

Universidad de Costa Rica, UCR. San José, Costa Rica.  
Octubre 6-9, 2020.

## Producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger* a partir de miles finales de la caña de azúcar.

Quintana D. María Berenice, Rojas M. Jocelyn, Contreras L. José L., Nuño L. Leticia, Luna P. Ricardo.

### Resumen.

Con la intención de aprovechar un subproducto de la industria azucarera mexicana, se examinan las mieles finales de la caña (melaza) como sustrato en la producción de ácido cítrico empleando *Aspergillus niger*. Para este sustrato se realizó una comparación con o sin tratamiento de hidrólisis ácida, para poder comparar la producción de ácido cítrico al proporcionarle al hongo una fuente de carbono más o menos fácil de asimilar. El sustrato también recibió un tratamiento con resina de intercambio catiónico, para la reducción y/o eliminación de los elementos traza que influyen en el proceso de fermentación. El hongo *Aspergillus niger* fue seleccionado por su facilidad de manejo, su capacidad para fermentar una gran variedad de sustratos y su alto rendimiento. El proceso de fermentación se desarrolló en cultivo sumergido en un reactor agitado con rastreo de las variables con el tiempo.

### Introducción.

El ácido cítrico es un producto con una gran demanda mundial, debido a sus aplicaciones en la industria farmacéutica, alimentaria, cosmética, plásticos, detergentes y en la manufactura de tintas y colorantes. La producción industrial de ácido cítrico se realiza por fermentación a partir de microorganismos como levaduras, bacterias, hongos.

La producción de azúcar en México durante 2019 es 6,425,000 toneladas, de las cuales se obtuvieron 2,030,000 toneladas de melaza, el uso de este recurso es principalmente como alimento para ganado y se busca maximizar su aprovechamiento con la producción de ácido cítrico.

El contenido de azúcares en la melaza es de 40-50% en forma de sacarosa, glucosa y fructosa. Se ha reportado que la sacarosa es la fuente de carbono más conveniente seguida de la glucosa, fructosa y lactosa [1]. El *Aspergillus niger* puede consumir rápidamente azúcares simples como glucosa y fructosa, el microorganismo posee un enlace en el micelio que hidroliza la sacarosa en sus monómeros [2].

En la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger*, la temperatura, el pH, agitación, fuente de carbono y nitrógeno, iones metálicos, niveles de nutrientes, concentración de fosfato, son los principales factores que regulan la morfología del microorganismo y el proceso fermentativo [2-3].

### Condiciones experimentales.

El hongo de *Aspergillus niger* fue adquirido del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional con la clasificación CDBB623. Para la preservación de la cepa se empleó Agar de dextrosa y papa (PDA), en tubos de agar inclinado incubados a 28°C durante 6 días y posteriormente mantenidos en refrigeración a 4°C.

La melaza como subproducto de la industria azucarera es una fuente de carbono, cuya composición es: 23.4% o menos de agua, 53.5% o más de azúcares y 23.1% o menos de no azúcares. Los azúcares están compuestos de (60% - 63%) en peso sacarosa, (6% - 9%) en peso glucosa y (5% - 10%) en peso fructosa y los no azúcares están compuestos por 33% de sustancias inorgánicas ( $Fe^{3+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $As^{3+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^+$ ,  $Pb^+$  y  $Cl^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ), 42% corresponde a sustancias nitrogenadas (aminoácidos, péptidos, colorantes) y el 25% de sustancias orgánicas libres de nitrógeno (ácidos carboxílicos, alcoholes, fenoles, ésteres, vitaminas, gomas y dextranos) [4].

La melaza es rica en compuestos que contienen nitrógeno y raramente se tienen que sustituir con alguna otra fuente del mismo [7]. La concentración de fósforo requerida por el hongo para una máxima producción de ácido cítrico es 0.5 a 5 g/l [6].

**Pretratamiento de la melaza.** La hidrólisis ácida se llevó a cabo para incrementar la disponibilidad de la melaza y elevar la producción de ácido cítrico, se utilizó el procedimiento propuesto por Sikandier [7], el cual consiste en diluir al 25% el nivel de azúcar de la melaza, agregando 35 ml de  $H_2SO_4$  1N por cada litro de solución y hervir durante media hora, dejar enfriar y neutralizar la solución con CaO, dejar reposar durante 12 horas para que se lleve a cabo la clarificación. Finalmente diluir al 15% el sobrenadante líquido.

Con la finalidad de remover los iones de metales pesados, se agregó una cantidad de resina al sustrato manteniéndolo agitado por 30 minutos para después filtrar. No todos los iones deberán ser removidos durante este proceso puesto que algunos de ellos, son necesarios para el crecimiento del micelio de *Aspergillus niger* [8].

La concentración inicial de melaza utilizada para cada sustrato fue de 150g por litro de solución, a excepción de los sustratos hidrolizados donde la concentración fue de 37.5 g por litro de solución (Tabla 1).

Tabla 1. Condiciones de experimentación utilizadas en la fermentación.

Experimentación	Medio 1	Medio 2	Medio 3	Medio 4
Fuente de carbono (g/l)	37.5	37.5	150	150
Gramos de resina catiónica	350	175	175	350
Hidrólisis	Si	Si	no	no

El inoculo consistió en una suspensión de esporas, que se produjo por lavado del cultivo del hongo. La técnica consistió en agregar una solución salina estéril (0.85% NaCl) y agitar vigorosamente durante un minuto, con la finalidad de arrastrar las esporas maduras. El inoculo representó el 1% (v/v) del volumen de operación del reactor (2.1 l).

Para llevar a cabo la fermentación sumergida, se adicionó el inoculo a un reactor de vidrio, enchaquetado con agitación mecánica por medio de un impulsor tipo Rushton de cuatro paletas de acero inoxidable (200 rpm). La agitación intensiva está asociada al desarrollo de los filamentos que producen el ácido cítrico, además, el esfuerzo cortante puede causar la ruptura de los filamentos que a su vez generan nuevos filamentos productores de ácido cítrico [3].

El aire se hizo pasar a través de una manguera conectada a una línea de aire estéril, con un flujo (5 l/min) controlado mediante un rotámetro. La temperatura del reactor se mantuvo  $30 \pm 2^\circ C$  por medio de la chaqueta del reactor. La biomasa fue separada mediante filtros (0.45  $\mu m$  de apertura de poro) y un sistema de vacío (figura 2). El periodo de fermentación fue de diez días con toma de muestra diaria.

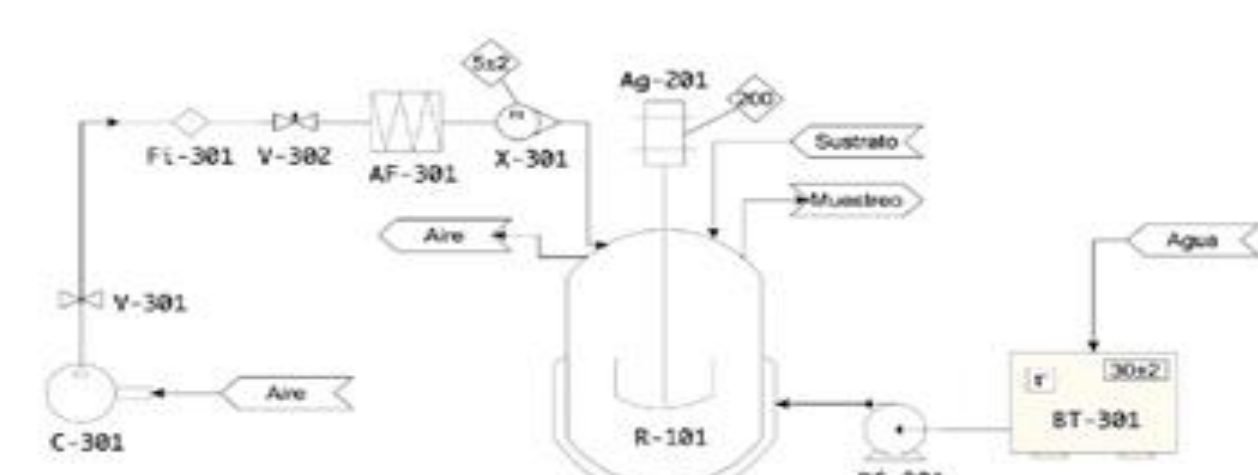


Figura 2. Diagrama de flujo de proceso.

Nomenclatura empleada en el diagrama, R-101 reactor enchaquetado, Ag-201 agitador 200 rpm, C-301 compresor de aire, V-301 válvula, Fi-301 filtro de membrana, V-302 válvula de aguja, AF-301 filtro de alúmina y fibra de vidrio, X-301 Rotámetro, PC-301 Bomba centrífuga, BT-301 Baño termostático.

El pH para la producción de ácido cítrico debe ser menor a 2, esto reduce los riegos de contaminación de la fermentación con otros microorganismos e inhibe la producción de ácidos orgánicos no deseados (ácido gluconico y ácido oxálico) [9]. El pH inicial entre 5.4 -y 6.5 es el óptimo para la melaza [1].

Para la determinación de ácido cítrico se utilizó el método de Marrier y Boulet [11], el cual consiste en añadir anhídrido acético en exceso caliente y piridina a una muestra líquida de ácido cítrico en condiciones de sequedad total. Bajo estas condiciones, el ácido cítrico, con la adición de la piridina da un color amarillo, el cual es proporcional a su concentración. La concentración se determinó, por la medición de la absorbancia a 405 nanómetros en un espectrofotómetro visible marca Spectronic Instruments modelo 21D.

Para la determinación de azúcares, se midieron los ° Brix de las soluciones por medio de un refractómetro marca Atago IT modelo NAR-it. La biomasa producida durante la fermentación, se calculó separándola del medio de cultivo por filtración en membranas, llevándolas a peso constante a  $50^\circ C$ , utilizando la diferencia de pesos, dividido entre el volumen de la muestra [10].

### Resultados y discusión.

Para la primera experimentación, la mayor producción de ácido cítrico se registró al tercer día de fermentación con 22 mg/ml, después decayó notablemente en el quinto día y de ahí hasta el noveno día la producción disminuyó de manera constante. Los azúcares se consumieron de manera prácticamente constante y la generación de biomasa aumento lentamente conforme transcurrieron los días de la fermentación, el hongo no logro crecer. La cantidad de ácido cítrico es determinada por el crecimiento del *Aspergillus niger* y por el tratamiento de hidrólisis del sustrato, aunque después del quinto día la producción del ácido cítrico es menor, suceso posiblemente influenciado por la menor cantidad de azúcares disponibles (figura 3).

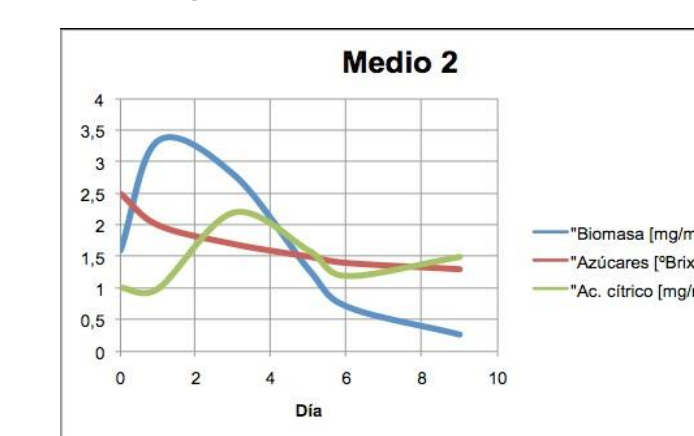
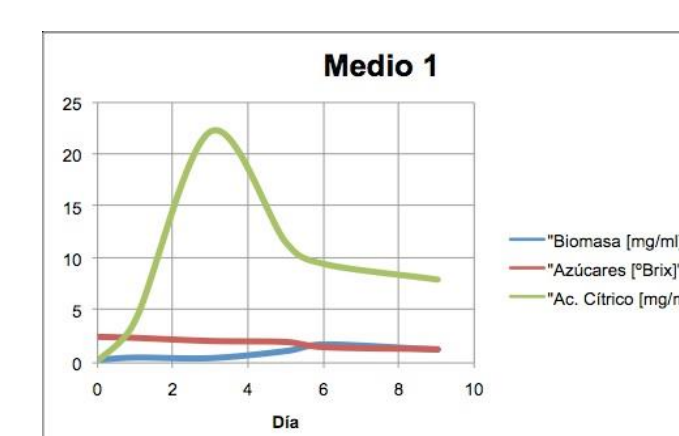


Figura 3. Producción de ácido cítrico, primer experimento.

Figura 4. Producción de ácido cítrico, segundo experimento.

Para la segunda experimentación la mayor producción de ácido cítrico se registró al tercer día de fermentación con 2.2 mg/ml, a pesar de que el sustrato fue hidrolizado. La cantidad de azúcares decae de 2.5 a 1.3° Brix, lo que indica que el hongo *Aspergillus niger* no creció y por consiguiente no hubo transformación de los azúcares. En cuanto a la generación de biomasa el valor máximo obtenido fue de 3.4 mg/ml el primer día. Posiblemente coexisten metales traza que impiden una buena fermentación (figura 4).

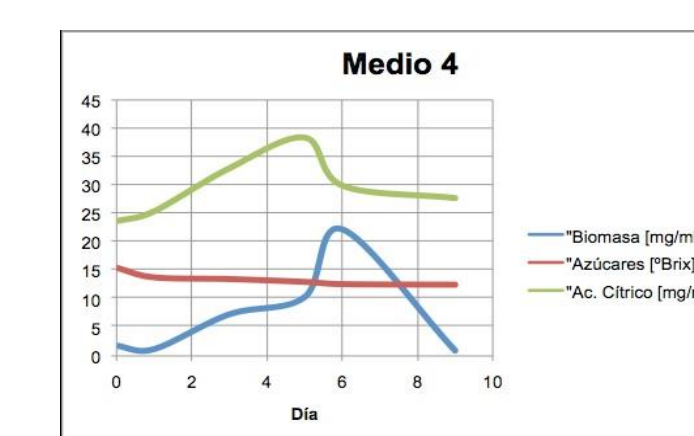
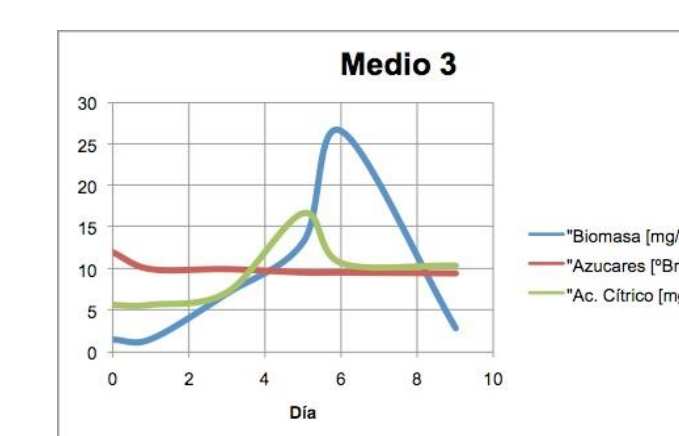


Figura 5. Producción de ácido cítrico, tercer experimento.

Figura 6. Producción de ácido cítrico, cuarto experimento.

Para la tercera experimentación, la máxima producción de ácido cítrico se alcanzó en el quinto día con una producción de 16 mg/ml, la cantidad de azúcares disminuyó de 12 a 9° Brix, la biomasa generada 26 mg/ml es mayor que la cantidad de ácido cítrico producido. En este caso el tratamiento fue con 175 g de resina catiónica por litro de solución (figura 5).

Para la cuarta experimentación se alcanzó la mayor producción de ácido cítrico, 39 mg/ml en el quinto día. La variación de los azúcares de 15 a 12° Brix. La cantidad máxima de biomasa fue de 23 mg/ml. Esta fermentación presenta las mejores condiciones de operación debido a que se da la mayor producción de ácido cítrico cuando disminuye la cantidad de azúcares y el aumento en la biomasa (figura 6).

### Conclusiones.

En el periodo evaluado, la máxima producción de ácido cítrico se obtuvo entre 3-5 día, aunque su cantidad depende de las condiciones en que se realizó la fermentación. La hidrólisis favorece la producción de ácido al aumentar la disponibilidad de la melaza, debido a la transformación de sacarosa a glucosa y fructosa que son consumidos por el hongo *Aspergillus niger* para la producción de ácido cítrico. El tratamiento con resina catiónica es útil para la remoción/reducción de los elementos traza, aunque se corre el riesgo de eliminarlos y evitar las mejores condiciones de fermentación porque algunos de ellos son requeridos. No fue necesario el suministro de una fuente de nitrógeno para la producción de ácido cítrico.

### Referencias Bibliográficas.

- [1] Grewal H., & Kalra K. (1995). Fungal production of citric acid. *Journal of Biotechnology Advances*. Vol. 13. pp. 209-234.
- [2] Hossain et al. (1984). The effect of sugar source on citric acid production por *A. niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol.19. pp. 393-397.
- [3] Papagianni, M., Matthey M., Kristiansen, B. (1999). The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* in batch and fed-batch culture. *Enzyme Microb. Technol.* Vol.25 pp. 710-717.
- [4] Association of America Feed Control Officials. <https://www.aaafco.org/>
- [5] Matthey M. (1992). The production of organic acids. *Crit. Rev. Biotechnol.* Vol.12 pp.87-132.
- [6] Shu, P., Johnson M. (1948). Citric acid production by submerged fermentation with *Aspergillus niger*. *Ind. Eng. Chem.* Vol.40. pp.1202-1205.
- [7] Sikander A., Haq I., Qadeer M. A., Iqbal J. (2002). Production of Citric Acid by *Aspergillus niger* using cane molasses in a stirrer fermentor. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol. 5.
- [8] Lesniak W. (1999). *Citric acid biotechnology; fermentation substrates*. Ed. Kristiansen B. Matthey M. and Linden J. London, Taylor Francis Ltd. pp. 149-159.
- [9] Saffran M Denstedt F. (1948). *A rapid method for the determination of citric acid*. Department of Biochemistry. Montreal Canadá.
- [10] Jiménez G. J. C., Pérez E. T. (2004). Estudio cinético de la obtención de ácido cítrico, en un biorreactor a nivel laboratorio y planta piloto. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Metropolitana.