

Producción de ácido cítrico por fermentación

Zulay Mármol Pérez , Gisela Páez R.

Fac. de Ingeniería Universidad del Zulia

Resumen

El presente trabajo tiene por objeto estudiar la producción de ácido cítrico por fermentación sumergida con *Aspergillus niger* 4396, utilizando como fuente de carbono y energía harina de yuca (sustrato no convencional) y azúcar refinada en procesos discontinuos y continuos respectivamente. Se usó como fuente nitrogenada sulfato de amonio. La temperatura para ambos procesos se mantuvo entre 28 y 30° C. Se evaluaron las siguientes variables: Biomasa, pH, Azúcar residual, Almidón y Acido Cítrico.

Los resultados indican que con harina de yuca no se requiere la adición de la fuente de nitrógeno, su contenido es suficiente para garantizar la producción de ácido cítrico. A pH inicial de 2.0 se produjo hidrólisis ácida con la formación de dextrinas y otros productos no fermentescibles, lo que disminuyó el rendimiento (12.94% y 16.92%). A pH 5.89 el rendimiento fue superior, alcanzando un valor de 29.81%. Se observaron bajas productividades para el cultivo continuo debido a la poca concentración de ácido en el medio al iniciar el flujo continuo, aproximadamente a las 72 horas.

Palabras claves: Acido Cítrico, Fermentación.

Citric acid production by fermentation

Abstract

The following research has the purpose to study the Citric Acid Production by submerged fermentation with *A. niger* 4396, using cassava meal (unconventional substrates) and refined sugar as carbon and energy source in batch and continuous processes respectively. It was used Ammonia Sulphate as nitrogenated source. The temperature for both processes was held between 28 and 30° C. During the fermentation progression were evaluated the following variable: Biomass, pH, Residual Sugar, Starch and Citric Acid.

The results indicate that with cassava meal is not required the addition of the nitrogen source, because its nitrogen content is enough to guarantee the citric acid production. At initial pH of 2.0 it produced hydrolysis acid with formation of dextrans and others unfermentable products, it reduced the yield (between 12.94% and 16.92%). While a pH of 5.89 the yield increased to 29.81%. For continuous culture it was observed low productivity because of small acido concentration at the continuous flow beginning, approximately to 72 hrs.

Key Words: Citric Acid, Fermentation.

Introducción

Es el ácido cítrico uno de los ácidos orgánicos más utilizados, éste no es tóxico, es fácilmente asimilable, altamente soluble y por consi-

guiente el ácido orgánico más importante en la industria de procesamiento de alimentos, consumiendo ésta cerca del 60% del ácido producido⁽¹⁴⁾; también es ampliamente usado en industrias como la farmacéutica, la química y otras

como la industria de los detergentes, en la cual ha tenido una gran aceptación debido a su biodegradabilidad, sustituyendo así los polifosfatos.

En la actualidad se emplean cepas de *Aspergillus niger*, las cuales son capaces de convertir con altos rendimientos la fuente de carbono en ácido cítrico.

En el proceso de fermentación para la producción del ácido cítrico pueden ser usados sustratos tales como carbohidratos e hidrocarburos. Los carbohidratos son fuente renovable y se emplean no solamente en forma pura sino también como residuos impuros provenientes del procesamiento de comestibles.

El presente trabajo tiene por objeto estudiar la producción de ácido cítrico por fermentación usando cepas de *A. niger* 4396 en harina de yuca (sustrato no convencional) y en azúcar refinada; empleando procesos discontinuos y continuos respectivamente, con miras a cubrir la demanda de este producto.

Parte Experimental

Organismo

El organismo usado en esta experiencia fue *Aspergillus niger* 4396 obtenido de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes (Estado Mérida). Este se mantuvo en Potato Dextrosa Agar (PDA) inclinado almacenado a 4°C y renovado cada mes. Se utilizó un medio de prueba⁽²⁾ capaz de predecir la habilidad de distintas cepas de *A. niger*, para producir ácido cítrico.

Medio

El medio empleado fue básicamente el recomendado por Shu y Johnson⁽¹²⁾, usando como sustratos harina de yuca (sustrato no convencional) y azúcar refinada.

A los sustratos utilizados se les determinó Fe, Mn, Cu, Zn y Al, por espectrofotometría de absorción atómica. (Tabla 1).

El pH inicial del medio fue 2.0, no se esterilizó y nunca se observó contaminación.

La composición del medio y las condiciones iniciales están dadas en las Tablas 2 y 3.

Inóculo

Las esporas cultivadas en tubos conteniendo PDA, se transfieren usando agua estéril y bajo condiciones asépticas a matraces que contengan un volumen de medio aproximadamente igual al 10% del volumen de medio a fermentar (volumen de trabajo). La concentración de esporas, aproximadamente 3×10^8 /ml fue estimada por conteo microscópico directo usando una cámara de Neubauer.

Los matraces se incuban durante 48 horas a una temperatura de 30°C en un incubador rotatorio New Brunswick Scientific Modelo G 24, con control de temperatura y agitación. La suspensión de "pellets" así formada se transfiere bajo condiciones asépticas al fermentador principal.

Equipo

Para evaluar el comportamiento de la cepa *A. niger* 4396 en harina de yuca se utilizaron Erlenmeyers (Pyrex) con 500 ml de capacidad y un volumen de medio de 150 ml; controlando la temperatura y velocidad de agitación.

El proceso de cultivo continuo se llevó a cabo en un fermentador Bioflo Model C - 30; con un volumen de trabajo de 450 ml.

Técnicas Analíticas

Peso Seco

Las determinaciones de biomasa se realizaron con la técnica de peso seco⁽¹⁰⁾.

Acido Cítrico

El ácido cítrico en el filtrado se determinó por el método colorimétrico de Marier y Boulet,^(5,8) para la determinación directa de éste.

Azúcar Residual

El azúcar residual fue analizado por el método fenol-ácido sulfúrico de Dubois y colaboradores⁽⁴⁾.

Tabla 1.
Algunos metales importantes en la harina de yuca y azúcar refinada utilizadas como fuente de carbono y energía.

Metal	Harina de yuca (mg/Kg)	Azúcar Refinada (mg/Kg)	Límite de detección (mg/L)
Fe	68.09	1.00	0.02
Mn	N.D	0.25	0.01
Cu	21.43	N.D	0.03
Zn	31.43	N.D	0.02
Al	N.D	N.D	0.03

Tabla 2.
Composición del medio y condiciones de operación para la fermentación con harina de yuca.

Composición y condiciones iniciales	Medio 1	Medio 2	Medio 3
Harina de yuca, g/L	140.00	140.00	140.00
Almidón, g/L	50.55	49.99	52.50
SO ₄ (NH ₄) ₂ , g/L	---	1.24	---
Cantidad de N ₂ , g/L	0.70	0.96	0.70
pH	2.00	2.00	5.89
Agitación, rpm	200.00	200.00	200.00
Temperatura, °C	30.00	30.00	30.00
Vol. Trabajo, L	0.15	0.15	0.15

Almidón

Para las determinaciones de almidón se utilizó el método colorimétrico de Carter y Newter (13).

Fermentación por Carga

Sustrato utilizado: Harina de yuca.

Se realizaron fermentaciones aeróbicas a nivel de fiolas por triplicado con un volumen de trabajo de 150 ml.

Durante el curso de la fermentación se tomaron muestras por duplicado de aproximadamente 10 ml a intervalos de 48 horas durante

264 horas (11 días). Determinándose en cada caso pH, ácido cítrico y almidón.

Sustrato utilizado: Azúcar refinada.

Se llevó a cabo una fermentación por carga con un volumen de trabajo de 450 ml.

Fermentación Continua

La fermentación continua fue iniciada por inoculación en un medio por carga (Tabla 3). Adicionalmente el flujo continuo cuya composición y condiciones se dan a la Tabla 4, comenzó cuando la producción de ácido fue observada (72 hr). Se fijó una tasa de dilución 0.075 hr^{-1} (5,6) lo que significó un flujo de medio fresco de 0.563 ml/min.

Tabla 3. Composición del medio y condiciones de operación para la fermentación con azúcar refinada.

Composición y Condiciones Iniciales.	
Azúcar Refinada, g/L	140.00
(NH ₄) ₂ SO ₄ , g/L	1.24
KH ₂ PO ₄ , g/L	2.50
MgSO ₄ .7H ₂ O, g/L	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O x10 ³ , g/L	0.06
FeSO ₄ .7H ₂ O x10 ³ , g/L *	0.42
ZnSO ₄ .7H ₂ O x10 ³ , g/L	0.25
pH	2.00
Agitación, rpm**	100.00
Temperatura, °C	28-30
Vol. de Trabajo, L	0.45
Tasa de flujo de aire, vvm ***	0.70

* En el medio por carga para el proceso continuo 3 no se adicionó FeSO₄.7H₂O.

** En la etapa por carga para el proceso continuo 4 se utilizaron 150 rpm.

*** En el proceso continuo 3 y 4 se utilizaron 1.1 vvm para la etapa por carga

Se realizaron cuatro fermentaciones aeróbicas, de las cuales se varió la concentración de azúcar y de nitrógeno al momento de iniciar el flujo continuo.

En el curso de la fermentación se tomaron muestras de aproximadamente 15 ml a intervalos de 24 horas durante 120 horas (5 días). En cada caso se determinó biomasa, azúcar residual, pH y ácido cítrico. El pH inicial del medio fue 2.0 y no se controló en el curso de la fermentación

Discusión

La tabla 5 muestra los resultados obtenidos para las fermentaciones con harina de yuca. Estos indican que hubo una disminución de la fuente de carbono y energía (almidón), así como de los valores de pH; obteniéndose valores finales de pH entre 1.63 y 3.04 para valores iniciales entre 2.0 y 5.89 respectivamente.

Un elevado valor del pH inicial (5.89) favoreció la producción de ácido cítrico tal como pudo observarse en el medio 3. En los medios 1 y 2 se produjo una hidrólisis ácida al adicionarles ácido clorhídrico para ajustar el pH inicial a un valor de 2.0, originándose durante la misma dextrinas y otros productos indeseables por no ser fermen-

Tabla 4. Composición del medio y condiciones de operación al iniciar el flujo continuo.

Composición y condiciones iniciales	1	2	3	4
Azúcar refinada, g/L	140.00	115.00	85.00	95.00
(NH ₄) ₂ SO ₄ , g/L	1.24	0.62	----	0.62
KH ₂ PO ₄ , g/L	2.50	2.50	2.50	2.50
MgSO ₄ .7H ₂ O, g/L	0.25	0.25	0.25	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O x10 ³ , g/L	0.06	0.06	0.06	0.06
FeSO ₄ .7H ₂ O x10 ³ , g/L	0.42	0.42	----	0.42
ZnSO ₄ .7H ₂ O x10 ³ , g/L	0.25	0.25	0.25	0.25
pH.	2.00	2.00	2.00	2.00
Agitación, rpm	100.00	100.00	100.00	100.00
Temperatura, °C	28-30	28-30	28-30	28-30
Vol. de Trabajo, L	0.45	0.45	0.45	0.45
Tasa de flujo de aire, vvm	0.70	0.70	1.1	1.1

Tabla 5.
Resultados de la Fermentación por carga realizada con harina de yuca

Medio	pH (g/L)	Acido Cítrico (g/L)	Almidón Y _p (%)	Rend.*
1	1.63	2.00	38.59	16.72
2	1.67	1.94	35.00	12.94
3	3.04	4.80	36.40	29.81

* En base al almidón consumido.

tables. La hidrólisis ácida del almidón reduce su utilidad como sustrato para la fermentación cítrica.

La disminución de la fuente de carbono por consumo de cédula indicó la viabilidad de la misma, asociándose la disminución de pH con la producción del ácido.

Esto explica los bajos rendimientos obtenidos (12.94% - 29.81%) en los medios 1 y 2. Adicionalmente la cantidad de nitrógeno fue superior a la establecida en trabajos previos por Bracho y Socarrás⁽³⁾ para la cepa *A. niger* 4396; el valor óptimo reportado fue de 1.24 g/L de sulfato de amonio lo que corresponde a 0.26 g/L de nitrógeno. El contenido de nitrógeno para los medios 1 y 3 fue de 0.7 g/L y de 0.96 g/L para el medio 2.

Los resultados reportados con el medio 3 (pH_i = 5.89) se asocian al hecho de que la cepa *A. niger* empleada es capaz de producir un complejo de sus propias enzimas amylolíticas (alfa amilasas), las cuales hidrolizan el almidón a monosacáridas que son convertidos en ácido cítrico. La máxima actividad de la alfa amilasas está en el rango de pH: 4.5 - 7.8, dependiendo de la fuente de la enzima, las obtenidas a partir de hongos del género *Aspergillus* presentan actividad óptima a un pH de 4.6.^(1,11)

La figura 1 muestra los resultados obtenidos para la fermentación por carga con azúcar refinada; estos muestran un aumento en el consumo de la fuente de carbono y energía y en la biomasa producida; el pH disminuyó a lo largo del proceso.

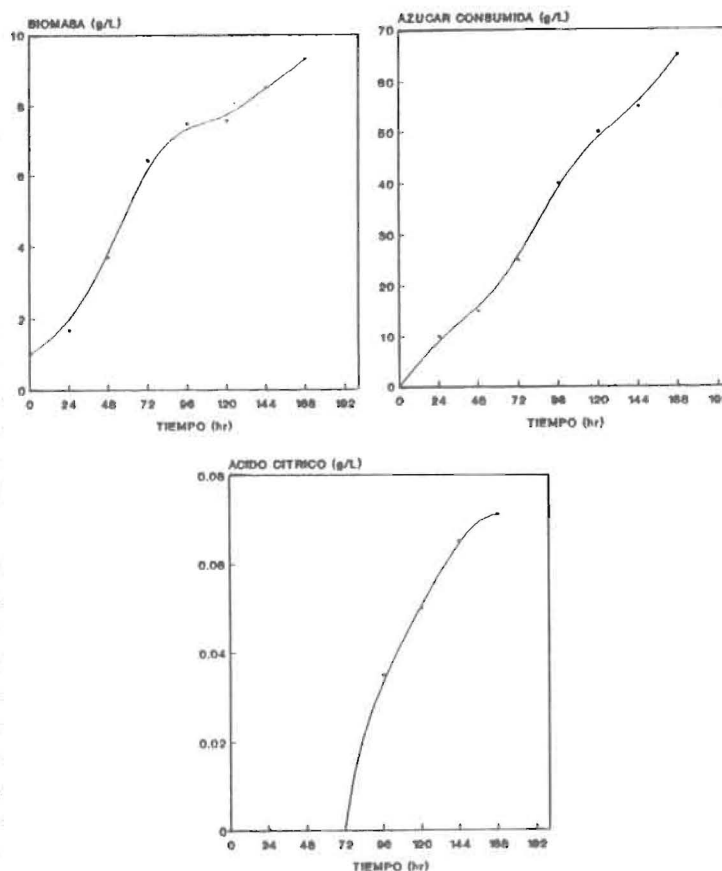
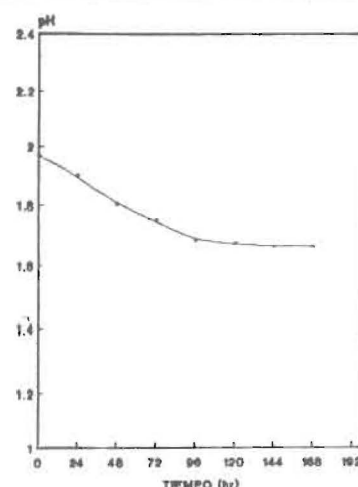


Fig. 1. Cinética de producción de ácido cítrico

Se observó un cambio en la forma de crecimiento del microorganismo a partir de las 72 hr, coincidiendo esto con lo reportado por Paéz⁽⁹⁾ y Bracho⁽³⁾. El nitrógeno suministrado en el medio

se agotó y el subsecuente aumento de la biomasa se debió a la acumulación de carbono por la célula. Al calcular los valores de la velocidad específica de crecimiento μ , Tabla 6, antes y después de las 72 horas se observó una disminución de este parámetro, como consecuencia del cambio en el mecanismo de crecimiento del hongo.

Tabla 6
Valores de velocidad específica de crecimiento para la fermentación por carga con azúcar refinada.

Variable	Valores	Unidades
μ_1	2.7×10^{-2}	hr ⁻¹
μ_2	4.7×10^{-3}	hr ⁻¹

1 Valor obtenido antes de las 72 hr.

2 Valor obtenido después de las 72 hr.

En la tabla 7 se muestran los rendimientos obtenidos. Los valores para la biomasa y el ácido cítrico fueron de 14.31 y 0.11 gramos por 100 gramos de azúcar consumida respectivamente.

Tabla 7. Rendimiento en biomasa y producto para la fermentación por carga con azúcar refinada.

Parámetro	Valores	Unidades
Y_x	14.31	%
Y_p	0.11	%

Los rendimientos están calculados en bases al azúcar consumido.

Tabla 8.
Valores en estado estacionario del cultivo continuo operando A D = 0.075 hr⁻¹.

Fermentación	pH	Biomasa (g / L)	Azúcar Utilizada (g / L)	Acido Cítrico (g / L)	Productividad (g / L · hr)
1	1.43	3.19	15.0	1.6×10^{-2}	1.2×10^{-3}
2	1.77	4.99	20.0	7.5×10^{-2}	5.6×10^{-3}
3	1.40	1.44	12.5	4.1×10^{-2}	3.1×10^{-3}
4	1.54	5.85	35.0	4.1×10^{-2}	3.1×10^{-3}

Se probó la capacidad de la cepa empleada de producir ácido cítrico, para lo cual se aplicó la técnica recomendada por Benuzzi y Segovia⁽²⁾. Los resultados indicaron que el *A. niger* 4396 es una cepa productora ya que se formó el halo transparente, característico del citrato de calcio.

La tabla 8 muestra los resultados obtenidos para el cultivo continuo operado a una tasa de dilución de 0.075 hr⁻¹. El proceso se inició como un cultivo por carga; transcurrido un tiempo aproximado de 72 horas se comenzó el flujo continuo de nutrientes, el cual se hace circular hasta alcanzar condiciones estacionarias, estas se logran pasado un tiempo usualmente igual a tres tiempos de residencia, tr. dado por la relación 1/D ó V/F donde: D es la tasa de dilución, V es el volumen y F la velocidad de flujo volumétrico del medio. El valor del tiempo de residencia fue de 13.33 horas.

Los valores de productividad alcanzados estuvieron entre 1.2×10^{-3} y 5.6×10^{-3} g/L · hr, lo cual se debió a la baja concentración de ácido cítrico existente al iniciar el flujo continuo.

Conclusiones

- Se comprobó utilizando el medio de prueba sugerido por Benuzzi y Segovia⁽²⁾ que la cepa *A. niger* 4396 es productora de ácido cítrico.

- La adición de la fuente nitrogenada (Sulfato de Amonio) al medio 2 preparado con harina de yuca, sustrato no convencional, no favoreció la producción de ácido cítrico. El contenido de nitrógeno en la harina es suficiente para garantizar el crecimiento y la producción de ácido.

- Un valor de pH inicial de 2.0 no favoreció la fermentación ya que se originaron productos de hidrólisis no fermentescibles. En harina de yuca un pH inicial de 5.89 produjo los mejores resultados.

- Se encontró que durante la fermentación de ácido cítrico la cepa de *A. niger* 4396 fue capaz de producir sus propias enzimas amylolíticas, las cuales hidrolizan el almidón a azúcares disponibles.

- Al calcular el valor de la velocidad específica de crecimiento, antes y después de la 72 horas, se observó una disminución de este parámetro, indicando un cambio en el mecanismo de crecimiento del hongo.

- El flujo continuo debe iniciarse una vez que en el cultivo por carga se alcance la máxima producción de ácido cítrico.

Reconocimiento

Se agradece al CONSEJO DE DESARROLLO CIENTIFICO Y HUMANISTICO (CONDES) de la Universidad del Zulia el financiamiento a esta investigación.

Referencias

- 1.- BERMAN, THOMAS. Enzyme Handbook, Vol. II. Springer-Verlay. Berlin Heidelberg. New York. 1969.
- 2.- BENUZZI, A.; Segovia, R. "Estudio Sobre la Preselección de Cepas de *Aspergillus niger* Destinadas a la Producción de Acido Cítrico." *Acta Científica Venezolana*. 40. 195 - 197. 1989.
- 3.- BRACHO, D.; Socarrás, A. "Influencia de la Concentración de Nitrógeno para la Síntesis de Acido Cítrico". L.U.Z. Facultad de Ingeniería. Escuela de Química. 1988. (Tesis de Grado).
- 4.- DUBOIS, M., Gilles, K.A; Hamilton, J.K." Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances". *Analytical Chemistry*. 28 (3) 350 -356. 1956.
- 5.- HARTFORD, C."Rapid Spectrophotometric Method for the Determination of Itaconic, Citric, Aconitic, and Fumaric Acids". *Analytical Chemistry*. 34: 426 - 428. 1962.
- 6.- KRISTIANSSEN, B.; Sinclair, C.G. Production of citric Acid in Continuous Culture. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XXI, 297 - 315. 1979.
- 7.- KRISTIANSSEN, B.; Charley, R. "Continuous Process for Production of Citric Acid." *Advances in biotechnology*, Vol 1. 221 - 227. 1987.
- 8.- MARIER, J.R; Boulet, M." Direct Determination of Citric Acid in Milk with an Improved Pyridine - Acetic Anhidride Method. *Journal Dairy Science*. 41. 1683 - 1692. 1958.
- 9.- PAEZ, GISELA. " Cinética de Producción de Acido Cítrico por Fermentación Sumergida." L.U.Z. Facultad de Ingeniería. 1986. (Tesis de Magister).
10. PIR, S.J."Principles of Microbe and Cell Cultivation". Blackwell, Oxford, 1975.
- 11.- PRESCOTT & DUNN S. *Industrial Microbiology*.
- 12.- SHU, P.; Johnson, M.J. *Journal Bacteriological*. 56:577, 1948.
- 13.- SIMON, C.M., Harvey, T." Passion Fruit Starch and Effect on Juice Viscosity. Determination of Starch Content". *Journal of Food Science*. vol. 39. No. 3. 432. 1974.
- 14.- Técnicas de Cultivo Sumergido de *Asperquillus Foetidus* para la Producción de Acido Cítrico. Fundación CIEPE. Venezuela. 1 - 29. 1987.

Recibido el 31 de Octubre de 1990

En forma revisada el 08 de Septiembre 1992