

## Effect of initial pH, addition of $Fe^{++}$ , methanol and the dilution rate on the production of citric acid

Marisela Rincón B., Gisela Páez R., José Ramón Ferrer, Zulay Mármol and Eduardo Ramones

División de Postgrado, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia, Apdo. 526  
Maracaibo, Venezuela

### Abstract

This study assesses the effect of the dilution rate in citric acid production by continuous fermentation using sucrose as the carbon and energy source and  $(NH_4)_2SO_4$  as the nitrogenated source. The inocules were prepared aerobically by incubating an *A. niger* 46890 spore suspension. The batch processes were realized in culture flasks of 0.5L and in a fermentator of 7.5L. The continuous processes were realized in a fermentator of 0.45L. The temperature for both processes was maintained between 28-30°C. The effect of pH, addition of  $Fe^{++}$  and of 3% of methanol to the medium was determined. During the course of fermentation the following variables were evaluated: pH, dry weight, sucrose and citric acid consumption. The results indicated that the optimum initial pH for production of citric acid was 2. Non-addition of  $Fe^{++}$  to the medium improved acid production. At  $pH_i=2$  without addition of  $Fe^{++}$ , the yields reached 2.06% of citric acid and 21% in biomass. These yields were increased upon addition of 3% of methanol, reaching 3.68% and 22.31% in product and biomass, respectively. The citric acid concentration rose up to  $0.040h^{-1}$  when dilution rate was increased. The optimum dilution rate was found to be  $0.035 h^{-1}$  with a productivity of  $0.035 g/L-h$  and citric D of  $0.040h^{-1}$ .

**Key words:** Citric acid, continuous fermentation, dilution rate.

## Efecto del pH inicial, la adición de $Fe^{++}$ , metanol y la tasa de dilución en la producción de ácido cítrico

### Resumen

Se evaluó el efecto del pH inicial, la adición de  $Fe^{++}$ , metanol y la tasa de dilución en la producción de ácido cítrico, en cultivo por carga y continuo utilizando azúcar refinada como fuente de carbono y energía, y  $(NH_4)_2SO_4$  como fuente nitrogenada. Los inóculos se prepararon incubando aeróbicamente durante 48 h una suspensión de esporas de *A. niger* 46890. Los procesos por carga se realizaron en frascos de cultivo de 0.5 L y en un fermentador de 7 L. Los procesos continuos se realizaron en un fermentador de 0.45 L. Para ambos procesos la temperatura fue de 28-30°C. Se determinó el efecto del pH inicial, la adición ó no de  $Fe^{++}$  y de un 3% de metanol al medio. Durante el curso del cultivo se midió pH, peso seco, azúcar consumida y ácido cítrico. Los resultados indicaron que el pH óptimo para la producción de ácido cítrico fue 2. La no adición de  $Fe^{++}$  al medio de fermentación favoreció la producción de ácido. A pH 2 sin adición de  $Fe^{++}$  se alcanzaron rendimientos de 2.06% en producto y 21% en biomasa. Estos rendimientos se incrementaron con la adición de un 3% de metanol a 3.68% y 22.31% en producto y biomasa respectivamente. La concentración de ácido cítrico incrementa con el aumento de la tasa de

dilución, hasta  $0.040 \text{ h}^{-1}$ . Se obtuvieron valores de D óptimo iguales a  $0.035 \text{ h}^{-1}$ , con una productividad de  $0.035 \text{ g/L-h}$  y un D crítico igual a  $0.040 \text{ h}^{-1}$ .

**Palabras claves:** Acido cítrico, fermentación continua, tasa de dilución.

## Introducción

Muchos microorganismos son capaces de transformar las sustancias químicas del medio en que viven, con la finalidad de satisfacer sus necesidades energéticas; el hombre ha aprendido a dirigir éstos procesos, eligiendo adecuadamente los microorganismos y las condiciones, obteniendo así un gran número de productos útiles como resultado de dicha actividad. Un ejemplo es la producción de Acido Cítrico por el hongo *Aspergillus niger*.

En Venezuela, no se produce ácido cítrico. Las importaciones según el Anuario Estadístico de Comercio Exterior [1], para 1991 fue de 1.905.531 Kg a un costo de \$ 2.525.125. Estos elevados costos, así como, la situación actual determina la importancia de realizar estudios para la producción de ácido cítrico con el propósito de sustituir la importación y satisfacer la demanda nacional. Recientemente se ha estudiado la producción de este ácido con diversas cepas de *A. niger* empleando procesos discontinuos y continuos con diferentes sustratos y variadas fuentes de nitrógeno.

Los objetivos del presente trabajo fueron: 1. Evaluar el efecto de la tasa de dilución en la producción de ácido cítrico usando la cepa de *A. niger* 46890. 2. Medir el efecto del pH inicial sobre la producción y 3. La adición ó no de  $\text{Fe}^{++}$  al medio de cultivo empleado en el proceso. Adicionalmente se realizaron cultivos con un 3%

de metanol [2] agregado antes de la inoculación para evaluar el efecto de este alcohol sobre la producción del ácido.

## Procedimiento Experimental

### Microorganismo

Se utilizó la cepa del hongo *Aspergillus niger* 46890 obtenido de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes (U.L.A.), Edo Mérida. La cepa fue mantenida y renovada cada mes en tubos de ensayo conteniendo agar papa dextrosa (PDA) los cuales se almacenaron a una temperatura de  $4^\circ\text{C}$ . La habilidad productora de la misma fue comprobada empleando la técnica propuesta por Benuzzi y Segovia [3].

### Medio

El medio empleado fue el recomendado por Shu y Johnson [4], utilizando como sustrato azúcar refinada, a la cual se le determinó la concentración de Fe, Mn, Cu, Zn y Al por espectrofotometría de absorción atómica (Tabla 1).

La composición del medio y las condiciones iniciales están dadas en la Tabla 2. Se evaluó el comportamiento y la producción de ácido cítrico a valores de pH inicial del medio de 2, 4 y 6. A pH inicial de 2 no se esterilizó. A pH inicial de 4 y 6 se esterilizó a  $121^\circ\text{C}$  por 15 min. No se observó contaminación del medio en ninguno de los casos.

Tabla 1  
Metales importantes en el azúcar refinada utilizada como fuente de carbono y energía

Metal	mg/Kg	Límite de detección (mg/Kg)
Fe	1.00	0.02
Mn	0.25	0.01
Cu	N.D	0.03
Zn	N.D	0.02
Al	N.D	0.03

Tabla 2  
Composición del medio y condiciones de operación para las fermentaciones realizadas

Composición y Condiciones Iniciales	Por Carga (M <sub>1</sub> )	Continua (M <sub>2</sub> )
Azúcar refinada, g/L	140.00	65.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , g/L	1.24	0.62
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , g/L	2.50	2.50
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, g/L	0.25	0.25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O x10 <sup>3</sup> , g/L	0.06	0.06
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O x10 <sup>3</sup> , g/L	0.42	0.00
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O x10 <sup>3</sup> , g/L	0.25	0.25
Metanol, %	0 y 3	3
pH	2, 4, 6	1.59
Agitación, rpm	200	200
Temperatura, °C	28-30	28-30
Vol. de trabajo, fiolas,L	0.200	
Vol. de trabajo, Fermentador,L	0.500	0.45
Flujo de aire, Fermentador, vvm	2.2	2.2

### Preparación del Inóculo

5 ml de una suspensión densa de esporas fue adicionada a los frascos de cultivo de 500 ml conteniendo 200 ml de medio cuya composición está especificada en la Tabla 2 con 0% de metanol. La concentración de esporas fue de  $3 \times 10^8$  esporas / ml, medida por conteo directo utilizando una cámara de Neubauer. Se incubaron durante 48 horas a 30°C en un incubador rotatorio New Brunswick Scientific modelo G24 con control de temperatura y agitación.

Posteriormente se transfirió la suspensión de "pellets" así formada al fermentador principal, representando dicha suspensión un 10% (V/V), con respecto al volumen del medio de producción empleado.

### Equipos

Se utilizaron inicialmente frascos de cultivo de 500 ml y un volumen de trabajo de 200 ml para evaluar el comportamiento de la cepa a diferentes valores de pH inicial del medio. Un fermentador Microferm Fermentor, modelo MF-107 New Brunswick Scientific Co., INC. con una capacidad de 7.5 L y un volumen de trabajo de 5 L fue utilizado para la fermentación por carga y un fermentador Bioflo Model C30, con un

volumen de trabajo de 0.45 L para la fermentación continua.

### Técnicas Analíticas

**Determinación de biomasa:** Para las determinaciones de biomasa se utilizó la técnica de peso seco [5]. Las muestras se filtraron usando papel de filtro whatman #1, previamente secado durante 24 h a 80-85°C y tarado. El residuo filtrado se lavó con agua destilada, se secó a 80-85°C durante 24 h; se enfrió en un desecador y luego se pesó.

**pH:** Se determinó utilizando un pH-metro digital marca Corning 140.

**Acido cítrico:** Se cuantificó por el método colorimétrico para la determinación directa de ácido cítrico de Marier y Boulet [6].

**Azúcar residual:** Se determinó por el método fenol-ácido sulfúrico de Dubois y Col. [7] para determinación de azúcares totales.

**Proceso por carga:** Se utilizó azúcar refinada como sustrato. Se realizaron cultivos en frascos erlenmeyer por triplicado con un volumen de trabajo de 0.2L para evaluar el efecto del pH inicial del medio en la producción del ácido, con y sin adición de Fe<sup>++</sup>, debido a que una de las condiciones esenciales para la producción de

Tabla 3  
Resultados del proceso por carga

Tiempo (h)	Con adición de Fe <sup>++</sup>				Sin adición de Fe <sup>++</sup>			
	pH	Biomasa (g/L)	Azúcar resid.(g/L)	Acido Cit. (mg/L)	pH	Biomasa (g/L)	Azúcar resid.(g/L)	Acido Cit. (mg/L)
pHi = 2								
0	2.0	0.76	140	0	2.0	0.91	140	0
48	1.91	2.94	115	0	1.93	0.99	120	0
72	1.84	3.29	110	16	1.81	3.88	105	20
96	1.83	4.03	105	25	1.79	3.93	105	30
360	1.64	15.05	65	600	1.67	14.3	75	1380
720	1.51	18.60	47	750	1.53	19.0	91	1880
pHi = 4								
0	4.0	1.9	140	0	4.00	2.02	140	0
48	2.51	3.53	120	0	2.38	2.89	110	0
72	2.3	5.5	110	8	2.28	5.77	110	8
96	2.29	7.75	110	50	2.26	8.29	110	50
360	2.18	14.26	44	150	2.13	14.15	42	300
696	1.96	19.62	40	250	1.97	18.20	40	500
pHi = 6								
0	6.0	1.9	140	0	6.0	1.82	140	0
48	2.55	4.22	105	0	2.57	3.38	105	0
72	2.48	5.44	105	34	2.46	5.34	105	42
96	2.43	6.68	105	42	2.45	6.53	95	62
360	2.29	14.57	58	600	2.31	15.57	55	620
696	1.99	20.16	30	620	2.07	18.77	30	770

ácido cítrico por cultivo sumergido es la deficiencia de Fe<sup>++</sup>[8]. Se realizaron otros cultivos añadiendo al medio un 3% de metanol antes de la inoculación y sin adición de Fe<sup>++</sup>, ya que algunos investigadores encontraron que la adición de un 3% de metanol al medio incrementa la producción del ácido [8]. Se realizaron cultivos en el fermentador por carga con un volumen de trabajo de 5 L. Durante el curso de los mismos se tomaron muestras por duplicado de 10 ml a intervalos de 24 horas durante 43 días, determinándose, en cada caso, pH, ácido cítrico, biomasa y azúcar consumida.

Se aplicó el modelo propuesto por Righe-lato y col [9,10] para organismos filamentosos con crecimiento en forma de pellets calculándose los parámetros del modelo.

**Proceso continuo:** Fue iniciado por inoculación de un medio por carga sin adición de Fe<sup>++</sup> y con 3% de metanol. El flujo continuo, cuya composición y condiciones se indican en la Tabla 1, se inicia cuando la producción de ácido en el cultivo por carga está cercano al máximo valor [11,12], entre los días 15 y 18 del cultivo. La Tasa de Dilución se varió entre 0.02 h<sup>-1</sup> y 0.1 h<sup>-1</sup> evaluando el efecto en la producción. En cada caso se determinó la biomasa, ácido cítrico y pH hasta alcanzar condiciones estacionarias [13,14].

## Resultados y Discusión

En la Tabla 3 se reportan los resultados obtenidos en el cultivo por carga a un pH inicial de 2, 4 y 6 con y sin adición de Fe<sup>++</sup>. Durante el

curso de la fermentación se observó un incre-

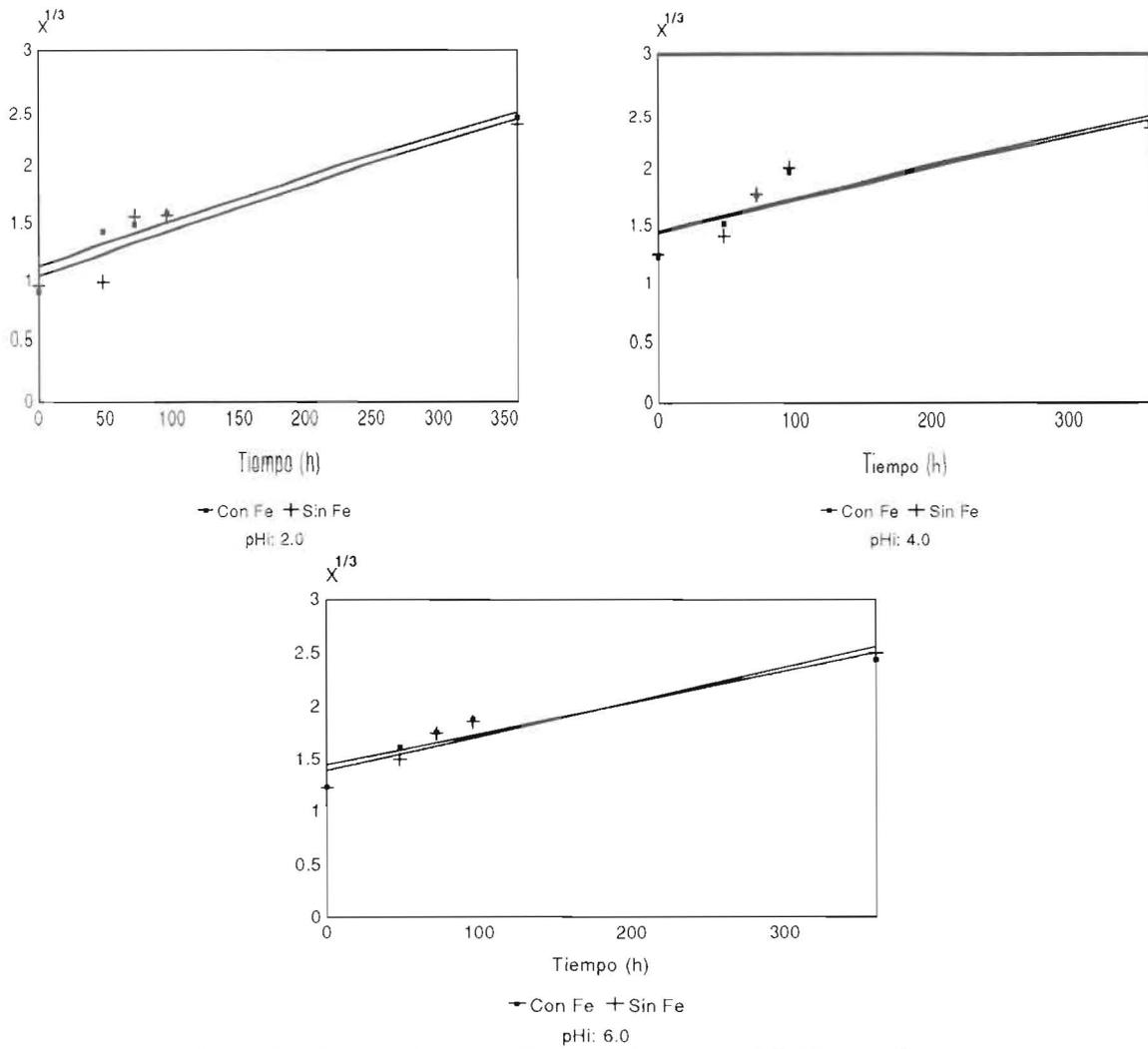


Figura 1. Modelamiento del crecimiento del *A. niger* 4396 en cultivo por carga.

Tabla 4

Valores de k y coeficiente de correlación, r, según la ecuación  $x^{1/3} = x_0^{1/3} + kt$  para los procesos por carga

pH	Con adición de Fe <sup>++</sup>		Sin adición de Fe <sup>++</sup>	
	k	r	k	r
2	0.00386	0.969	0.00391	0.945
4	0.00294	0.919	0.00287	0.891
6	0.00293	0.943	0.00320	0.958

mento en el consumo de la fuente de carbono y en la producción de biomasa; el pH disminuyó a lo largo del proceso. La producción del ácido se inició a partir de las 72 h, coincidiendo con el agotamiento del nitrógeno suministrado en el medio, [15, 16] y el aumento en la biomasa por la acumulación de carbono en la célula [13]. Los resultados obtenidos indicaron que la cinética

del crecimiento se ajustó al modelo  $X^{1/3} = X_0^{1/3} + kt$  [9]. Esta ecuación representa mejor el crecimiento de hongos en forma de "pellet" que el modelo exponencial de Monod. La Figura 1 muestra el ajuste de datos obtenidos al modelo. Los valores de k y el coeficiente de correlación, r, se presentan en la Tabla 4.

Tabla 5  
Resultados del proceso por carga con adición de 3% de metanol al medio

Tiempo (h)	pH	Biomasa (mg/L)	Azúcar residual (g/l)	Acido Cítrico (mg/L)
0	2.0	0.76	140	0
48	1.74	0.90	105	0
72	1.68	1.23	100	0
96	1.67	4.56	95	5
144	1.62	5.04	95	10
264	1.61	11.89	93	325
360	1.58	15.55	73	600
432	1.50	19.65	49	3350
720	1.37	21.06	49	3350
1032	1.37	19.49	49	3350

Tabla 6  
Rendimiento para los procesos por carga con 3% de metanol

k	r	Y <sub>x</sub> .%	Y <sub>p</sub> .%
0.0044	0.965	22.31	3.68

Y<sub>x</sub>: Se define como 100 gramos de biomasa producida por 100 gramos de azúcar consumida.

Y<sub>p</sub>: Se define como 100 gramos de ácido producido por 100 gramos de azúcar consumida.

Al comparar los valores obtenidos a los diferentes pH inicial del medio, se deduce que el pH<sub>i</sub> óptimo para la producción de ácido cítrico es 2. Yigitoglu y col (17), obtuvieron altos rendimientos en la producción de ácido cítrico a pH inicial de 2.5, reportando este valor como óptimo, a pH superiores se reduce considerablemente la concentración de ácido. Adicionalmente consideran importante el mantenimiento del pH del cultivo en el rango de 1.8 a 2.5. La no adición de Fe<sup>++</sup> al medio de cultivo favoreció en todos los casos la producción del ácido. La concentración de elementos trazas (Fe<sup>++</sup>, Cu<sup>++</sup>, Zn<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>) en la fuente de carbono y energía (Tabla 1), afectan el cultivo y son factores determinantes en el rendimiento del ácido (17). A pH<sub>i</sub> = 2 sin adición de Fe<sup>++</sup> se obtuvo un valor de 1.88 g/L de ácido a los 18 días de cultivo; 0.5 g/L y 0.77 g/L se obtuvieron a pH<sub>i</sub> 4 y 6 respectivamente.

Los mayores rendimientos para los procesos discontinuos se obtuvieron a pH<sub>i</sub> = 2 sin adición de Fe<sup>++</sup>, con 21% para la biomasa y un 2.06% en producto, incrementando los obtenidos hasta ahora con la misma cepa de 14.31% para la biomasa y 0.11% en ácido cítrico, aunque siguen siendo muy bajos en relación a los reportados (15,16).

Los resultados de la fermentación por carga con adición de 3% de metanol [8] se presentan en la Tabla 5. Las Figura 2 y 3 representan la cinética de la producción y el ajuste de los datos al modelo propuesto. Los rendimientos obtenidos en producto y biomasa se muestran en la Tabla 6, así como los valores de k y el coeficiente de correlación, r. La adición de metanol incrementó la producción de ácido de 1.88 a 3.35 g/L obteniendo un rendimiento de 3.68% en producto y de 22.31% en biomasa.

El flujo continuo se inició a partir del día 15 del cultivo por carga, cuando se alcanzó una

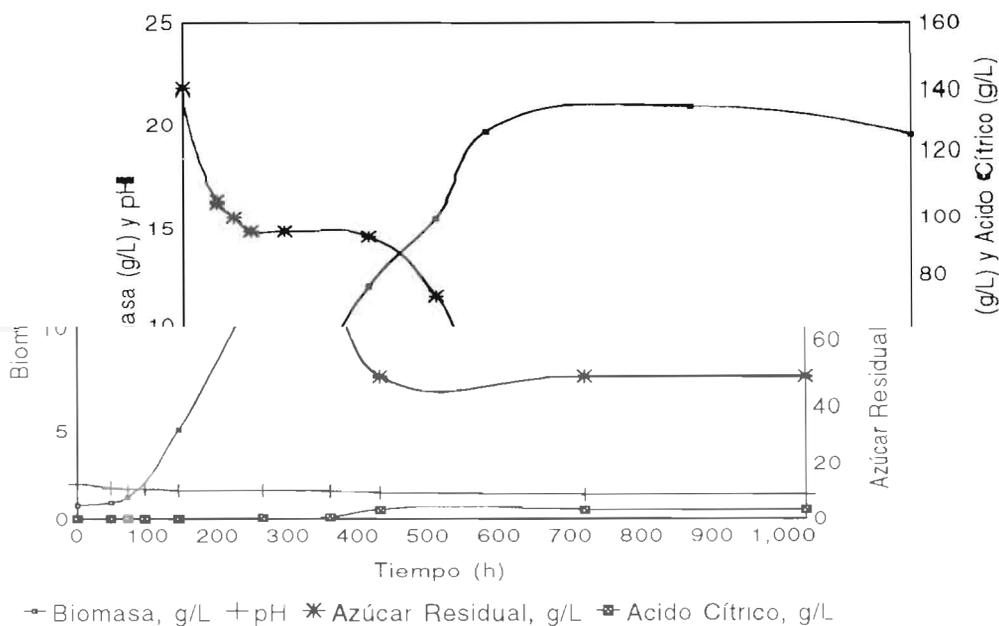


Figura 2. Cinética de la producción de ácido cítrico. Metanol 3%.

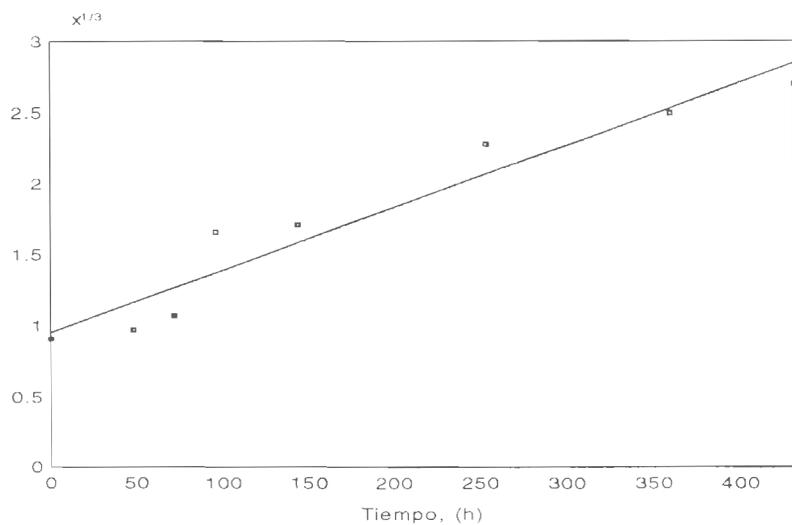


Figura 3. Ajuste de los datos de crecimiento al modelo,  $x^{1/3} = x_0^{1/3} + \mu t$ , [9].

concentración cercana a la máxima producción de ácido y se mantuvo hasta lograr condiciones estacionarias (aproximadamente  $3Tr$ , donde  $Tr = 1/D \delta V/F$ ) [10,12].

Los resultados obtenidos para el cultivo continuo se reportan en la Figura 4. Se observa que la concentración de ácido cítrico incrementa con el aumento de la tasa de dilución, siempre y cuando no exceda un valor máximo de  $D$ , denominado  $D$  crítico.

El valor óptimo se tiene a  $D = 0.035 \text{ h}^{-1}$  muy cercano al valor de velocidad específica de crecimiento  $\mu = 0.044 \text{ h}^{-1}$ . La tasa de dilución crítica  $D_c = 0.040 \text{ h}^{-1}$  a la cuál el cultivo comienza a ser lavado del fermentador.

Los valores de productividad alcanzados estuvieron entre  $1.2 \times 10^{-2}$  y  $3.5 \times 10^{-2}$ , incrementando a medida que aumenta la tasa de dilución hasta el valor de  $D_c$ .

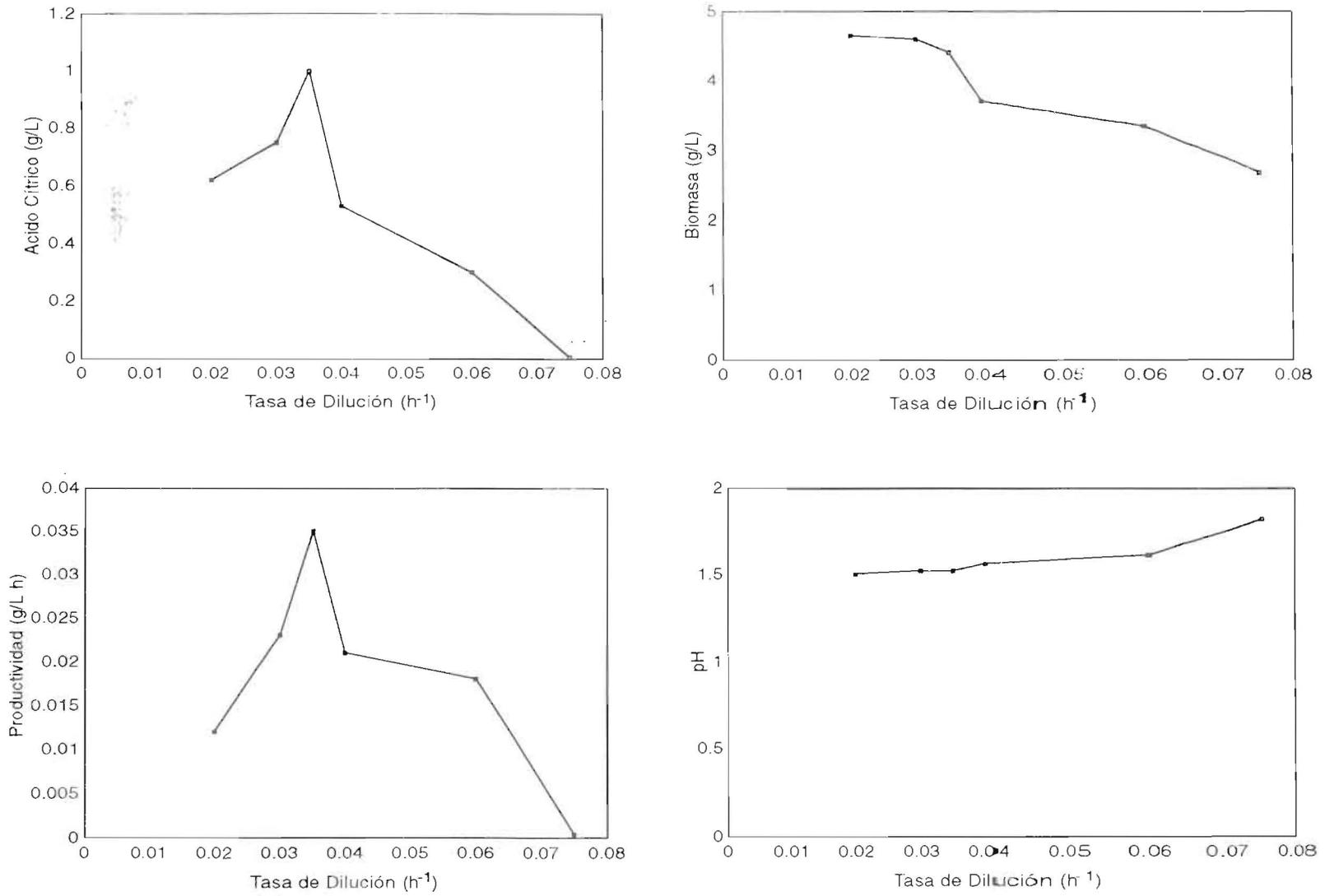


Figura 4. Cultivo continuo. Variación de la concentración de ácido nítrico, biomasa, productividad y pH con la tasa de dilución.

### Conclusiones

1.- El pH óptimo para la producción de ácido cítrico por la cepa *A. niger* 46890 es 2.

2.- La cantidad de hierro que proporciona la fuente de carbono y energía, 1 mg/Kg, es suficiente para la producción de ácido cítrico, ya que la no adición de hierro al medio favoreció en todos los casos la producción del ácido.

3.- Al evaluar la producción de ácido a los diferentes valores de pH inicial, se obtuvo la mayor producción a pH = 2 sin adición de hierro, con un valor de 1.88 g/L a los 18 días de cultivo.

4.- La adición de un 3% de metanol al medio incrementó la producción de ácido y biomasa a 3.35 g/L y 21.06 g/L respectivamente.

5.- La concentración de ácido cítrico incrementa con el aumento de la tasa de dilución, siempre y cuando no exceda el valor de D crítico, D<sub>c</sub>. La tasa de dilución óptima fue 0.035 h<sup>-1</sup> y la tasa de dilución crítica fue 0.040 h<sup>-1</sup>.

### Agradecimiento

Se agradece al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico el financiamiento a esta investigación.

### Referencias Bibliográficas

- Anuario Estadístico de Importaciones. República de Venezuela, Ministerio de Secretaría de la Presidencia Tomo II. 1992.
- Kumar, K.; Ethiraj, S. "Influence of Methanol and ground nut oil on Citric Acid Production from sugar cane juice by *Aspergillus niger*". International Sugar Journal. Vol. 78. (1976). 13-15.
- Benuzzi, A.; Segovia, R. "Estudio sobre la Preselección de cepas de *Aspergillus niger* destinadas a la Producción de Acido Cítrico". Acta Científica Venezolana. 40. (1989). 195-197.
- Shu, P.; Johnson, M.; "Citric Acid Production by Sumerged Fermentation with *Aspergillus niger*". Ind. Eng. Chem. 40(7). (1948). 1202-1205.
- Pirt, S. J: "Principles of Microbe and all cultivation". Blackwell, Scientific Publication. (1975).
- Marier, J.R.; Boulet, M. "Direct Determination of Citric Acid in milk with an Improved Pyridine - Acetic Anhidride Method". Journal Dairy Science. 41. (1958). 1683-1692.
- Dubois, M.; Gilles, K.; Hamilton, J.K. "Colorimetric method for Determination of Sugars and related Substances". Analytical Chemistry. 28(3). (1956). 350 - 356.
- Shu, P.; Johnson, M.J. "Journal Bacteriological". 56. (1948). 577.
- Righelato, R. C. "The Filamentous Fungi" Vol. 1 Edit. Edward Arnold. Londres. (1975).
- Quintero, R.: "Ingeniería Bioquímica". Departamento de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. 3. 43-53. 4.(1981). 57-67.
- Hernández, E. "Cultivo Continuo de Microorganismos". Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia. Vol. 2 (4). (1974). 3-22.
- Carrizales, V.: "Fermentaciones Industriales". Tomo I. 4. (1982). 57-67.
- Kristiansen, B.; Sinclair, C.G. "Production of Citric Acid in Continuous Culture". Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXI. (1979). 297-315.
- Kristiansen, B. Charley, R. "Continuous Process for Production of Citric Acid". Advances in Biotechnology, Vol 1. (1987). 221-227.
- Mármol, Z.M. "Producción de Acido Cítrico por Fermentación". Tesis de Magister. L.U.Z. Facultad de Ingeniería. Septiembre (1990).
- Páez, G. "Cinética de Producción de Acido Cítrico por Fermentación Sumergida". Tesis de Magister. L.U.Z. Facultad de Ingeniería. (1986).
- Yigitoglu, M.; McNeil, B.; Kristiansen, B. "Effect of pH on Citric Acid Production in a Stirred Tank Reactor" J. Chem. Tech. Biotechnol. Vol 54. (3). (1992). 304.

Recibido el 14 de Junio de 1994

En forma revisada el 15 de Marzo de 1995