado, 2020). En general, los tres tipos de jarabes que pueden emplearse para la fermentación presentaron un contenido de sacarosa entre 35-38%. Sin embargo, el rango del porcentaje de glucosa anhidra (dextrosa) es más amplio, yendo de un 4 a un 9 %. Considerando la totalidad de azúcares reductores, es decir maltosa y glucosa, las mezclas están constituidas por entre 11 y 16%. Los valores experimentales muestran ligeras diferencias respecto a los valores teóricos presentados.

Cabe señalar que, aunque existen ligeras variaciones en la composición de carbohidratos, esta no es significativa para provocar diferencias importantes en el crecimiento del microorganismo. No obstante, si es apreciable una diferencia en la presencia de las sales de ácidos orgánicos, donde el jarabe JR es el único que contiene malato (2%), mientras que los jarabes CC y N solo contiene citrato de sodio, 0.49 y 1.7 % respectivamente. Además, es importante recalcar que el jarabe CC en ocasiones puede obtenerse con cierto porcentaje de ácido málico.

En la Tabla 5.3, se muestra la concentración de los diferentes componentes cuando se obtiene un medio de cultivo al 120 g/L de azúcares totales, para lo cual se

requieren teóricamente 24.98 g del jarabe JR, 24.26 g del jarabe CC y 23.60 g del jarabe N.

Tabla 5.3 Composición teórica de los medios de cultivo para la fermentación en medio prueba.

Componente/Tipo de dulce	% Composición Final		
	Caramelo Macizo (JR)	Caramelo Macizo (CC)	Caramelo Suave (N)
Carbohidratos totales	15.79	15.94	15.18
Dextrosa	1.91	1.97	1.17
Maltosa	0.84	0.86	2.45
Sacarosa	9.25	9.17	8.38
Azúcares totales	12.00	12.00	12.00
Azúcares reductores	2.75	2.83	3.62
Agua	83.64	83.93	84.37
Sales	0.57	0.13	0.45
Citrato de sodio		0.12	0.40
Malato de sodio	0.50		

La concentración más relevante es la de 12 g/L de citrato de sodio en el medio preparado con el jarabe CC, la cual sobrepasa la concentración utilizada en el diseño de experimentos. Asimismo, la diferencia importante entre el perfil de azúcares, donde el medio preparado con el jarabe N contiene mayor proporción de maltosa, elevando de esta manera su contenido de azúcares reductores.

La presencia de las sales estudiadas puede tener un efecto significativo en el crecimiento y la productividad del cultivo. Por lo que mediante los resultados que arrojen el diseño experimental planteado, se pretende determinar el efecto de cada variable sobre el comportamiento del microorganismo que afecte la productividad y los rendimientos del producto deseado.

5.1.2. Selección de la cepa

Morfología y descripción del crecimiento

Las cepas estudiadas cuentan con diferencias visibles en su morfología y en las características necesarias para su crecimiento. A manera de resumen en la Tabla 5.4 se enuncian las más sobresalientes.

Tabla 5.4 Morfología y descripción del crecimiento de las dos cepas utilizadas en la fermentación.

Cepa	Morfología en APD	Crecimiento en APD
<i>FM 986</i> , Facultad de Medicina UNAM, octubre 2018	<p>Terminaciones Aracnoides, coloración negra-verde oliva (anverso), blanco (reverso).</p> <p>Colonias Opacas/Mate, aspecto seco. Ausencia de pigmento difusible</p>	<p>Coloración aparece en las primeras 24 horas de crecimiento. Tiempo aproximado para observar colonias mayores a 1 mm: 24 h.</p> <p>Temperatura optima de crecimiento 30°C</p>
<i>Aureobasidium spp</i> , Laboratorio Micología, FCQ, UASLP, octubre 2018	<p>Colonias cremosas, coloración crema-blanco (anverso y reverso) en los primeros 5-8 días de crecimiento, posteriormente algunas colonias pueden presentar producción de melanina.</p> <p>Colonias brillantes, aspecto húmedo. Ausencia de pigmento difusible</p>	<p>Coloración negra-verde oliva aparece cuando se encuentra a T° menores de 20 °C.</p> <p>Tiempo aproximado para observar colonias mayores a 1 mm: 72 h.</p> <p>Temperatura de crecimiento 25°C</p>

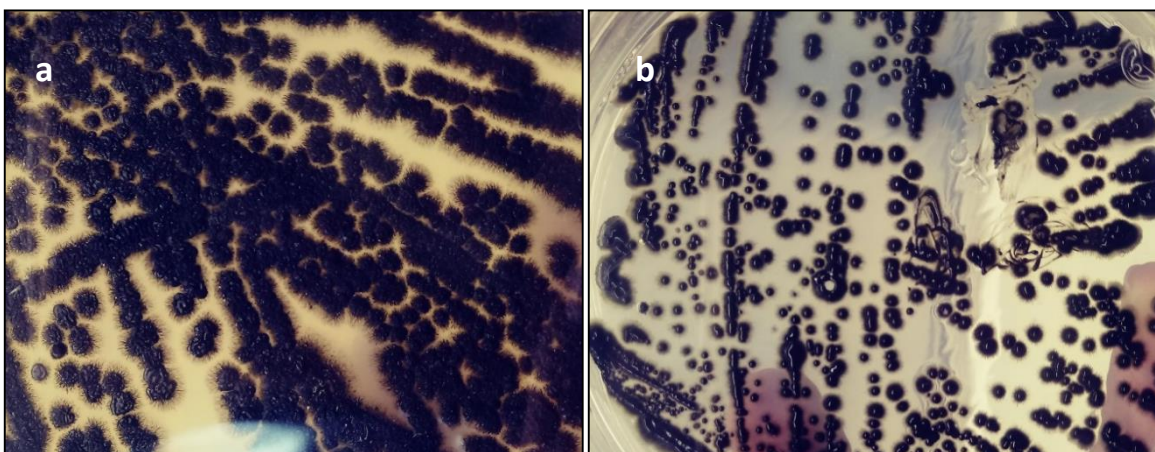


Figura 5.1a y 5.1b. Cultivos de *Aureobasidium melanogenum* (a) y *Aureobasidium pullulans* (b) en Agar Papa Dextrosa por 10 días a 25 °C, seguido de 2 días en refrigeración (4 - 7°C).

Como puede observarse en la Figura 5.1a y 5.1b, *Aureobasidium melanogenum* presenta una coloración homogénea del cultivo, un aspecto seco de las colonias y terminaciones aracnoides, mientras que para *Aureobasidium pullulans* la consistencia de las colonias es evidentemente cremosa, y las terminación más redondas y sólo un poco aracnoides.

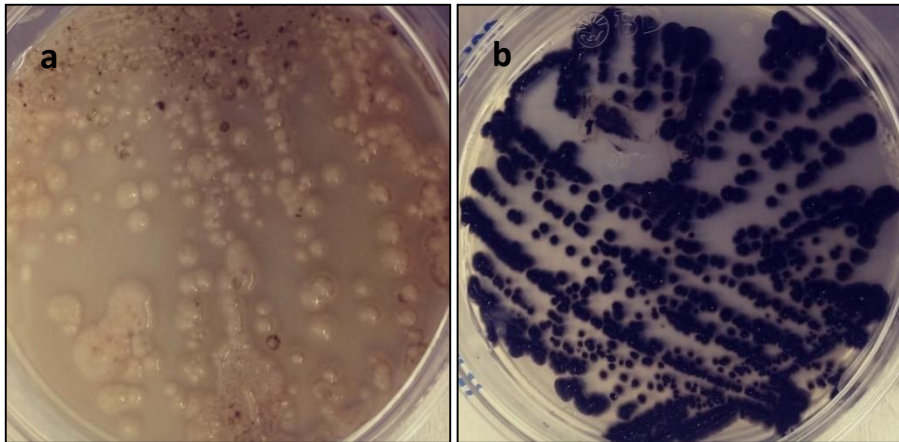


Figura 5.2a y 5.2b. Cultivos de *Aureobasidium pullulans* en Agar Papa Dextrosa, (a) después de 5 días a 25 °C, (b) después de 10 días a 25 °C y 2 días en refrigeración (4 - 7°C).

En las Figuras 5.2a y 5.2b se aprecia el cambio de coloración en los cultivos de *Aureobasidium pullulans*, lo que implica que la generación de melanina, el pigmento que lo colorea, no se activa hasta varios días de incubación y/o a temperaturas de refrigeración. No obstante, este pigmento no representa inconveniente ya que no es excretado al medio.

La diferencia entre las temperaturas de crecimiento, que se indican en la Tabla 5.4, resulta interesante desde el punto de vista energético. En efecto, para mantener un proceso a 25°C se requeriría un enfriamiento considerable en temporadas calurosas, cuando las reacciones que generan calor se estén llevando a cabo. Por el contrario, elevar el proceso a 30°C, requeriría un consumo de energía. Sin embargo, la temperatura podría mantenerse, sin necesidad de energía externa, una vez que inicien las reacciones exotérmicas propias del metabolismo de la biomasa.

Seguimiento de la fermentación

Para determinar los pros y contras de cada cepa, se analizaron los resultados de corridas preliminares, con la finalidad de encontrar diferencias significativas que permitieran seleccionar la cepa que otorgará mejores rendimientos.

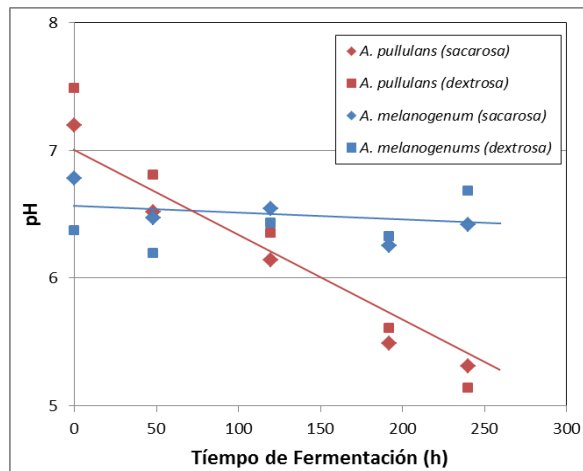


Figura 5.3 Evolución de pH del medio de Fermentación utilizando las dos cepas de *Aureobasidium* evaluadas.

En la Figura 5.3 se aprecia la evolución del pH para un medio de fermentación 120 g/L de sacarosa y 120 g/L de dextrosa, para *A. pullulans* y *A. melanogenum*, observándose un comportamiento similar en cada cepa respecto a ambos azúcares. Se observa que, la pendiente en el caso de *A. pullulans*, que es negativa, es más significativa que para cualquiera de los casos de *A. melanogenum*.

El comportamiento del pH es un indicio relevante respecto a la producción de metabolitos, y por ende significativo para evaluar el metabolismo de ambas cepas. *A. pullulans* al tener una pendiente más pronunciada puede indicar que tiende a una mayor producción y excreción de sustancias al medio de fermentación, al contrario de *A. melanogenum*. Estos metabolitos pueden presentar ventajas o desventajas para la producción del polímero de interés, ya que la acidez del medio puede provocar la hidrólisis de las cadenas.

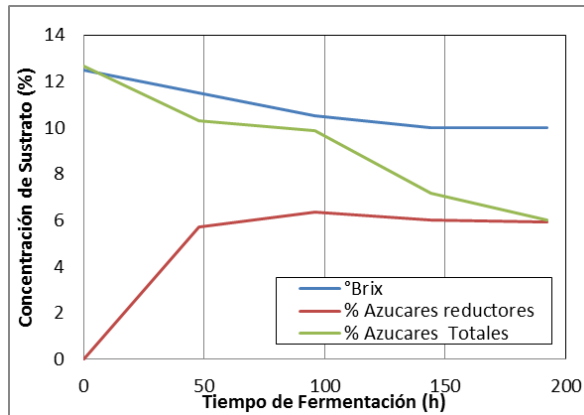


Figura 5.4 Consumo de sustrato durante la fermentación por *Aureobasidium melanogenum* en un medio de sacarosa.

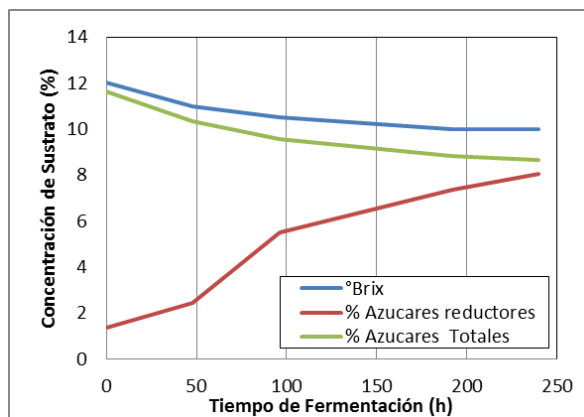


Figura 5.5 Consumo de sustrato durante la fermentación por *Aureobasidium pullulans* en un medio de sacarosa.

Se obtuvieron las gráficas de consumo de sustrato en 3 variables, °Brix o sólidos solubles totales, azúcares reductores y azúcares totales. Las Figuras 5.4 y 5.5 presentan los resultados para la fermentación de un medio con sacarosa, para ambas cepas.

Se puede observar que a medida que el moho comienza a crecer, hay una disminución en el contenido de azúcares totales, pero un incremento en reductores, recordando que la sacarosa no es un azúcar reductor. Esto implica que, a lo largo del proceso de fermentación, hay un subproceso de inversión de sacarosa, obteniendo fructosa y glucosa que incrementa el valor de azúcares reductores. El decremento de

los sólidos solubles totales representa el consumo para el metabolismo del microorganismo, incluido su crecimiento y la producción del metabolito deseado. Se aprecia una estabilización en el valor de esta variable, lo que puede atribuirse al resto de sustancias solubles que el propio microorganismo está desechando en el medio, incluido el poliácido málico.

La concentración de sustrato está directamente relacionada con la curva de crecimiento. Por ello, la Figura 5.6 presenta la curva de crecimiento microbiano para *Aureobasidium melanogenum* en un medio de sacarosa y en la Figura 5.7 la correspondiente para *Aureobasidium pullulans*, también en un medio con sacarosa.

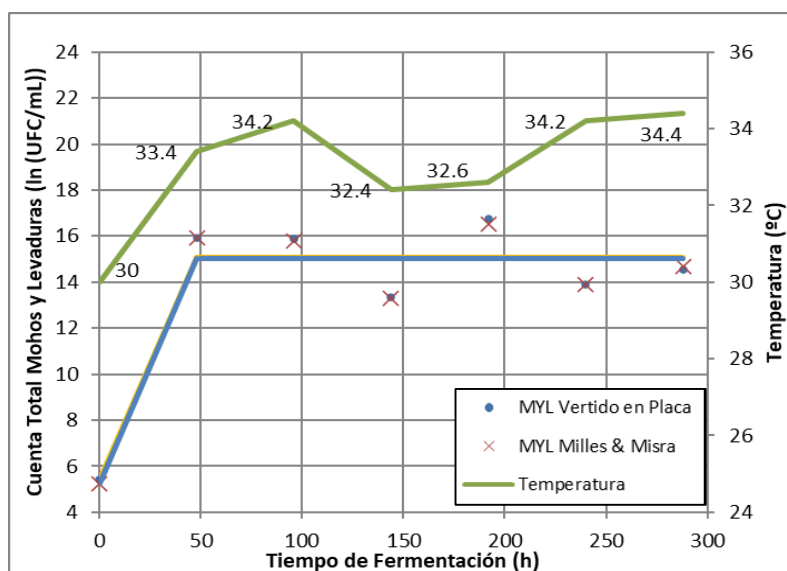


Figura 5.6 Curva de crecimiento microbiano para *Aureobasidium melanogenum* en medio de sacarosa a 30-35 °C.

En la Figura 5.6, además se presentan los resultados conforme a las dos técnicas de conteo planteadas en la metodología. Se observa que los resultados arrojan una sola curva de crecimiento, mostrada como una línea azul. Esto justifica el uso de la técnica Milles & Misra, para conteo total de mohos en MYL en este trabajo de investigación. Esta técnica implica un ahorro en tiempo de análisis, así como la disminución de consumo de medios y energía.

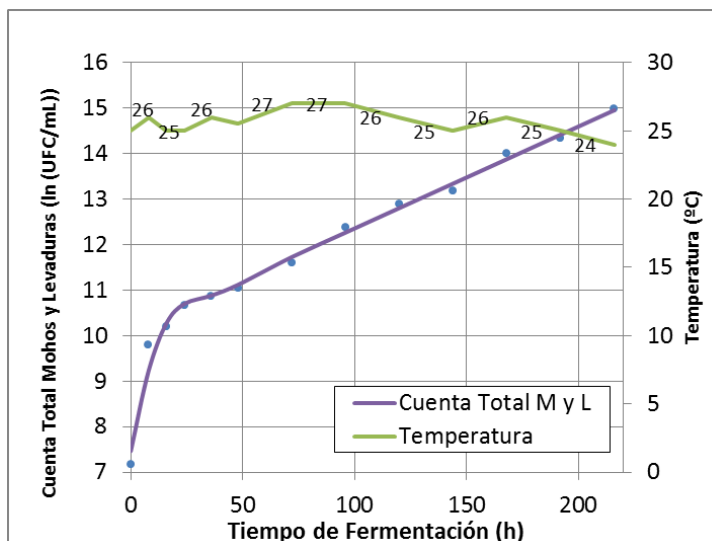


Figura 5.7 Curva de crecimiento microbiano para *Aureobasidium pullulans* en medio de sacarosa a 25-28 °C.

Tanto en la Figura 5.6 como en la Figura 5.7, se muestran las gráficas correspondientes al comportamiento de la temperatura, ya que esta influye considerablemente en la dispersión de los valores, esto incluye el calor generado por la fermentación que puede incrementar la temperatura ambiente.

Las cuentas totales fueron visiblemente más altas para *A. melanogenum*. No obstante, la fase exponencial dura aproximadamente 48 horas. En cambio, para *A. pullulans*, se observa un cambio de pendiente importante, pero no el característico hacia la fase estacionaria alrededor de las 24 y 48 horas. Esto implica que la biomasa esperada en la fermentación con la utilización de *A. melanogenum* sea considerablemente mayor. Es decir, esta cepa está consumiendo el sustrato preferentemente para producir la energía necesaria para su crecimiento. Esto no implica un beneficio, ya que el interés principal es la conversión del sustrato al producto deseado y no el aumento de la población microbiana.

En la Figura 5.8, se presenta la producción de PMA en función de la biomasa generada, en el proceso de fermentación realizado con *A. melanogenum*. Se observan las pendientes de las rectas de ajuste muy cercanas para la producción del metabolito y la biomasa (0.0309, 0.0326), siendo ligeramente mayor para la biomasa cuantificada.

Esto implica que el microorganismo está reproduciéndose más eficientemente. De hecho, del sustrato consumido poco es dirigido hacia la producción del polímero buscado.

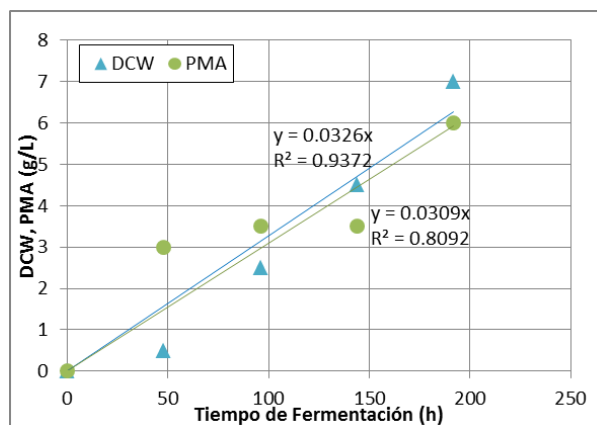


Figura 5.8 Generación de Biomasa y poliácido málico en la fermentación de sacarosa por *Aureobasidium melanogenum*.

Por otro lado, en la fermentación realizada con *A. pullulans*, representada en la Figura 5.9, las pendientes de ajuste son significativamente diferentes entre sí, 0.0462 para la producción de PMA y 0.0069 para la generación de biomasa. Comparado con la fermentación con *A. melanogenum*, la pendiente es mayor para la producción del polímero y menor para la generación de biomasa.

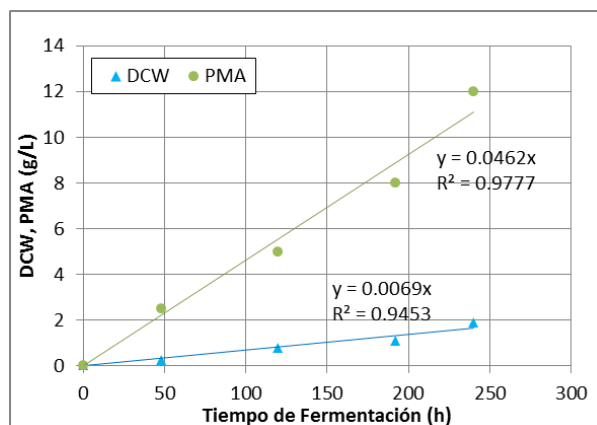


Figura 5.9 Generación de biomasa y poliácido málico en la fermentación de sacarosa por *Aureobasidium pullulans*.

Esto último se corroboró también con las cuentas microbianas, que fueron considerablemente menores para *Aureobasidium pullulans* (12 ciclos logarítmicos), comparado con *A. melanogenum* (18 ciclos logarítmicos). Una pendiente mayor para la generación del producto es una ventaja para una cepa, ya que representa que el consumo de sustrato está orientado a la producción del metabolito y no sólo al crecimiento del microorganismo. Esto redundó en producciones mayores del polímero durante la fermentación, *A. melanogenum* produjo 6 g/L comparado con 8 g/L de *Aureobasidium pullulans* en $t=192$ h. Además, se obtienen menores consumos de sustrato para la segunda cepa, lo que implica rendimientos de 0.4 g/g sustrato contra 0.24 g/g sustrato, respectivamente. Además de que el crecimiento para *Aureobasidium pullulans* requiere menores temperaturas, se selecciona esta cepa principalmente debido a la obtención de mayores rendimientos.

5.1.3. Estudio del proceso de fermentación en el medio modelo

Análisis Estadístico y modelo para rendimiento

Para el análisis estadístico se utilizó el software Modde Versión 7.0 Umetrics. En la Tabla 5.5 se muestran los valores obtenidos para la variable de respuesta correspondiente a los 11 experimentos, los cuales fueron realizados por duplicado.

Tabla 5.5 Resultados de los experimentos correspondientes al DOE para Rendimiento de la fermentación en el medio modelo

No de Experimento	ID	Rendimiento promedio	Desviación estándar
1	P03S2	0.31	0.08
2	P11S2	0.26	0.04
3	P07S2	0.34	0.04
4	P02S2	0.33	0.11
5	P10S2	0.23	0.05
6	P08S2	0.23	0.01
7	P09S2	0.31	0.02
8	P06S2	0.37	0.00
9	P05S2	0.28	0.02
10	P04S2	0.26	0.06
11	P01S2	0.29	0.07

El modelo planteado se presenta en la Ecuación 35:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_4x_1x_2 + \beta_5x_1x_3 + \beta_6x_2x_3 \quad (35)$$

Con un total de 11 experimentos realizados y mediante el análisis estadístico (ANOVA) del rendimiento como variable de respuesta, se muestran los resultados en la Tabla 5.6, donde se destaca en primera instancia el valor p de la regresión igual a 0.009, el cual es menor al valor de la significancia ($\alpha=0.05$) a un valor de intervalo de confianza de 95%, por lo que indica que la regresión es válida para el modelo propuesto. Además, el valor de $R^2=0.96$ y R^2 ajustada de 0.9, indican que el modelo representa adecuadamente el comportamiento de la variable de respuesta en función de los parámetros seleccionados. La prueba de falta de ajuste, que verifica la calidad de ajuste del modelo y ayuda a evaluar si el orden del modelo es el correcto, no presenta significancia estadística relevante por lo tanto es posible aseverar que el modelo podrá predecir de manera adecuada la variable de respuesta.

Tabla 5.6 Resultados del ANOVA correspondiente al análisis del DOE para Rendimiento de la fermentación por *A. pullulans*.

Rendimiento	DF	SS	MS (VARIANCE)	F	P	SD
Total	11	0.9461	0.086			
Constante	1	0.9251	0.925			
Total	10	0.0210	0.002			0.046
Regresión	6	0.0202	0.003	15.80	0.009	0.058
Residual	4	0.0009	2.13E-04			0.015
Falta de ajuste	2	0.0008	3.92E-04	11.75	0.078	0.020
Error del Modelo						
Error Puro	2	6.67E-05	3.33E-05			0.006
NF= 11		Q²= 0.495		Cond. no.= 1.1726		
DF= 4		R²= 0.960		Y-miss= 0		
		R² Adj.= 0.899		RSD= 0.0146		

También, como resultado del estudio estadístico se analizó la significancia de los parámetros del modelo. La Tabla 5.7 presenta el valor de cada parámetro, así como su significancia ($\alpha=0.05$), indicando que los parámetros correspondientes a los

factores x_3 (concentración de malato de sodio) y la interacción x_3 con x_2 (concentración con citrato de sodio), no tienen efecto estadísticamente significativo sobre el comportamiento del rendimiento.

Tabla 5.7 Coeficientes de la ecuación del comportamiento para el rendimiento de la fermentación en el medio modelo.

Factor	Coefficiente	Error Estándar	P	Intervalo(+/-)
Constante	29.00	0.0044	3.16E-07	0.0122
x_1	1.50	0.0052	0.044	0.0143
x_2	-4.00	0.0052	1.49E-03	0.0143
x_3	-0.25	0.0052	0.653	0.0143
x_1x_2	1.50	0.0052	0.044	0.0143
x_1x_3	1.75	0.0052	0.027	0.0143
x_2x_3	1.25	0.0052	0.072	0.0143

Así, al sustituir los valores de los parámetros resultantes de la regresión, se obtiene la siguiente representación matemática para el comportamiento del rendimiento:

$$y = 29.00 + 1.5x_1^* - 4x_2^* - 0.25x_3^* + 1.5x_1^*x_2^* + 1.75x_1^*x_3^* + 1.25x_2^*x_3^* \quad (36)$$

En el Figura 5.10. se pueden apreciar más fácilmente los datos mostrados en la Tabla 5.7. En ella se representan los valores de los coeficientes o parámetros obtenidos (escalados y centrados) respecto al variable de respuesta. La gráfica muestra que x_1 presenta una influencia positiva sobre el rendimiento, es decir que la presencia en mayor proporción de dextrosa respecto al de sacarosa parece tener un efecto positivo sobre los rendimientos finales.

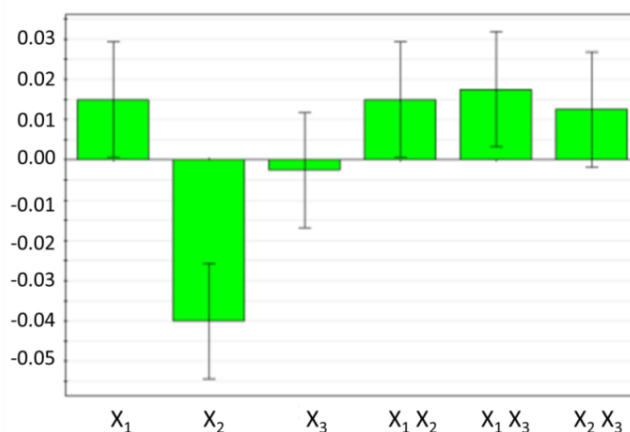


Figura 5.10 Efecto de los factores analizados para el modelo del rendimiento de la fermentación por *A.pullulans* en el medio modelo.

Sin embargo, la variable x_2 es la que tiene mayor influencia sobre el rendimiento. Además, la influencia es negativa, lo que significa que la presencia de citrato de sodio disminuye la producción de poliácido málico. La presencia de malato de sodio no tuvo, por sí sola, un efecto estadísticamente significativo sobre el rendimiento obtenido, similar al efecto de la interacción de ambas sales.

No obstante, las interacciones entre la concentración del tipo de azúcar y la presencia de ambas sales, tienden a generar un aumento en la respuesta, es decir que, a mayor proporción en la concentración de dextrosa sumado a la presencia de una de ambas sales, muestra un aumento en el rendimiento. Además, la interacción entre ambas sales no es significativa. Esto se ejemplifica en la Figura 5.11 como una gráfica de contorno del rendimiento en función de la concentración de citrato de sodio y de la concentración de dextrosa, donde a determinada concentración de la sal de sodio se obtiene mayor rendimiento a medida que se incrementa la concentración de dextrosa en el medio.

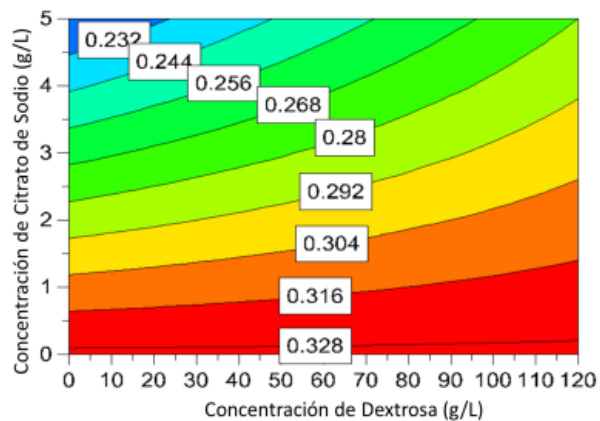


Figura 5.11 Efecto de la concentración de citrato de sodio y dextrosa sobre el rendimiento de la fermentación en el medio modelo.

Para finalizar con el análisis estadístico, en la Figura 5.12, se muestra la gráfica de paridad entre los valores experimentales y los valores predichos obtenidos a través del modelo. Como se observa, los puntos están cerca de la línea recta de 45°. Sin embargo, los puntos al centro del grupo de datos muestran un comportamiento fuera de esta línea, si bien puede atribuirse a cierto grado de curvatura en el comportamiento de los datos, que daría como resultado explorar el ajuste en un modelo del tipo cuadrático, mediante los resultados obtenidos por la prueba de falta de ajuste del ANOVA, esta idea es descartada.

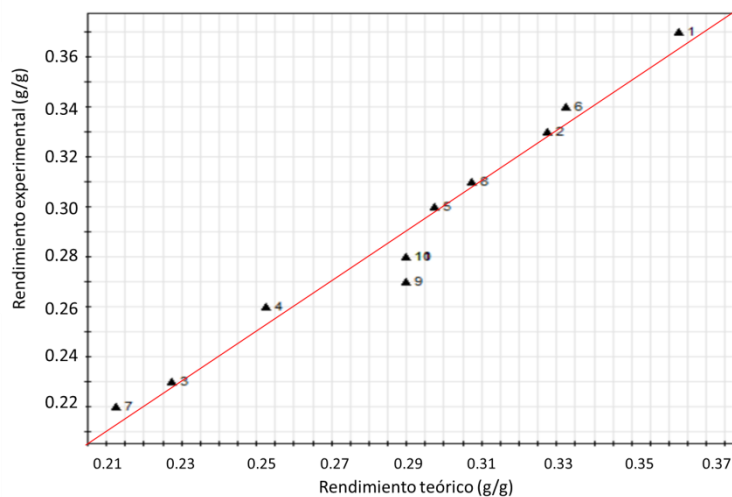


Figura 5.12 Comparación del rendimiento experimental y teórico para la obtención de PMA por *A. pullulans*.

Curvas de crecimiento

Para evaluar la afinidad por el medio de cultivo respecto a la multiplicación del microorganismo, se presenta la Figura 5.13, que muestra el seguimiento del incremento o decremento de la población microbiana respecto al inóculo utilizado, mediante las cinéticas de crecimiento.

Se puede observar que las curvas pueden presentar dos tipos de comportamiento respecto a la pendiente. La mayoría de ellas tiene una pendiente positiva, representando un aumento de la población. Solamente los experimentos 5 y 6 cuentan con un comportamiento negativo, correspondiente a la disminución de la población microbiana. Es decir que en estos dos experimentos, la composición del medio está afectando la viabilidad del microorganismo resultando en la muerte del moho aproximadamente en el segundo día de fermentación.

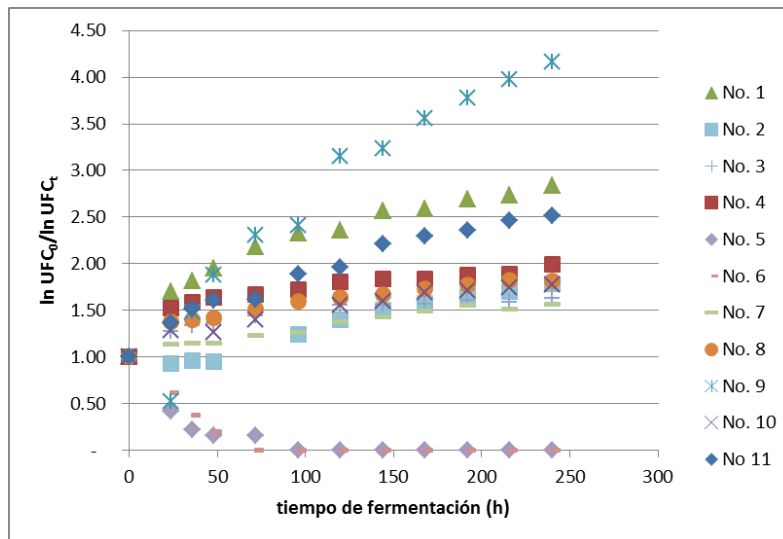


Figura 5.13 Comparativo de las curvas de crecimiento obtenidas del DOE para el rendimiento de la fermentación en el medio modelo.

Estos resultados coinciden con los parámetros obtenidos para cada factor evaluado en el análisis del DOE. En efecto, en los medios donde hay presencia de 100% sacarosa y citrato, sin importar la presencia o ausencia de malato, la cepa no pudo sobrevivir más allá del tiempo mencionado. El efecto inhibitor del citrato en el

ciclo de Krebs, mencionado en los antecedentes, se corrobora al observar la disminución de la cuenta microbiana inicial. Este efecto es inhibido cuando el medio tiene presencia de glucosa. Esto se debe probablemente a que la célula se adapta a la presencia de citrato y tiene manera de continuar con su metabolismo, gracias a la reserva de monosacárido, el cual puede metabolizar con mayor facilidad.

A. pullulans contiene un número elevado de genes responsables de secretar proteínas asociadas con el catabolismo de carbohidratos, incluyendo glicósido hidrolasas, carbohidrato esterasas, glicósiltransferasas, polisacárido liasas y moduladoras de unión de carbohidratos. Este moho, además posee un gran número de proteínas transportadoras de carbohidratos, que incluyen varios azúcares como sucrosa, maltosa, lactosa, galactosa, fructosa y xilosa; con más de 800 secretadores de proteínas, donde el 45% de ellos están relacionados con enzimas activas en la degradación o catabolismo de carbohidratos (Gostinčar, 2014).

En la Figura 5.14 se comparan las cinéticas de crecimiento de los medios sin añadir ninguna de las dos sales evaluadas, considerando el ajuste a una línea recta. Se observa que las pendientes de ambas curvas de crecimiento presentan valores muy cercanos. Esto indica que el microorganismo utiliza indistintamente ambos sustratos cuando no se considera la adición de otro componente que pueda afectar su metabolismo.

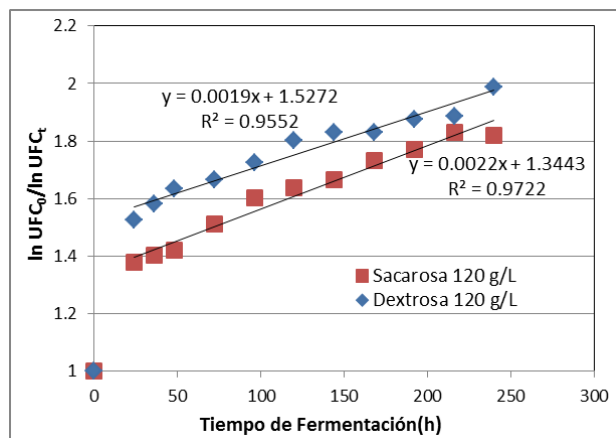


Figura 5.14 Evolución del crecimiento microbiano respecto a la concentración microbiana inicial para los medios sin concentración de malato y citrato de sodio.

Cheng y colaboradores (2016) determinaron que la cepa ZX-10 de *A. pullulans* puede metabolizar la diversidad de azúcares encontrados en la molasa de soya para la producción de PMA, entre ellos la estaquiosa, galactosa, rafinosa, sacarosa, glucosa, fructosa, xilosa y arabinosa. El alto número de transportadores de azúcar y de glicósido hidrolasas proporciona la diversidad nutricional de *A. pullulans*, permitiendo el uso de varios carbohidratos para su crecimiento y metabolismo energético. (Gostinčar, 2014)

Esto implica que los tres azúcares disponibles en el medio empleado en la elaboración de este trabajo de investigación pueden ser metabolizados por el género sin problema alguno. Sin embargo, otros estudios apuntan a que la utilización de sacarosa tiende a ser relativamente lenta, probablemente debido a la inhibición por represión de catabolitos de carbono mediada por glucosa (CCR) (Görke, 2008). CCR es un mecanismo de regulación por el cual la expresión de genes necesarios para la utilización de fuentes secundarias de carbono se evita mediante la presencia de un sustrato preferido, lo que permite que las células microbianas aceleren su metabolismo, al optimizar las tasas de crecimiento en entornos naturales que proporcionan mezclas complejas de nutrientes (Park, 2012).

En la fermentación donde la sacarosa es la única fuente de carbono, esta es rápidamente hidrolizada por invertasas secretadas en el medio, obteniendo glucosa y fructosa, las cuales son captadas por la célula. Sin embargo, la utilización de fructosa es inhibida por la glucosa (Wei, 2017), ya que en general, la glucosa es la fuente de carbono preferida. Por ello, su presencia puede disminuir el transporte y catabolismo de otras fuentes de carbono por activación de una compleja red regulatoria (Conrad, 2014).

Cuando se comparan las curvas correspondientes a los medios donde la concentración de dextrosa es 120 g/L (Figura 5.15), podemos observar que aquellos medios con adición de citrato, tienen pendientes finales de crecimiento mayores que aquellas que no tienen la presencia de esta sal.

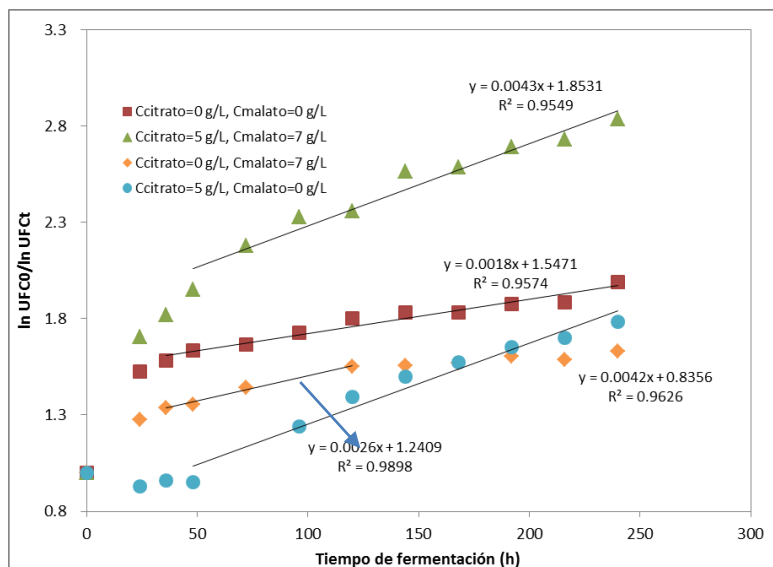


Figura 5.15 Evolución del crecimiento microbiano respecto a la concentración microbiana inicial para los medios 120 g/L dextrosa.

Además, en la curva correspondiente al medio de cultivo conteniendo solo malato de sodio, se observa la estabilización de la tasa de crecimiento. Es decir, la velocidad de muerte y reproducción celular son casi equivalentes. Por otro lado, se observa una tasa de crecimiento menor al inicio de la fermentación del medio donde solo hay presencia de citrato. En efecto, se observa que la muerte celular es mayor que la velocidad de crecimiento. Sin embargo, esta tiende a recuperarse después de las 48 h de fermentación.

Los comportamientos no son similares a las curvas de los medios donde la concentración de sacarosa es 120 g/L (Figura 5.16). En este caso, las curvas con presencia de citrato de sodio presentan la inhibición completa del crecimiento, con presencia o ausencia de malato de sodio. Por otro lado, las pendientes finales de la tasa de crecimiento para las curvas donde no hay presencia de citrato son muy similares. No obstante, la correspondiente al medio con malato de sodio, tiene un periodo donde la velocidad de crecimiento y mortandad son equivalentes, visualmente representado como una recta con pendiente igual a cero.

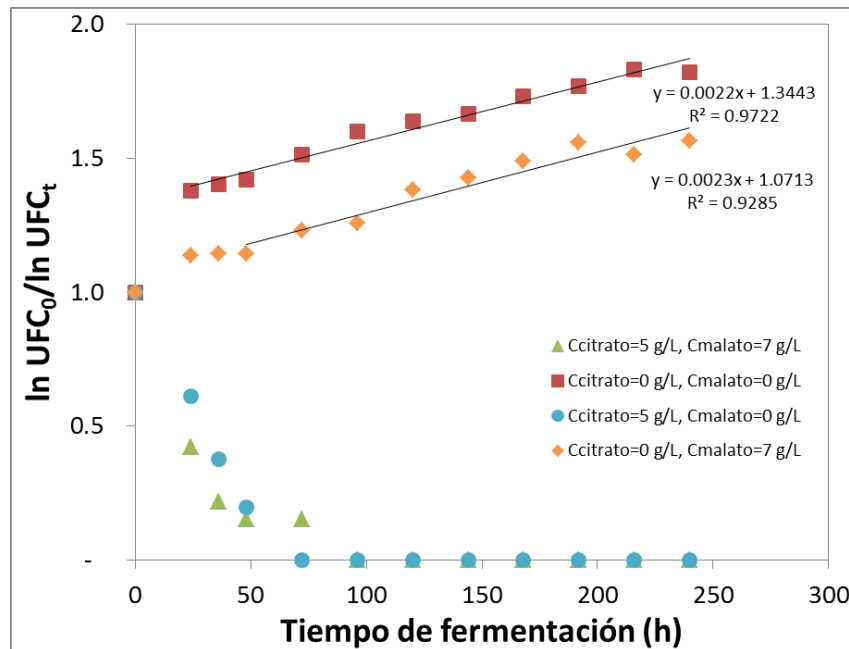


Figura 5.16 Evolución del crecimiento microbiano respecto a la concentración microbiana inicial para los medios 120 g/L sacarosa.

5.1.4. Estudio del proceso de fermentación en el medio prueba.

Rendimiento teórico

Con base a la composición teórica, se aplica la transformación de variables obteniendo el valor codificado de cada una. La Tabla 5.8 presenta los valores para cada medio de fermentación:

Tabla 5.8 Valores codificados para cada variable estudiada de los medios de fermentación a base de jarabe obtenido del proceso de recuperación.

Tipo de Jarabe	Variable		
	X1	X2	X3
JR	-0.715	-1	0.429
CC	-0.706	-0.520	-1
N	-0.796	0.600	-1

De esta manera se obtiene los valores restantes para las interacciones simples que también se sustituirán en el modelo obtenido mediante el análisis de los rendimientos del DOE, los cuales se muestran en la Tabla 5.9:

Tabla 5.9 Valores codificados todas las variables introducidas al modelo del rendimiento de la fermentación.

Tipo de Jarabe	Variable			Interacciones simples		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ X ₂	X ₁ X ₃	X ₂ X ₃
JR	-0.715	-1	0.429	0.715	-0.307	-0.429
CC	-0.706	-0.520	-1	0.367	0.706	0.520
N	-0.796	0.600	-1	-0.478	0.796	-0.600

Los resultados de la ecuación se presentan en la Figura 5.17, donde se observa que, considerando la composición teórica de los jarabes de recuperación, el medio de fermentación que teóricamente debería presentar mejores rendimientos es el preparado con el jarabe correspondiente al tipo de dulce CC, seguido del JR. El que produce un menor rendimiento teórico es el medio de fermentación preparado a base del jarabe correspondiente al tipo de dulce N.

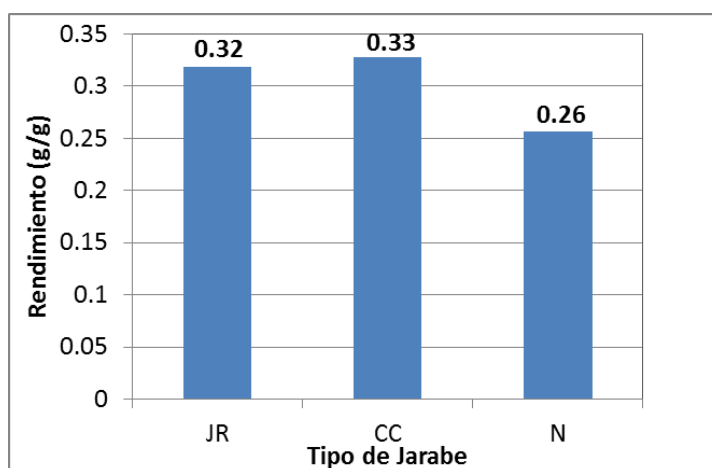


Figura 5.17 Rendimiento obtenido mediante el uso del modelo obtenido del DOE para rendimiento de la fermentación en el medio modelo.

Rendimiento experimental

Para corroborar la funcionalidad del modelo, se compararon los rendimientos promedio obtenidos mediante la realización de corridas para cada tipo de jarabe. En la Tabla 5.10 se muestran la composición teórica de cada jarabe considerando los valores experimentales que pueden ser determinados, marcados con un asterisco (*), el resto de los valores fueron calculados mediante balance de materia, de la misma manera que para la caracterización fisicoquímica del medio de fermentación.

Tabla 5.10 Composición teórica de los jarabes utilizados para la preparación de medios de fermentación a nivel laboratorio.

Componente/Tipo de dulce	% de Composición		
	Caramelo Macizo (JR)	Caramelo Macizo (CC)	Caramelo Suave (N)
Carbohidratos totales	63.70	64.47	75.74
Dextrosa	6.88	10.07	4.19
Maltosa	3.02	4.43	8.77
Sacarosa	39.91*	39.40*	41.87*
Azúcares totales	49.84*	53.89*	54.84*
Azúcares reductores	9.93*	14.49*	12.96*
Agua	34.00*	35.00*	22.00*
Sales totales	2.30	0.53	2.26
Citrato de sodio		0.48	2.00
Malato de sodio	2.02		

Al realizar el ajuste del medio de fermentación a 120 g/L de azúcares totales, se obtiene las concentraciones finales de sacarosa, dextrosa, citrato de sodio y malato de sodio disponibles, las cuales se presentan en la Tabla 5.11, donde se observa que la concentración de citrato es mayor en el medio N, y en este mismo medio la concentración de dextrosa es menor comparada con el resto de los medios de fermentación, contrastando con una proporción importante de maltosa y otros carbohidratos disponibles (maltodextrinas).

Tabla 5.11 Composición teórica de los medios de fermentación utilizados para prueba a nivel laboratorio.

Componente/Tipo de dulce	% de Composición		
	Caramelo Macizo (JR)	Caramelo Macizo (CC)	Caramelo Suave (N)
CARBOHIDRATOS TOTALES	15.34	14.35	16.57
DEXTROSA	1.66	2.24	0.92
MALTOSA	0.73	0.99	1.92
SACAROSA	9.61*	8.77*	9.16*
AZÚCARES TOTALES	12.00*	12.00*	12.00*
AZÚCARES REDUCTORES	2.39*	3.23*	2.84*
AGUA	85.00*	85.00*	85.00*
SALES TOTALES	3.55	3.12	3.50
CARBONATO DE CALCIO	3.00	3.00	3.00
CITRATO DE SODIO		0.11	0.44
MALATO DE SODIO	0.49		

Se aprecia que los valores que pueden ser obtenidos experimentalmente, marcados con un asterisco (*), son muy cercanos a los valores promedio presentados en la sección correspondiente a la caracterización fisicoquímica del medio de fermentación. El que presenta mayor variación es el correspondiente al Caramelo Suave (N), que en la práctica es el jarabe de recuperación con mayores rangos en sus variables de aceptación.

Una vez que se realiza el ajuste correspondiente para la preparación del medio, se obtiene la producción final de PMA a $t=240$ h y los azúcares totales consumidos, para calcular de esta manera el rendimiento. En la Tabla 5.12 se presenta el rendimiento promedio obtenido (2 corridas para cada tipo de jarabe) y su desviación estándar, los jarabes preparados con el tipo de jarabe JR y CC son los que presentan mayores rendimientos (0.33 y 0.35 g/g respectivamente), esta tendencia coincide con el resultado de la aplicación de la ecuación obtenida mediante el diseño de experimentos (0.318 y 0.327 g/g).

Tabla 5.12 Rendimiento promedio de la fermentación respecto al PMA obtenido.

Tipo de Jarabe	Rendimiento Promedio (g/g)	Desviación Estándar
JR	0.33	0.015
JR*	0.15	0.009
CC	0.35	0.011
N	0.28	0.042

Además, se presenta el resultado para las corridas obtenidas con el Jarabe JR con y sin el resto de las sales añadidas al medio de fermentación. Este último marcado con un asterisco en la Tabla 5.12. En el caso del Jarabe JR, se observa que hay una diferencia importante respecto al rendimiento obtenido, más del doble respecto al obtenido con el medio de fermentación sin las sales. Esto indica la importancia de la adición de los componentes del medio de fermentación.

Selección del jarabe para prueba piloto

La diferencia entre los dos rendimientos mayores obtenidos, con los medios de fermentación preparados a base de los jarabes de recuperación, no es suficiente para seleccionar uno de ellos de manera definitiva, esto se aprecia en la Figura 5.18. El intervalo correspondiente a la desviación estándar del medio de fermentación preparado con el jarabe CC no alcanza a sobrepasar el correspondiente al preparado con el jarabe JR.

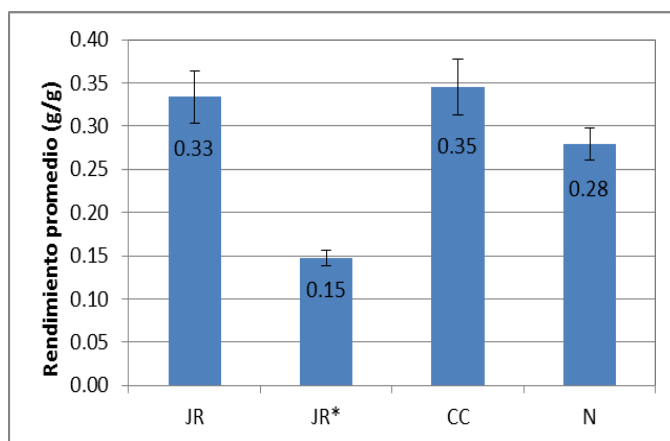


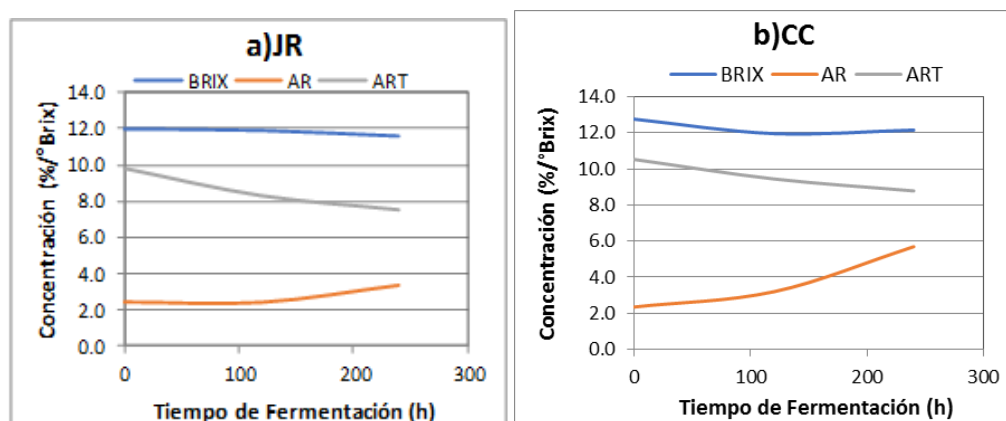
Figura 5.18 Desviación de los valores promedio de los rendimientos de la fermentación respecto a la producción de PMA obtenidos experimentalmente.

El hecho de que los valores promedio de cada grupo no sean iguales no implica que haya evidencias de una diferencia significativa. Dado que cada grupo tiene su propia variabilidad, aunque el tratamiento no sea eficaz, las medias muestrales no tienen por qué ser exactas. Comprobar que los mayores promedios obtenidos no son diferentes estadísticamente, permite el uso indistinto de cualquiera de ellos.

Con el fin de definir si la diferencia observada entre las medias de los dos grupos con los valores mayores de rendimiento es significativa, se realizó una prueba o test de hipótesis utilizando la distribución t-student obteniendo un valor de $t=0.448$, que corresponde a $p=0.698$, por lo que al ser $p>0.05$ (considerando un intervalo de confianza del 95%) la hipótesis nula es aceptada, es decir, las medias de ambas muestras no son estadísticamente diferentes. Por lo que, experimentalmente no se

encuentra diferencia significativa sobre el rendimiento promedio obtenido utilizando el jarabe JR o CC para la preparación del medio de fermentación.

En las Figuras 5.19a y 5.19b se observa los comportamientos correspondientes al consumo de azúcares (como reductores totales) y la evolución de los azúcares reductores, además del correspondiente a los sólidos solubles totales para los dos medios analizados mediante la prueba t.



Figuras 5.19a y 5.19b. Consumo de Azúcares totales, evolución de Sólidos Soluble Totales (°Brix) y Azúcares Reductores para la fermentación a nivel laboratorio.

Se aprecia que para azúcares reductores el incremento es más pronunciado cuando se utiliza el jarabe CC. Sin embargo, la evolución de los azúcares totales es similar en ambos y la concentración de sólidos solubles totales se mantiene prácticamente constante. Esto es indicativo de un mayor desdoblamiento de los disacáridos antes de su utilización en el medio CC.

Por consiguiente, al no encontrar diferencias que impliquen la obtención de mayores rendimientos, se selecciona el jarabe JR para la realización de las pruebas a nivel piloto, debido a que, como se presenta en la Tabla 5.13, este tipo de dulce se produce en mayor cantidad y su porcentaje de recuperación es igualmente mayor que el dulce CC.

Tabla 5.13 Cantidad de merma producida y recuperada mensual por tipo de dulce.

Tipo de Dulce	Merma producida (kg)	Recuperado (kg)	% Recuperación
N	9,048	7,390	82%
JR	9,745	4,884	50%
CC	4,792	1,254	26%

Finalmente, se procede a la preparación del medio de fermentación para la prueba a nivel piloto a partir del jarabe obtenido de la merma del dulce tipo JR.

5.2. EXPERIMENTO DE VALIDACIÓN A NIVEL PILOTO

Al añadir aireación constante al sistema, además de otros elementos como el sistema de control de temperatura y la agitación controlada, es de esperar que el comportamiento del microorganismo tenga variaciones respecto a lo observado a nivel laboratorio en los experimentos en matraz.

5.2.1. Seguimiento de la fermentación

Debido a la naturaleza aerobia del moho utilizado, se espera un incremento en el crecimiento microbiano y de producción de metabolito. Esto se corrobora en la Figura 5.20, donde se presentan los resultados de biomasa y PMA obtenidos a nivel piloto, así como la evolución de la concentración de sólidos solubles totales (°Brix).

Se observa que los sólidos solubles totales aumentan las primeras 48 h que dura el experimento, esto se atribuye a la naturaleza de los componentes del jarabe de recuperación a partir del cual fue preparado el medio de fermentación. Este jarabe cuenta con una proporción de entre 10 y 15 porciento de jarabe de glucosa, en la Tabla 5.14 se ilustra una composición típica para estos jarabes, donde se aprecia que solo una fracción de los sólidos totales corresponde a glucosa.

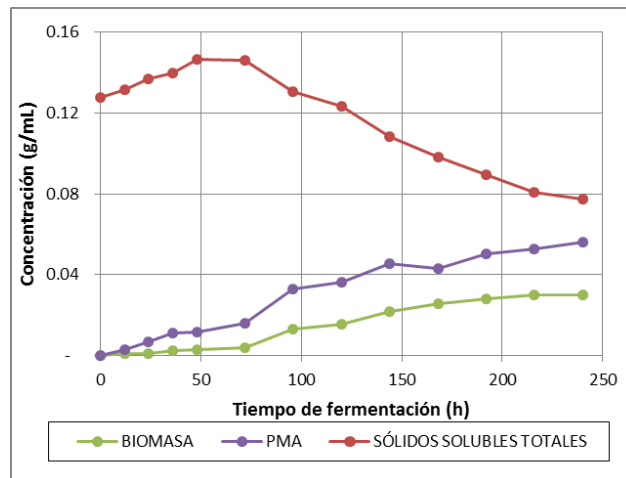


Figura 5.20 Evolución de sustrato, PMA y biomasa durante la fermentación con *Aureobasidium pullulans* en reactor tipo batch.

Tabla 5.14 Perfil de carbohidratos típico de un jarabe de glucosa utilizado en confitería.

Carbohidratos	% B.S.
Dextrosa	18.2
Disacáridos	13.8
Trisacáridos	10.5
Tetrasacáridos o mayores	57.5

Es posible que el microorganismo este realizando la hidrólisis de las maltodextrinas presentes en el jarabe y de esta manera se incrementa el contenido de azúcares disponibles para el consumo y producción del polímero.

Esta hipótesis se sustenta al observar la evolución del contenido de azúcares totales, reductores y sacarosa respecto al contenido de sólidos solubles totales, los cuales se presentan en la Figura 5.21. En esta gráfica se aprecia, al inicio de la fermentación, un aumento importante en sólidos solubles totales, concentración de azúcares reductores y azúcares totales. Sin embargo, la sacarosa se mantiene constante y una vez que los sólidos solubles totales comienzan a disminuir (~72 h), lo hacen también el resto de las fracciones de azúcares. Sin embargo, la pendiente es visiblemente mayor para los azúcares reductores que para la sacarosa, lo cual puede explicarse como una predilección de *A. pullulans* a consumir más rápidamente los azúcares reductores disponibles (glucosa y maltosa).

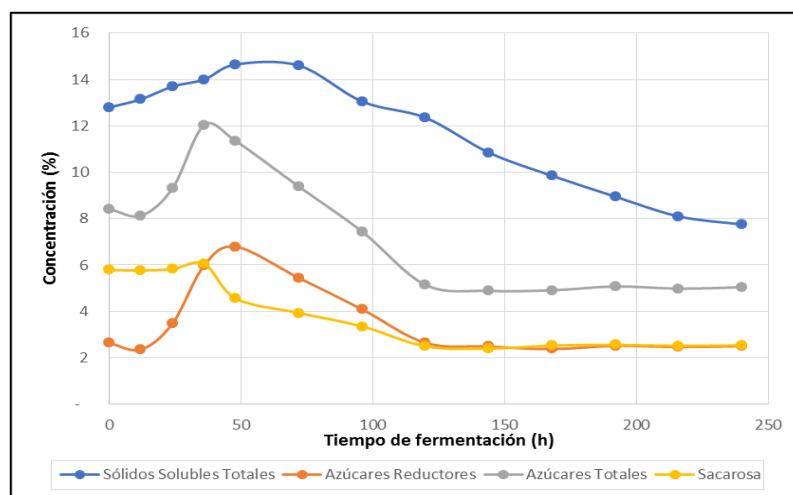


Figura 5.21 Evolución de los componentes del sustrato en el medio de fermentación a base de jarabes de recuperación por acción de *A. pullulans* en reactor tipo batch.

Aproximadamente a la mitad del tiempo que dura la fermentación (~120 h), las concentraciones de azúcares totales, reductores y sacarosa se estabiliza y se mantiene constante hacia el final de la fermentación. No obstante, el comportamiento de los sólidos solubles es una pendiente descendente después de las 72 horas acercándose al valor final de los azúcares totales.

Esto indica que, llegado a este punto, el microorganismo vuelve a hacer uso de las maltodextrinas restantes del jarabe de maíz, para continuar con su metabolismo. Esto a través de la hidrólisis de las cadenas de maltodextrinas en azúcares más pequeños, que facilitan su transporte al interior de la célula y, al no existir un incremento importante en las concentraciones de azúcares, es probable que la velocidad de consumo sea igual a la velocidad con la que estos se generan. De esta manera se demuestra la capacidad de utilizar diferentes carbohidratos como sustrato de la cepa *A. pullulans*, utilizada en este trabajo de investigación.

Respecto al crecimiento del microorganismo, en la Figura 5.22 se presenta la curva correspondiente a la cuenta total, como determinación de viabilidad, y la concentración de biomasa en DCW. Se observa, que independientemente del comportamiento en aumento del DCW, la viabilidad de la población microbiana comienza su fase

estacionaria cerca de la mitad del tiempo que dura la fermentación (120 h). Debido a que DCW no permite el reconocimiento entre células viables y no viables, esta técnica no podría ser determinativa para predecir el comportamiento del crecimiento del microorganismo. Es por ello que los modelos de crecimiento fueron ajustados a los datos de cuenta total.

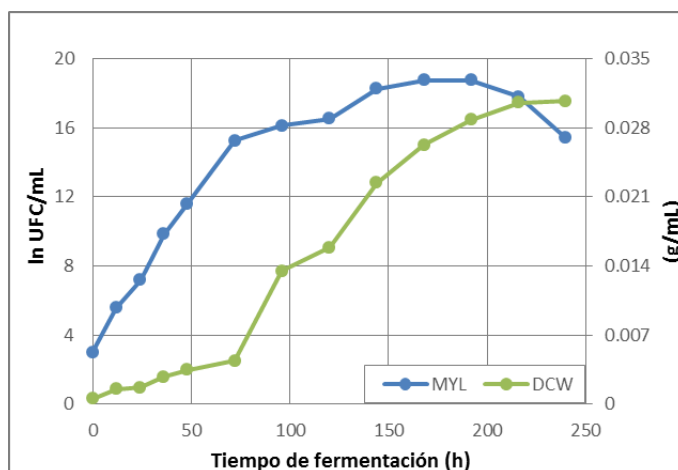


Figura 5.22 Evolución de la cuenta microbiana (MYL) contra la producción de biomasa (DCW) en el medio de fermentación a base de jarabes de recuperación por *A. pullulans* en reactor tipo batch.

5.2.2. Rendimiento obtenido

Para el cálculo de los rendimientos obtenidos en el experimento a nivel piloto, se partió de la concentración máxima observada de sólidos solubles totales, en el supuesto que todos los azúcares y maltodextrinas disponibles pueden ser metabolizadas por el microorganismo, considerando un balance másico representado en la Ecuación 37:

$$SST_m - SST_f = SST_c \quad (37)$$

Donde SST_m representa el valor máximo de sólidos solubles totales o °Brix, SST_f corresponde al valor final de sólidos solubles totales, y SST_c a los sólidos solubles totales consumidos durante la fermentación por el microorganismo.

Se obtuvieron los valores de rendimiento tanto para la producción del polímero como la producción de biomasa, expresados en las ecuaciones 38 y 39:

Rendimiento del producto

$$R_{p/s} = SST_c/PMA_f \quad (38)$$

Siendo PMA_f la cantidad de PMA determinada en el tiempo final de la fermentación (240 h).

Rendimiento de la biomasa

$$R_{b/s} = SST_c/DCW_f \quad (39)$$

Siendo DCW_f la cantidad de biomasa determinada en el tiempo final de la fermentación (240 h).

El valor máximo de sólidos solubles totales presentado fue de 0.147 g/mL, y el valor de este componente a las 240 h de fermentación corresponde a 0.078 g/mL, dando un total de 0.07 g/mL de sólidos solubles totales consumidos, considerando 0.056 g/mL de PMA y 0.030 g/mL de DCW producidos en este tiempo, los rendimientos obtenidos fueron los siguientes:

$$R_{p/s} = 0.81 \text{ g/g}$$

$$R_{b/s} = 0.44 \text{ g/g}$$

Por lo que el microorganismo mostró mejores rendimientos para la obtención del metabolito, lo cual es buscado para este tipo de procesos, aproximadamente el doble del obtenido para la producción de biomasa. Indicativo de que el microorganismo tiende a dirigir su metabolismo para producir PMA y en menor medida para reproducirse.

5.3. MODELADO MATEMÁTICO

5.3.1. Cinética de crecimiento microbiano

Visualmente la curva de crecimiento no cuenta con fase de retraso (lag), por lo que los parámetros de cada ecuación correspondientes a la duración de esta fase de la

curva de crecimiento (λ) recibieron el valor de 0, simplificando el número de parámetros a calcular.

Una vez ajustados los datos experimentales a los modelos propuestos, en la Tabla 5.15 se presentan los parámetros cinéticos de crecimiento microbiano obtenidos con cada modelo. Se indican los valores arrojados con los dos softwares empleados, pudiendo apreciar que numéricamente no presentan diferencias importantes, los tres modelos arrojan un valor máximo de densidad microbiana entre (Y_{max}) 17.2 y 18 ln UFC/mL, y una velocidad máxima (μ_{max}) entre 0.17 y 0.22 ln UFC/mL/h. Los valores menores, tanto de Y_{max} como de μ_{max} fueron obtenidos con el modelo de Baranyi y Roberts, mientras que los valores mayores fueron obtenidos con el ajuste de los datos al modelo de Gompertz. La situación fue similar con el uso de ambos softwares.

Tabla 5.15 Ajuste de los datos experimentales de crecimiento microbiano por *A. pullulans* en reactor tipo batch a los modelos Logístico, Gompertz y Baranyi & Roberts.

Parámetros de cinética microbiana (Polymath)			
	LOGISTICO	GOMPERTZ	BARANYI Y ROBERTS
Y_{max}	17.3854	17.9069	17.2241
μ_{max}	0.2063	0.2291	0.1704
Parámetros de cinética microbiana (Solver Excel)			
	LOGISTICO	GOMPERTZ	BARANYI Y ROBERTS
Y_{max}	17.3826	17.9070	17.2240
μ_{max}	0.2062	0.2291	0.1704

Para identificar la calidad del ajuste, se graficaron los valores obtenidos teóricamente contra los datos experimentales, para obtener la prueba de linealidad. En el mismo gráfico se presentan los valores obtenidos mediante el uso de Polymath y el Solver de Excel, En las Figuras 5.23, 5.24 y 5.25 se observan para cada modelo propuesto, observando que los puntos correspondientes al software utilizado están

sobrepuestos, indicando que los valores de los datos arrojado son muy cercanos. Por otro lado, respecto al modelo empleado, se aprecia que el modelo que presenta un mayor número de puntos más cercanos a la línea de 45°, es el que hace uso de la función de Gompertz.

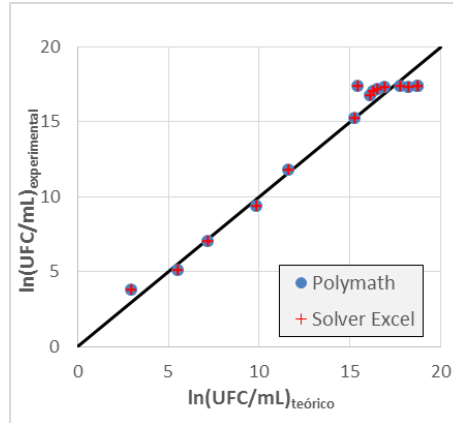


Figura 5.23 Comparación de la cuenta microbiana teórica y experimental para *A. pullulans* empleando el modelo Logístico.

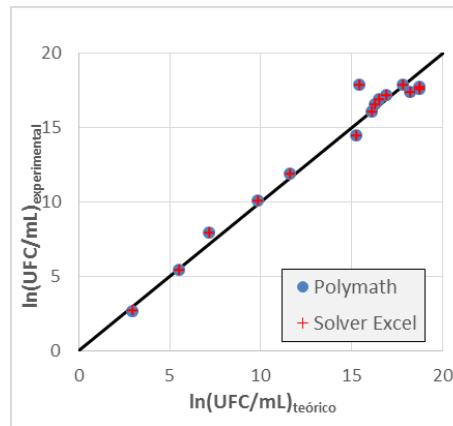


Figura 5.24 Comparación de la cuenta microbiana teórica y experimental para *A. pullulans* empleando el modelo Gompertz.

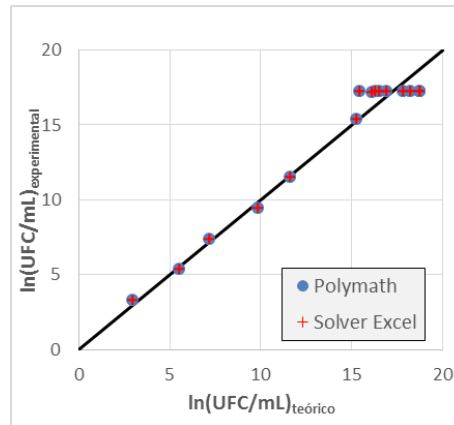


Figura 5.25 Comparación de la cuenta microbiana teórica y experimental para *A. pullulans* empleando el modelo Baranyi y Roberts.

Adicionalmente en la Tabla 5.16 se presenta el comparativo de parámetros estadísticos para el ajuste de los datos a los tres modelos propuestos, utilizando los dos softwares mencionados, donde se observa que no existe diferencia estadística entre la calidad del ajuste independientemente el software.

Tabla 5.16 Parámetros estadísticos del ajuste de datos experimentales a los modelos Logístico, Gompertz y Baranyi & Roberts para crecimiento microbiano de *A. pullulans* en reactor tipo batch.

Modelo para crecimiento microbiano (Polymath)				
		LOGÍSTICO	GOMPERTZ	BARANYI Y ROBERTS
PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	MSE	0.756	0.715	0.814
	R ²	0.969	0.971	0.967
	R ² adj	0.964	0.966	0.961
Modelo para crecimiento microbiano (Solver Excel)				
		LOGÍSTICO	GOMPERTZ	BARANYI Y ROBERTS
PARÁMETROS ESTADÍSTICOS	MSE	0.756	0.715	0.814
	R ²	0.969	0.971	0.967
	R ² adj	0.964	0.966	0.961

Sin embargo, entre modelos si se aprecian diferencias importantes. Identificando que el modelo que genera un menor MSE fue Gompertz, contra el mayor que fue Baranyi y Roberts. Respaldao al modelo de Gompertz, este también cuenta

con los valores mayores para el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{adj}), los cuales indican que el mejor ajuste de los datos respecto de los 3 modelos planteados, lo brinda Gompertz.

Finalmente, se presenta en la Figura 5.26 los puntos experimentales de la curva de crecimiento, así como las líneas correspondientes al ajuste de los datos a los 3 modelos planteados. Visualmente no se aprecia una diferencia importante, sin embargo, tal como se corroboró con los parámetros estadísticos, el modelo de Gompertz fue el que mejor se ajustó al comportamiento del crecimiento microbiano de la cepa de *A. pullulans* utilizada en el reactor tipo batch con el medio de fermentación elaborado a base de residuos de confitería.

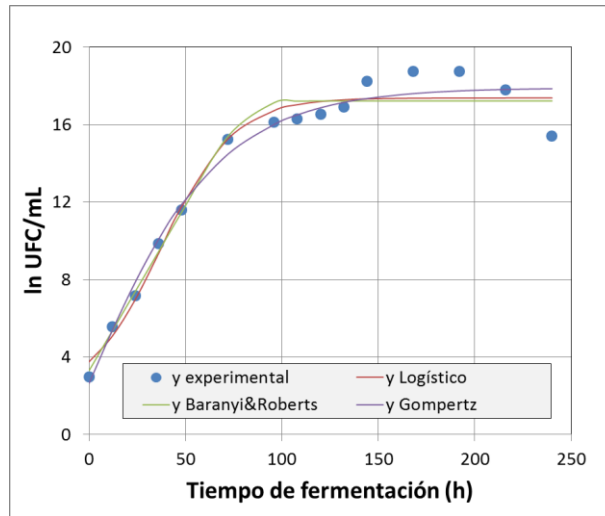


Figura 5.26 Curvas de crecimiento microbiano para *A. pullulans* en reactor tipo batch, datos experimentales y ajustados a los modelos Logístico, Gompertz y Baranyi & Roberts.

Por lo que el modelo final del comportamiento del crecimiento microbiano queda expresado en la Ecuación 40.

$$y(t) = -5.87 + 23.77e^{-e^{-0.0262(t-1)}} \quad (40)$$

M toma el valor de 1 para poder obtener $\lambda = 0$, $y(t)$ corresponde al \ln UFC/mL en el tiempo t , y t al tiempo.

5.3.2. Cinéticas de producción de PMA

Para el caso de la producción del polímero, se realizó un procedimiento similar al descrito en la sección anterior, consideraron todos los parámetros de las ecuaciones correspondientes a cada modelo.

Para identificar la calidad del ajuste, se graficaron los valores obtenidos teóricamente contra los datos experimentales, para obtener la prueba de linealidad. En el mismo gráfico, Figuras 5.27, 5.28 y 5.29, se presentan los valores obtenidos mediante el uso de Polymath y el Solver de Excel, observando que, a diferencia del crecimiento microbiano, los puntos arrojados con ambos softwares no se superponen exactamente, sin embargo, los valores de los datos siguen siendo muy cercanos.

Al igual que en el caso del crecimiento microbiano, la prueba de linealidad es mejor para el modelo de Gompertz.

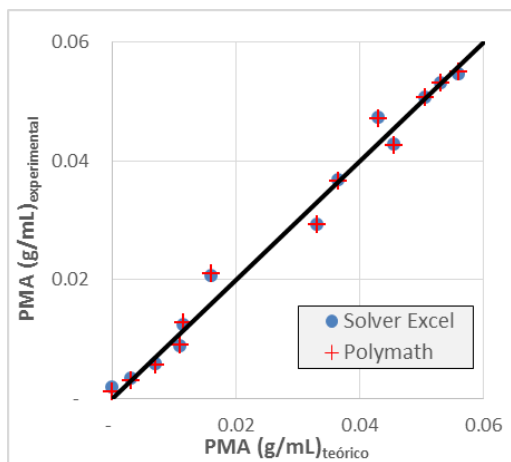


Figura 5.27 Comparación de cinéticas de producción de PMA por *A. pullulans* teórico y experimental empleando el modelo Gompertz.

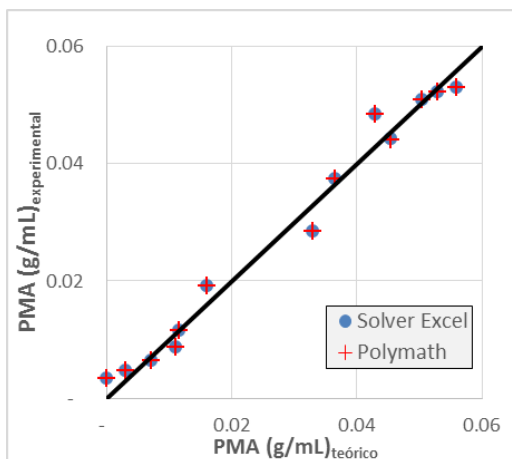


Figura 5.28 Comparación de cinéticas de producción de PMA por *A. pullulans* teórico y experimental empleando el modelo Özilgen.

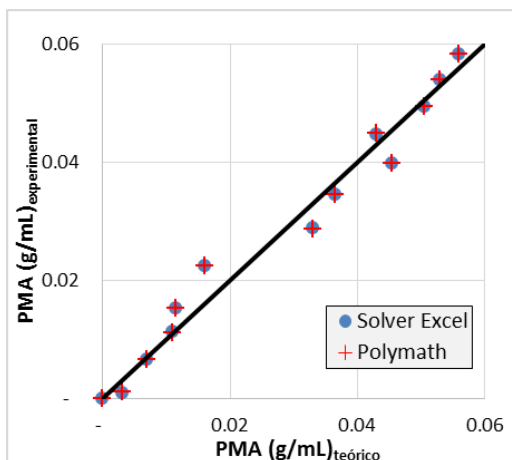


Figura 5.29 Comparación de cinéticas de producción de PMA por *A. pullulans* teórico y experimental empleando el modelo Peleg.

Para finalizar el análisis de bondad de ajuste, en la Tabla 5.17 se muestran los parámetros estadísticos del ajuste con ambos softwares. Para el caso de la producción del polímero, hay diferencias más relevantes considerando el software utilizado.

Tabla 5.17 Parámetros estadísticos del ajuste de datos experimentales a los modelos Gompertz, Özilgen y Peleg para producción de PMA por *A. pullulans* en reactor tipo batch.

Modelo para cinética de producción de PMA (Polymath)				
		GOMPERTZ	ÖZILGEN	PELEG
PARAMETROS ESTADÍSTICOS	MSE	5.75E-06	7.18E-06	9.44E-06
	R ²	0.985	0.982	0.976
	R ² ADJ	0.980	0.978	0.968
Modelo para cinética de producción de PMA (Solver Excel)				
		GOMPERTZ	ÖZILGEN	PELEG
PARAMETROS ESTADÍSTICOS	MSE	5.83E-06	7.18E-06	9.69E-06
	R ²	0.985	0.982	0.975
	R ² ADJ	0.982	0.978	0.970

Sin embargo, los menores valores de MSE siempre son obtenidos con el ajuste al modelo de Gompertz, así como los valores de R² y R²adj son mayores para este modelo, corroborando de esta manera el mejor ajuste de los datos utilizando esta función, por lo que este fue el modelo seleccionado, en la Tabla 5.18 se muestran los parámetros de la ecuación obtenidos por ambos softwares, y se puede observar que aunque difieren entre ellos, aquellos obtenidos mediante el uso de Polymath arrojan un valor de MSE menor, por lo que es el ajuste obtenido de esta manera el que se selecciona para la producción de PMA.

Tabla 5.18 Ajuste de los datos experimentales de producción de PMA por *A. pullulans* en reactor tipo batch al modelo de Gompertz.

Parámetros de cinética de producción de PMA				
	A	C	B	M
<i>POLYMATH</i>	-0.0019	0.0610	0.0157	70.8977
<i>SOLVER EXCEL</i>	0	0.0581	0.0169	74.0266

Finalmente, en la Figura 5.30 se presenta los valores experimentales, así como las curvas correspondientes al ajuste de los datos a los 3 modelos planteados. Se observa

mayor variación que en el caso del crecimiento microbiano, entre datos experimentales y valores teóricos de cada modelo. No obstante, se corrobora que nuevamente el mejor ajuste es proporcionado con el uso de la función de Gompertz para el caso de la producción del polímero del ácido málico con la cepa de *A. pullulans* utilizada.

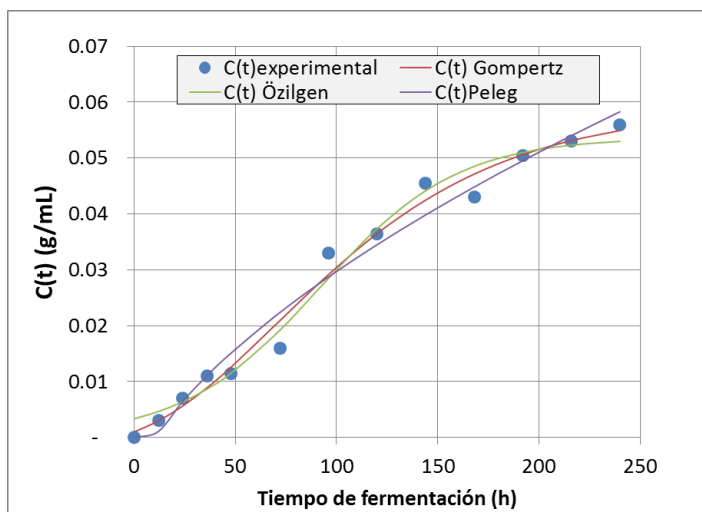


Figura 5.30 Cinética de producción de PMA por *A. pullulans* en reactor tipo batch, datos experimentales y ajustados a los modelos Gompertz, Özilgen y Peleg.

De tal manera que en la Ecuación 41 se representa el modelo para el ajuste de los valores de producción de PMA:

$$C(t)_{PMA} = -0.0019 + 0.0610e^{-e^{-0.0157(t-70.898)}} \quad (41)$$

5.3.3. Cinética de producción de biomasa

Para el caso de la producción de biomasa en base a los resultados del ajuste de datos de crecimiento microbiano, el cual mostró un mejor ajuste al modelo de Gompertz, se optó por realizar el ajuste a un modelo basado en esta misma función. De tal manera que en la Figura 5.31 se muestran los datos experimentales y el ajuste de los mismos al modelo antes mencionado y, para corroborar la bondad de ajuste en la Tabla 5.19 se presentan los parámetros estadísticos que evalúan la validez del modelo. Se presentan valores de R^2 y R^2_{adj} por arriba de 0.99, el mejor ajuste de todas las variables analizadas del seguimiento de la fermentación, así como un valor de MSE

del orden de 10^{-7} , indicando un alto grado de ajuste de los datos experimentales al modelo propuesto.

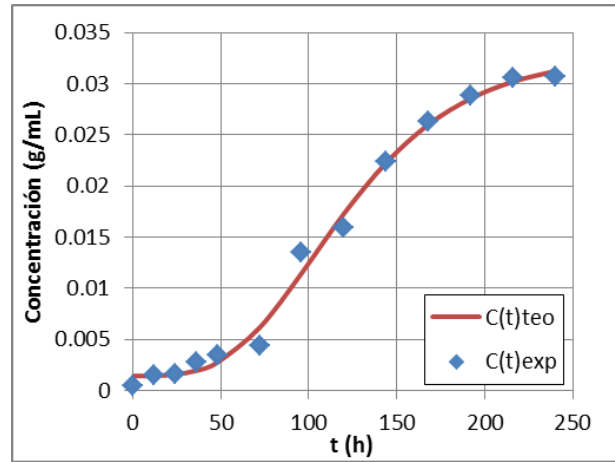


Figura 5.31 Ajuste de datos experimentales de producción de biomasa de *A. pullulans* en reactor tipo batch al modelo de Gompertz.

Tabla 5.19 Parámetros estadísticos del ajuste de datos experimentales al modelo de Gompertz para la producción de biomasa de *A. pullulans* en reactor tipo batch.

Parámetro Estadístico	Valor
MSE	9.027E-07
R ²	0.994
R ² adj	0.992

De esta manera se obtiene la Ecuación 42 que representa el comportamiento de la producción de biomasa en el sistema estudiado a nivel piloto:

$$C(t)_{DCW} = 0.0014 + 0.031e^{-e^{-0.0213(t-102.04)}} \quad (42)$$

5.3.4. Acoplamiento de cinéticas

Finalmente, se presentan las cinéticas obtenidas graficadas en la Figura 5.32, donde se puede observar el seguimiento de la fermentación en base a la función de Gompertz. Donde lo más importante radica en la producción de PMA, la cual, a diferencia de un bioproceso típico, no espera a que el crecimiento del microorganismo entre en la etapa estacionaria. Es decir que gran parte del consumo de sustrato, desde

las primeras etapas de la fermentación, es dirigido hacia la producción del polímero. Por el contrario, a un comportamiento típico, la pendiente de producción decrece en la etapa estacionaria de crecimiento.

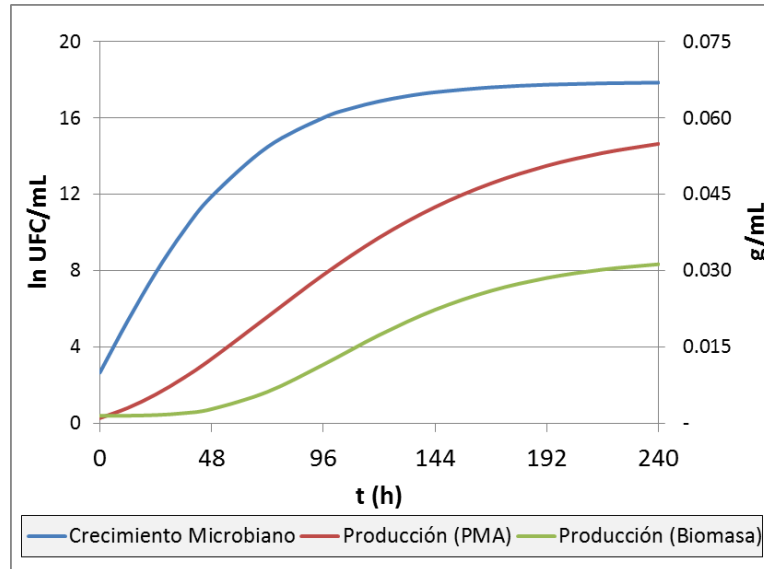


Figura 5.32 Cinéticas obtenidas con el ajuste de datos experimentales de la fermentación para la producción de PMA por *A. pullulans* en reactor tipo batch.

La producción de la biomasa, por otro lado, aunque en general coincide con las etapas señaladas en la curva de crecimiento, se mantiene en aumento a lo largo del tiempo que dura el experimento, lo cual no representa que las células viables continúen en aumento, reflejado en la meseta final de la curva de crecimiento.

A pesar de que la biomasa está en incremento, esta no alcanza ni la velocidad ni la concentración máxima observada en la cinética de producción de PMA.

Esto último es importante, ya que determina que el proceso global cumple la finalidad de que la producción del metabolito sea mayor a la biomasa generada a lo largo de toda la fermentación.

CONCLUSIONES

Se logró reproducir el proceso de fermentación para la obtención de PMA, mediante la utilización de dos cepas no reportadas previamente en la literatura. La correspondiente a la especie *Aureobasidium pullulans*, logró obtener mayores rendimientos y productividades.

El diseño de experimentos de las pruebas a nivel laboratorio determinó la importancia de la concentración de dextrosa como promotor del rendimiento y el citrato de sodio como inhibidor. Los rendimientos obtenidos a esta escala estuvieron dentro del rango de 0.2-0.4 gPMA/gSustrato, valores que son menores a los reportados en la literatura.

Los resultados arrojados por el DOE así como su validación a nivel laboratorio utilizando los jarabes de recuperación, permitió determinar las condiciones de operación para la validación a nivel piloto, en búsqueda de la obtención del mayor rendimiento. En el experimento a nivel piloto se utilizó el jarabe JR para la preparación del medio de fermentación. Ya que, aunque el rendimiento teórico esperado es estadísticamente similar al jarabe CC, la producción de la merma JR es superior a la CC, por lo que esto último determinó su selección.

A pesar del bajo rango de rendimiento obtenido por el DOE a escala laboratorio, los resultados a nivel piloto lograron mejorar considerablemente estos valores. Se constató un incremento de hasta 100%, obteniendo un rendimiento experimental de 0.81 gPMA/gSustrato. Este resultado muestra el interés del uso de esta cepa en particular, ya que, respecto a lo reportado en la literatura, esta es una de las cepas que en conjunto con el tipo sustrato y el sistema utilizado, permiten la obtención de mejores resultados.

La mejora del rendimiento obtenido a nivel piloto, con respecto a los valores experimentales a escala laboratorio, se atribuye a un ambiente más favorable en las condiciones de crecimiento microbiano. En efecto, la inclusión de aireación y la agitación constante permite que el medio tenga una mayor oxigenación, que el moho

requiere para su correcto metabolismo. Además, la agitación facilita el contacto del microorganismo con los diferentes nutrientes del medio, que este requiere para la producción del polímero buscado.

Más aún, los resultados de la prueba a escala piloto permitieron establecer las cinéticas en un biorreactor tipo batch. El ajuste de los datos experimentales de crecimiento microbiano, producción del polímero y producción de biomasa se ajustaron al modelo de Gompertz, con valores de R^2 superiores a 0.97.

Por lo anterior, se establece la factibilidad técnica de producción del poliácido málico mediante una vía biotecnológica, con rendimientos obtenidos en medios de fermentación de jarabes de merma similares a los obtenidos con soluciones modelo de azúcares. Los resultados a escala piloto muestran que este proceso puede ser escalado incluso a nivel industrial.

Como perspectiva, es necesario realizar una simulación del proceso global de obtención del ácido málico como producto final, así como un estudio económico, para corroborar la factibilidad técnico-económica del desarrollo del proceso a escala industrial.

REFERENCIAS

- Alavi, S., Puri, V., Knabel, S., Mohtar, R., Whiting, R. (1999) *Development and validation of a dynamic growth model for Listeria monocytogenes in fluid whole milk*. Journal Food Protect vol. 62, no. 2, p.170-176.
- Arnáiz, C., Isac, L., Lebrato, J. (2000). *Determinación de la biomasa en procesos biológicos I. Métodos directos e indirectos*, Sevilla: Escuela universitaria politécnica, Universidad de Sevilla.
- Asghar, R., Taufiq-Yap, Y., & Rezae, F. (2010). *Innovative process for the synthesis of vanadyl pyrophosphate as a highly selective catalyst for n-butane oxidation*. Chemical Engineering Journal, pp. 328-335
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos* (4ta ed.) México: Pearson. (pp. 29-117, 245-300, 507-545).
- Baranyi, J., Robert, T. (1995) *Mathematics of predictive food microbiology*. International Journal of Food Microbiology 26:199-218.
- Baranyi, J., Roberts, T. (1994) *A dynamic approach to predicting bacterial growth in food*. Int. J. Food Microbiol 23:277-294.
- Battat E, Peleg Y, Bercovitz A, Rokem JS, Goldberg I. (1991). *Optimization of L-malic acid production by Aspergillus flavus in a stirred fermentor*. Biotechnol Bioeng 37:1108–1116.
- Baty, A., Delignette-Müller, M. (2004) *Estimating the bacterial lag time: which model, which precision?*. Int. J. Food Microbiol vol 91, no. 3, p. 261-277.
- Baty, A., Flandrois, J., Delignette-Müller, M. (2002) *Modeling the lag time of Listeria monocytogenes from viable count enumeration and optical density data*. Appl. Environ. Microbiol. vol 68, no. 12, p. 5816-5825.
- Bedolla S, Dueñas C, Esquivel I. (2004). *Introducción a la tecnología de Alimentos*, (2da ed.) México: Limusa. pp. 131-132
- Buchanan, R. (1997) *When simple is good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves*. Food Microbiology 14: 313-326.
- Caldarelli, A. Cavania F., Luciana F. (2010). *The design of a new ZrO₂-supported V/P/O catalyst for n-butane oxidation to maleic anhydride: The build-up of the active phase during thermal treatment*. Catalysis Today pp 204-210.
- Calderón, J. (2017) *Ajuste de un modelo cinético para el crecimiento de Lactobacillus acidophilu*. Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingenierías, Universidad de América. Bogotá.
- Cao W, Luo J, Zhao J, Qiao C, Ding L, Qi B, Su Y, Wan Y. (2012). *Intensification of b-poly(L-malic acid) production by Aureobasidium pullulans ipe-1 in the late exponential growth phase*. J Ind Microbiol Biotechnol 39:1073–1080.
- Cao W, Qi B, Zhao J, Qiao C, Su Y, Wan Y. (2012b). *Control strategy of pH, dissolved oxygen concentration and stirring speed for enhancing b-poly (malic acid) production by Aureobasidium pullulans ipe-1*. J Chem Technol Biotech DOI: 10.1002/jctb.3905.

- Cao Y, Cao Y, Lin X. (2011). *Metabolically engineered Escherichia coli for biotechnological production of four-carbon 1,4-dicarboxylic acids*. J Ind Microbiol Biotechnol 38:649–656.
- Cao, W., Luo, J., Qi, B., Zhao, J., Qiao, C., Ding, L., Su, Y., Wan, Y. (2014). β -Poly(L-malic acid) production by fed-batch culture of *Aureobasidium pullulans* ipe-1 with mixed sugars. *Engineering in Life Sciences*, 14(2), pp 180–189.
- Castellar, G., Cardozo, B, Suarez, J., Vega J. (2013) Adsorción por lote y en una columna de lecho fijo del colorante B39. *Prospect*, 11 (1), pp. 66-75
- Cayré, M., Vignolo, G., Garro, O. (2007) *Selección de un Modelo Primario para Describir la Curva de Crecimiento de Bacterias Lácticas y Brochothrix thermosphacta sobre Emulsiones Cárnicas Cocidas*. Información tecnológica vol 18, no. 3, p.23-29. Universidad Nacional del Nordeste. Tucumán-Argentina.
- Ceise, S., & Conrad, J. (17 de Julio de 1990). USA Patente nº 4,941,895.
- Chang, R., Goldsby, K., Manzo, R., Ponce, S. (2013). *Química* (11a. edición) México-Madrid: MacGraw-Hill pp. 351
- Cheng, C., Zhou, Y., Lin, M., Wei, P., Yang, S.T., (2016) *Polymalic acid fermentation by Aureobasidium pullullans for malic acid production from soybean hull and soy molasses: fermentation kinetics and economic analysis*. *Bioresour. Technol* 223:166-174
- Chi Z, Wang ZP, Wang GY, Khan I, Chi ZM (2016) *Microbial biosynthesis and secretion of L-malic acid and its applications*. *Crit Rev Biotechnol* 36(1):99–107
- Chi, Z., Liu, G.L., Liu, C.G., Chi, Z.M., (2016b) *Poly(β L-malic acid) (PMLA) from Aureobasidium ssp. and its current proceedings*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100:3841-3851.
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H. (2014) *Nutrient sensing and signaling in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 38:254–299.
- Cordón, S., Pérez, J. (2016) *Ajuste de un modelo matemático para el crecimiento de Streptococcus pyogenes en 2 sustratos para la producción de ácido hialurónico a escala de laboratorio*. (Tesis de Licenciatura), Facultad de Ingeniería, Universidad de América. Bogotá (pp. 132)
- Dalgaard, P., Koutsoumanis, K. (2001) *Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models*. *J. Microbiol. Methods*. vol 43, no. 3, p. 183-196.
- Don, M., Shoparwe, N. (2010) *Kinetics of hyaluronic acid production by Streptococcus zooepidemicus considering the effect of glucose*. *Biochemical Engineering Journal* vol. 49, no. 1, p. 95-103.
- Duarte, A. (2011) *Evaluación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Monod*. *Ingeniería e Investigación* 33:123-138.
- Duffy, L. (1994) *Growth of Listeria monocytogenes on vacuum-packed cooked meats: effects of pH, aw, nitrite and ascorbate*. *International Journal of Food Microbiology* 23:377-390.
- Edwards, W.(2000). *La ciencia de las golosinas*. España: Acribia. pp. 25-30, 37, 55, 72-77, 82-87
- EMLAB. (2007). Environmental Microbiology Laboratory, Inc. (EMLab): *An index of some commonly encountered fungal genera*.

- Esener, A., Roels, J., Kossen, N. (1983) *Theory and applications of unstructured growth models: Kinetic and energetic aspects. Biotechnology and Bioengineering* vol. 25, no. 12, p. 2803-2841.
- FEDIT, (2008) *Tendencias en el uso de la biotecnología en el sector químico*. Centros Tecnológicos de España. Observatorio Industrial del Sector Químico. pp 46-55
- Fernández, J., Vega A., & Díez, F. (2010). *Partial oxidation of n-butane to maleic anhydride over VPO in a simulated circulating fluidized bed reactor*. *Applied Catalysis A: General*, pp. 76-82
- Fredrickson, A., Megee, R., Tsuchiya, H. (1970) *Mathematical Models for Fermentation Processes*. *Anonymous Advances in Applied Microbiology* 13:419-465.
- García, M. (2005). *Biotecnología alimentaria*. México: Limusa. pp. 553-566
- Garre, A., Egea J., Fernández P. (2016) *Modelos matemáticos para la descripción del crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos*. *Anuario de Jóvenes Investigadores* vol. 9, Universidad Politécnica de Cartagena (ETSIA).
- Giffel, M., Zwietering, M. (1999) *Validation of predictive models describing the growth of Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 46:135-149.
- Goldberg I, Rokem JS, Pines O. (2006). *Organic acids: Old metabolites, new themes*. *J Chem Technol Biotech* 81:1601–1611.
- Görke, B., Stülke, J. (2008) *Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients*. *Nat Rev Microbiol* 6:613–624.
- Gostinčar, C., Ohm, R., Kogej, T. (2014) *Genome sequencing of four Aureobasidium pullulans varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species*. *BMC Genomics* 15:549.
- Grand View Research (2018) *Malic Acid Market Size, Share & Trends Analysis Report By End-use (Beverage, Confectionery, Personal Care & Cosmetics), By Region, Competitive Landscape, And Segment Forecasts, 2018 – 2024*. Revisado en: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/malic-acid-market> Fecha de consulta: 06/Junio/2018
- Grant, C., Hunter, C. A., Flannigan, B., and Bravery, A. F. (1989). *The moisture requirements of moulds isolated from domestic dwellings*. *International Biodeterioration* 25, pp. 259-284.
- Grau, F., Vanderlinde, P. (1993) *Aerobic growth of Listeria monocytogenes on beef lean and fatty tissue: equations describing the effects of temperature and pH*. *Journal of Food Protection* 56:96-101.
- Haldane, J., (1930) *A mathematical theory of natural and artificial selection. (Part VI, Isolation.)*. *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society* vol. 26, no. 2, p. 220-230.
- Hawkes, M., Rennie, R., Sand, C., and Vaudry, W. (2005). *Aureobasidium pullulans infection: fungemia in an infant and a review of human cases*. *Diagn.Microbiol Infect Dis.* 51[3], pp. 209-213.
- Hills, B., Wrigth, K. (1994) *A new model for bacterial growth in heterogeneous system*. *J. Theor. Biol.* vol 168, no. 1, p. 593-605.
- Holler E, Angerer B, Achhammer G, Miller S, Windisch C (1992) *Biological and biosynthetic properties of poly-L-malate*. *FEMS Microbiol Rev* 103:109–118

Holler E. (2010). *Production of long-chain unbranched beta-poly(L-malic acid) by large scale physarumcultivation and high-grade purification of the same* US20100216199.

IHS Markit (2017). *Chemical Economics Handbook. DL-Malic Acid*. Revisado en: <https://ihsmarkit.com/products/malic-acid-chemical-economics-handbook.html> Fecha de consulta: 11/Junio/2018

INEGI, *Encuesta anual de la industria manufacturera por secto.*, Revisado en: <http://www.inegi.org.mx/sistemas/bie/?idserPadre=1040012000500010001000200040>. Fecha de Consulta: 13/Mayo/2018

Jantama, K., Haupt, M.J., Svoronos, S.A., Zhang, X., Moore, J.C., Shanmugam, K.T. y Ingram, L.O. (2008) *Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of Escherichia coli C that produce succinate and malate*. *Biotechnol. Bioeng.*, 99:1140-1153

Kajiyama T, Kobayashi H, Taguchi T, Saito H, Kamatsu Y, Kataoka K, Tanaka J (2004) *Synthesis of activated poly(α,β -malic acid) using N-hydroxysuccinimide and its gelation with collagen as biomaterials*. *Materials Sci Eng C* 24:815–819

Kawagoe M, Hyakumura K, Suye SI, Miki K, Naoe K. (1997). *Application of bubble column fermenters to submerged culture of Schizophyllum commune for production of L-malic acid*. *J Ferment Bioeng* 84:333–336.

Kumar, S., Kumar, S., Kumar A. (2005) Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochemical Engineering Journal* vol. 22, no. 2, p. 151-159.

Larone, D H. (1987). *Medically important fungi. A guide to identification*. 2nd edition, New York - Amsterdam - London, Elsevier Science Publishing Co., Inc. pp. 230

Lawson, J. (1978). *Emission control options for the synthetic organic chemicals manufacturing industry: Maleic anhydride product report*, EPA. Knoxville, TN: Hydrosience, Inc.

Leathers, T. D., & Manitchotpisit, P. (2013). *Production of poly(β -l-malic acid) (PMA) from agricultural biomass substrates by Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology Letters*, 35(1), 83–89. doi:10.1007/s10529-012-1045-x

Lee B., Holler E. (1999). *Effects of culture conditions on b-poly(Lmalate) production by Physarum polycephalum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 51, 647–52.

Legiscomex (2009). *Confitería en México*. http://www.legiscomex.com/BancoMedios/Documentos%20PDF/est_confites_mex_14.pdf. Fecha de consulta: 20/09/2016

Lehninger, A. (1988). *Principios de bioquímica* (11a. Edición) Barcelona: Omega. pp. 283-287

Li Y, Chi Z, Wang GY, Wang ZP, Liu GL, Lee CF, Ma ZC, Chi ZM (2015) *Taxonomy of Aureobasidium spp. and biosynthesis and regulation of their extracellular polymers*. *Crit Rev Microbiol* 41:228–237

Liu Z, Chi Z, Wang L, Li J. (2008). *Production, purification, and characterization of an extracellular lipase from Aureobasidium pullulans HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils*. *Biochem Eng J* 40:445–451.

Liu, S., Steinbüchel, A. (1996). Investigation of poly(b-L- malic acid) production by strains of *Aureobasidium pullulans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 46:273-278

- Liu, S., Steinbüchel, A. (1997). Production of poly(malic acid) from different carbon sources and its regulation in *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology Letters*, 19(1):11–14.
- Ma Y, Wang GY, Liu GL, Wang ZP, Chi ZM (2013) *Overproduction of poly(β -malic acid) (PMA) from glucose by a novel Aureobasidium sp. P6 strain isolated from mangrove system*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:8931–8939
- Magnuson, J.K. y Lasure, L.L. (2004) Organic acid production by filamentous fungi. En Tracz, J.S., Lange, L. (eds) *Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture and medicine*. Kluwer/Plenum, Nueva York, USA, pp 307-440
- Maldonado G. (2020) *Aseguramiento de la calidad del producto obtenido de la merma de confitería a través de un modelo de redes neuronales artificiales*. (Tesis de maestría), Programa de Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí (cap. 3)
- Manitchotpsit P, Price NPJ, Leathers TD, Punnapayak H. (2011). *Heavy oils produced by Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol Lett* 33:1151–1157.
- Manitchotpsit P, Skory CD, Peterson SW, Price NPJ, Vermillion KE, Leathers TD. (2012). *Poly(β -L-malic acid) production by diverse phylogenetic clades of Aureobasidium pullulans*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39:125–132.
- McClure, P., Blackburn, C., Cole, M., Curtis, P., Jones, J., Legan, J., Ogden, I., Peck, M., Roberts, T., Sutherland, J., Walker, S. (1994) *Modeling the growth, survival and death of microorganisms in food: the UK Food Micromodel approach*. *International Journal of Food Microbiology* 23: 265-275.
- Mellefont, L., Ross, T. (2003) *The effect of abrupt shifts in temperature on the lag phase duration of Escherichia coli and Klebsiella oxytoca*. *Int. J. Food Microbiol* 83:295-305.
- Miles, A., Misra, S., & Irwin, J. (1938). *The estimation of the bactericidal power of the blood*. *Epidemiology and Infection*, 38(6):732-749.
- Monod, J. (1949) *The Growth of Bacterial Cultures*. *Annual Review of Microbiology* 3:371-394.
- Moon SY, Hong SH, Kim TY, Lee SY. (2008). *Metabolic engineering of Escherichia coli for the production of malic acid*. *Biochem Eng J* 40: 312–320.
- Morales JA, Chavez MF, García CE. *La depreciación del peso mexicano durante 2012-2015 y su efecto en el Índice de Precios y Cotizaciones de la Bolsa Mexicana de Valores. Un análisis intersectorial*. <http://www.economia.unam.mx/assets/pdfs/econinfo/397/06MoralesVelazquez.pdf>
Fecha de consulta: 06/09/2016
- Mummey, M. (8 de Agosto de 1989). USA Patente nº 4,855,459.
- NCBI National Center for Biotechnology Information, *U.S. National Library of Medicine*, revisado en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Fecha de consulta: 27/Mayo/2019
- Özilgen, S.; Özilgen, M. (1990). *Kinetic Model of Lipid Oxidation*. *Journal of Food Science* 55(2): 498–501.
- Park, J., Vinuselvi, P., Lee, S. (2012) *The mechanism of sugar-mediated catabolite repression of the propionate catabolic genes in Escherichia coli*. *Gene* 504:116-121.

- Patience, G., & Brockrath, R. (2010). *Butane oxidation process development in a circulating fluidized bed*. Applied Catalysis A: General, 4-12
- Patterson, T. F., McGinnis, M. R., and ed. (2009). *The fungi :description. Site Doctor Fungus*. Mycoses Study Group.
- Polint S.p.A. (2016). *Malic Acid. Polynt Intermediate*. Revisado en: <http://www.polynt.com/wp-content/uploads/2017/09/Brochure-Polynt-Intermediates-Malic-Acid-separate-pages.pdf> Fecha de consulta: 11/Junio/2018
- Portilla, J. (2008). *Polímeros biotecnológicos funcionalizados para aplicaciones biomédicas I. El ácido poli(β ,L-málico)*, Barcelona: Escuela técnica superior de ingeniería industrial de Barcelona, Universidad politecnica de Cataluña.
- Powell, E. (1967) *Microbial physiology and continuous culture*. Londres: Her Majesty's Stationery.
- Presecki, A.V. y Vasic-Racki, D. (2005) *Production of L-Malic Acid by Permeabilized Cells of Commercial Saccharomyces Sp. Strains*. *Biotechnology Letters*, 27:1835-1839
- Puscaselu (Gheorghita), R., Amariei, S. (2018) *The Application Of The Peleg Model In Order To Obtain Completely Soluble Materials For Food Product Packaging*, *Journal of Applied Packaging Research*. 10(1):Article 6.
- Raymond, H., & Middlesbrough, G. (5 de octubre de 1982). USA Patente nº 4,352,755.
- Robert, V., Stegehuis, G., and Stalpers, J. (2005). *The MycoBank engine and related databases*. *International Mycological Association*. International Mycological Association. 9:9-2009.
- Ross, T. (1996) *Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology*. *Journal of Applied Bacteriology* vol 81, no. 5, p. 501-508.
- Samson, RA, Hoekstra, ES, and Frisvad, JC. (2004). *Introduction to food and airborne fungi*. 7th, Baarn, Centralalbureau voor Schimmellcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences.
- Sargent, R., Kleijnen, J. (2000) *A methodology for fitting and validating metamodels in simulation*. *European Journal of Operational Research* vol. 120, no. 1, p. 14-29.
- Servicio de Información Comunitario sobre Investigación y Desarrollo, CORDIS (2005). *Bioingeniería a escala industrial*. Revisado en: https://cordis.europa.eu/result/rcn/80213_es.html Fecha de consulta: 08/Junio/2018
- Shekari, A. (2011). *"N-Butane Partial Oxidation to Maleic Anhydride, Experimental and Kinetic Studies under transient condition"*. (Tesis Doctoral). Departamento de Ingeniería Química. Escuela Politécnica de Montréal. pp. 1-253.
- Solano, M., Vidaurre, J. (2017) *Aplicación de modelos cinéticos no estructurados en el modelamiento de la fermentación láctica de subproductos de pesca*. *Scientia Agropecuaria* vol 8, no. 4, p.367-375
- Sutherland, J. (1994) *Predictive modeling of Yersinia enterocolitica: the effects of temperature, pH and sodium chloride*. *International Journal of Food Microbiology* 21:197-215.
- Taing O, Taing K. (2007). *Production of malic and succinic acids by sugar-tolerant yeast Zygosaccharomyces rouxii*. *Eur Food Res Technol* 224:343–347.

Taylor, P. E., Esch, R., Flagan, R. C., House, J., Tran, L., and Glovsky, M. M. (2006). *Identification and possible disease mechanisms of an under-recognized fungus, Aureobasidium pullulans*. Int Arch Allergy Immunol. 139[1], 45-52.

Thirumalai Chemicals Ltd (2017) *Malic Acid*. Revisado en: <http://www.thirumalaichemicals.com/malic.html> Fecha de consulta: 11/Junio/2018

Turton, R. & Shaeiwitz, J. (2003). *Analysis, synthesis, and design of chemical processes*. Prentice-Hall.

UniProt Consortium. (2009). Taxonomy : fungi metazoa group. Site de UniProt .

Velazquez D. (2016) *La importancia de la química verde y su aplicación en la simulación del proceso para la producción de anhídrido maleico*, (Tesis de Licenciatura), Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas, Instituto Politécnico Nacional pp.36-51

Vert M, Lenz RW (1979) *Preparation and properties of poly-beta-malic acid: a functional polyester of potential biomedical importance*. Am.Chem. Soc. Div. Polym Chem Prepr 20:608–611

Wang YK, Chi Z, Zhou HX, Liu GL, Chi ZM (2015) *Enhanced production of Ca²⁺-polymalate (PMA) with high molecular mass by Aureobasidium pullulans var. pullulans MCW*. Microb Cell Fact. doi:10.1186/s12934-015-0296-3

Wei, P., Cheng, C., Lin, M. (2017) *Production of poly (malic acid) from sugarcane juice in fermentation by Aureobasidium pullulans: kinetics and process economics*. Bioresour Technol 224:581–589.

Weissermel, K., Arpe, HJ. (1981). Química orgánica industrial. España: Reverté. pp 348-355

Werpy, T. y Petersen, G., eds. (2004) *Top Value Added Chemicals From Biomass. Volume I: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas*. National Renewable Energy Laboratory, U.S. Department of Energy

West, T. P. (2011). *Malic acid production from thin stillage by Aspergillus species*. Biotechnology Letters, 33(12), 2463–2467. doi:10.1007/s10529-011-0720-7

Whalley, D., Siegfried, H. (1964) *Icumsa Methods of Sugar Analysis*, Nueva York: Elsevier, pp 13-22

Whiting, R., Buchanan, R. (1993) *A classification of models for predictive microbiology*. Food Microbiology, Vol. 10.

Wiley, J. (2007). *Maleic Anhydride, Maleic Acid and Fumaric Acid*. En *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. Vol. 15 (5ta ed.). Hoboken. pp 481

Wu S, Chen J, Pan S. (2012). Optimization of fermentation conditions for the production of pullulan by a new strain of Aureobasidium pullulans isolated from sea mud and its characterization. Carbohydr Polym 87:1696–1700.

Zan Z, Zou X (2013) *Efficient production of polymalic acid from raw sweet potato hydrolysate with immobilized cells of Aureobasidium pullulans CCTCC M2012223 in aerobic fibrous bed bioreactor*. J Chem Technol Biotechnol. doi:10.1002/jctb.4033

Zanizdra, V. (2016) *Las grasas se utilizan en la industria de alimentos y productos de confitería*. Revisado en <https://es.baker-group.net/raw-materials-and-semi-finished-products/6636-fats-are-used-in-the-food-and-confectionery-industry.html> Fecha de consulta: 10/Junio/2018

- Zelle RM, de Hulster E, van Winden WA, de Waard P, Dijkema C, Winkler AA, Geertman J-MA, van Dijken JP, Pronk JT, van Maris AJA. (2008). *Malic acid production by Saccharomyces cerevisiae: Engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export*. Appl Environ Microbiol 74:2766–2777.
- Zeng, W., Zhang, B., Chen, G.G., Li, M.X., Liang, Z.Q., (2018). *Efficient production of polymalic acid by a novel isolated Aureobasidium pullulans using metabolic intermediates and inhibitors*. Appl. Biochem. Biotechnol. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2825-0>
- Zeng, W., Zhang, B., Li, M., Ding, S., Chen, G., & Liang, Z. (2019). *Development and benefit evaluation of fermentation strategies for poly(malic acid) production from malt syrup by Aureobasidium melanogenum GXZ-6*. Bioresource Technology, 274, 479–487. doi:10.1016/j.biortech.2018.12.027
- Zhang H, Cai J, Dong J, Zhang D, Huang L, Xu Z, Cen P (2011) *Highlevel production of poly(β -L-malic acid) with a new isolated Aureobasidium pullulans strain*. Appl Microbiol Biotechnol 92: 295–303
- Zhang X, Wang X, Shanmugam KT, Ingram LO. (2011b). *L-Malate production by metabolically engineered Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 77:427–434.
- Zhang, L., Li, X., Yong, Q., Yang, S.T., Ouyang, J., Yu, S., (2016) *Impacts of lignocellulose-derived inhibitors on L-lactic acid fermentation by Rhizopus oryzae*. Bioresour. Technol. 203: 173-180.
- Zou X, Zhou Y, Yang ST (2013) *Production of polymalic acid and malic acid by Aureobasidium pullulans fermentation and acid hydrolysis*. Biotechnol Bioeng 110:2105–2113
- Zou, X., Wang Y., Tu, G., Zang, Z., Wu, X., (2015) *Adaptation and transcriptome analysis of Aureobasidium pullulans in corncob hydrolysate for increased inhibitor tolerance to malic acid production*. Plos ONE. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0121416>.
- Zou, X., Yang, J., Tian, X., Guo, M., Li, Z., Li, Y., (2016) *Production of polymalic acid and malic acid from xylose and corncob hydrolysate by a novel Aureobasidium pullulans YJ 6-11 strain*. Process Biochem 51: 16-23.
- Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F., Van't Riet, K. (1990) *Modeling of the bacterial growth curve*. Appl. Environ. Microbiol. 56 (6):1875-1881.