

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Azcapotzalco

Licenciatura en Ingeniería Química

OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EN UN BIORREACTOR PARA LA
SÍNTESIS DE ÁCIDO CÍTRICO EMPLEANDO MELAZA COMO SUSTRATO

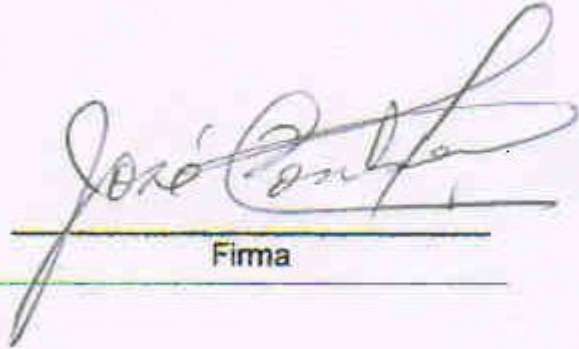
Medina Rojas Jocelyn Mariana
207302811
raventtgo@gmail.com

Asesor: Contreras Larios José Luis
Departamento de Energía

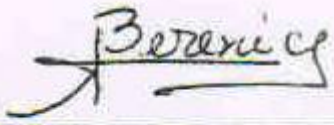
Asesor: Quintana Díaz María Berenice Guadalupe
Departamento de Energía

Agosto del 2014

Nosotros, José Luis Contreras Larios y María Berenice Guadalupe Quintana Díaz declaramos que aprobamos el contenido del presente Reporte de Proyecto de Integración y damos nuestra autorización para su publicación en la Biblioteca Digital, así como en el Repositorio Institucional de la UAM Azcapotzalco.



Firma



Firma

Yo, Jocelyn Mariana Medina Rojas, doy mi autorización a la Coordinación de Servicios de Información de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco, para publicar el presente documento en la Biblioteca Digital, así como en el Repositorio Institucional de la UAM Azcapotzalco.



Firma

INDICE

Resumen	5
Introducción	6
Justificación	6
Objetivo General	
Objetivos Específicos	7
Capítulo I Fermentación	
Fermentación sumergida	8
Condiciones de fermentación	8
Fuentes de carbono	8
Nitrógeno y limitación de fosfato	9
pH	9
Aireación y agitación	10
Elementos traza	
Sustratos	11
Melaza de caña	11
Hongo Aspergillus Niger	11
Proceso Industrial	12
Bioquímica del ácido cítrico	12
Ciclo de Krebs	13
Capítulo II Desarrollo Experimental	
Sistema de fermentación	17
Sistema de fermentación A	18
Sistema de fermentación B	19
Microorganismo	19
Inóculo	19
Medios de cultivo	19
Medio de preparación de la cepa	19
Medio de cultivo para producción (sustrato)	20
Fermentación	20
Métodos analíticos	21
Determinación del ácido cítrico (Método de Marrier y Boulet)	21

Procedimiento	21
Curva de calibración	21
Determinación de azúcares por refractometría	22
Determinación de biomasa	23
Capítulo III Análisis y Discusión de Resultados	24
Fermentación 1	24
Fermentación 2	25
Fermentación 3	25
Fermentación 4	26
Fermentación 5	27
Capítulo IV Conclusiones	28
Referencias	30

Resumen

En el presente proyecto se produjo ácido cítrico mediante la fermentación sumergida del hongo *Aspergillus Niger* en dos tipos de biorreactores, el primer tipo es un reactor de vidrio cilíndrico de 3 litros enchaquetado agitado mecánicamente con cuatro paletas de acero inoxidable, el segundo tipo, son matraces de un litro sujetos a un shaker orbital de la marca Thermo Scientific, ambos sistemas con temperatura controlada a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ y un flujo aproximado de aire estéril de 5 l/min.

Para la producción del ácido cítrico se llevaron a cabo cinco diferentes fermentaciones (1, 2, 3, 4 y 5) en donde las variables a considerarse son: los gramos de resina de intercambio catiónico utilizados para reducir la concentración de elementos traza, así como el pretratamiento de hidrólisis de dos sustratos con el procedimiento de Sikander Ali (2002), a las condiciones de temperatura y aireación descritas en el párrafo anterior.

La determinación de la concentración de ácido cítrico se realizó mediante el método de la piridina-anhídrido acético, el consumo de azúcares se midió con ayuda de un refractómetro, la biomasa fue determinada gravimétricamente.

Introducción

Curie en 1917 descubrió que algunas cepas de *Aspergillus niger* crecían de manera abundante en un medio con altas concentraciones de azúcar y sales minerales, con un pH inicial de entre 2.5-3.5, mientras crecían, estas cepas excretaban grandes cantidades de ácido cítrico, esto fue la base para la producción industrial de ácido cítrico. El descubrimiento de Curie construyó la base para la producción de ácido cítrico establecidas por Pfizer en 1923 en los Estados Unidos (Papagianni, 2007).

La producción mundial de ácido cítrico por fermentación está en constante crecimiento, a pesar de que en Sudamérica, México y Grecia aún existen algunas fabricas donde el ácido es obtenido a partir de frutas cítricas inmaduras, actualmente alrededor del 99% de la producción del ácido cítrico se lleva a cabo mediante diferentes microorganismos, procesos de fermentación y sustratos (Berovic y Legisa, 2007).

El ácido cítrico (ácido 2-hidroxiopropano-1,2,3-tricarboxílico) es un ácido orgánico tricarboxílico, se encuentra en la naturaleza en forma de frutas cítricas como piña, pera, limón y cristalizada como citrato de calcio. Tiene un uso químico importante en la industria farmacéutica, alimentaria (extractos de sabores, comida, dulces) y en la manufactura de tintas y colorantes. El ácido cítrico se produce principalmente por fermentación, existen muchos microorganismos incluidos los hongos, levaduras y bacterias, capaces de producir fermentaciones. En la industria los dos tipos de fermentación más utilizados son: la de cultivo líquido superficial y la fermentación de cultivo sumergido (Najafpour, 2007).

Justificación

México es un país productor de caña de azúcar, tan sólo en el cierre de 2012/2013 se obtuvieron 6,974,799 toneladas de azúcar (Conadesuca 1), hasta finales de abril de 2013 la producción de melaza de caña reportada fue de 1,720,000 toneladas (Zafranet 1), de las cuales se destinan aproximadamente 600,000 toneladas a la producción de alcohol y 450,000 toneladas a la ganadería (Zafranet 2), además, este año se generó un excedente de 250 mil toneladas de melaza y los precios locales se han ajustado entre tan sólo 70 y 90 dólares por tonelada (Zafranet 3), siendo que el precio de azúcar por tonelada es de alrededor de \$6900 (Conadesuca 2). Por lo que optimizar el proceso empleando melaza implicaría reducir los costos en materia prima hasta en un 86% y se aprovecharía

el uso de este recurso para generar un producto de mayor valor agregado, que es el ácido cítrico, cuyo consumo en México asciende a 49649 toneladas por año aproximadamente (Ramírez, 2003).

Objetivo General

Optimizar las variables de operación para la producción de ácido cítrico a partir de melaza de caña y el hongo *Aspergillus niger*.

Objetivos Específicos

- Obtener ácido cítrico a partir de melaza de caña, utilizando el hongo *Aspergillus niger* bajo condiciones de operación establecidas.
- Evaluar y analizar la influencia de las variables (temperatura, pH, aireación y agitación) en el proceso de obtención de ácido cítrico.
- Optimizar las variables de operación para la producción de ácido cítrico.

Capítulo I

FERMENTACIÓN

1. Fermentación sumergida

En este proceso, la producción de ácido cítrico está fuertemente influenciada por la composición del medio, los principales factores que la afectan son: tipo y concentración de la fuente de carbono, nitrógeno, y limitación de fosfato, pH, aireación y la morfología del organismo productor (Papagianni, 2007). Las principales ventajas del proceso de fermentación sumergida son: tiempo corto de fermentación (de 6 a 10 días), altos niveles de esterilidad y control de los parámetros del proceso, bajos requerimientos de espacio, reproducibilidad del proceso y altos rendimientos (Berovic y Legisa, 2007).

2. Condiciones de Fermentación

Existen variaciones considerables en las condiciones de cultivo reportadas en la literatura para la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger*, para alcanzar una alta productividad, es esencial que el medio de cultivo contenga principalmente nutrientes como carbono, nitrógeno y fósforo (Grewal y Kalra, 1995).

2.1 Fuente de carbono

En general, los azúcares que son rápidamente degradados por el hongo permiten un alto rendimiento de ácido cítrico (Mattey, 1992). La fuente de carbono usada en fermentaciones industriales es típicamente melaza de remolacha, aunque la melaza de caña, pulpa de fruta, polisacáridos y azúcares son utilizados si las condiciones locales permiten su uso desde un punto de vista económico (Papagianni, 2007).

Aspergillus niger puede consumir rápidamente azúcares simples como glucosa y fructosa, a pesar de que la fuente de carbono más usual a escala industrial es la sacarosa, quien como tal no es consumido por el hongo, ya que el microorganismo posee un enlace en el micelio que hidroliza la sacarosa y la transforma en glucosa y fructuosa, el cual, bajo las condiciones ácidas de la

fermentación del ácido cítrico hidroliza la sacarosa en sus monómeros (Leopold, 1959). Hossain y colaboradores (1984) reportaron que la sacarosa es la fuente de carbono más favorable después de la glucosa, la fructosa y la lactosa. La concentración de la fuente de carbono es decisiva para la producción del ácido cítrico, la máxima tasa de producción se alcanza usualmente entre 14-22% de la concentración de los azúcares (Shu y Johnson, 1948). Xu y colaboradores (1989) reportaron una concentración de azúcares del 10 al 14% como óptima, a concentraciones inferiores al 2.5% de azúcares, no hubo producción.

Por otro lado, los polisacáridos a menos de que estén hidrolizados, no son una buena elección de materia prima para la fermentación del ácido cítrico porque se descomponen muy lentamente como para igualarse al alto orden del catabolismo del azúcar, requerido para la producción del ácido cítrico. La hidrólisis lenta de los polisacáridos está ligada con la baja actividad de las enzimas hidrolíticas en el bajo pH que es necesario para llevar a cabo la producción del ácido cítrico (Papagianni, 2007).

2.2 Nitrógeno y limitación de fosfato

Medios de cultivo complejos como la melaza, son ricos en compuestos que contienen nitrógeno y raramente se tienen que sustituir con alguna otra fuente del mismo (Mattey, 1992). Una alta concentración de fosfatos desfavorece la producción de ácido cítrico, sin embargo, Shu. y Johnson (1948) reportaron que la concentración de fósforo (0.5 a 5 g/l) es requerida por el hongo para una máxima producción de ácido cítrico.

2.3 pH

El pH para la producción de ácido cítrico debe ser bajo ($\text{pH} < 2$), esto reduce los riesgos de contaminación de la fermentación con otros microorganismos e inhibe la producción de ácidos orgánicos indeseados (ácido glucónico y ácido oxálico) (Papagianni, 1995). El pH inicial requerido depende de la fuente de carbono utilizada, un pH entre 5.4 y 6.5 es óptimo para un medio con melaza (Grewal y Kalra, 1995).

2.4 Aireación y agitación

Elevadas velocidades de agitación y aireación tienen dos principales efectos sobre el cultivo del hongo filamentoso, por un lado, se incrementa la cantidad de oxígeno y existe una buena transferencia de calor, por el otro lado, hay un mayor esfuerzo mecánico sobre *Aspergillus niger*, ocasionando cambios morfológicos, variaciones en el crecimiento de biomasa y la formación de producto (El-Enshasy et al., 2006). Kishore y colaboradores (2008), observaron que velocidades de agitación mayores a 230 rpm, dan como resultado elevados rendimientos de ácido cítrico, sin embargo, el microorganismo (*Aspergillus niger*) puede ser severamente dañado, además, la producción de ácido cítrico disminuye cuando la velocidad de aireación se incrementa más allá de 1.0 l/min.

2.5 Elementos traza

El hongo *Aspergillus niger* requiere de Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} para su crecimiento (Papagianni, 2007). La adición de Mn a concentraciones tan bajas como 3 $\mu\text{g/L}$, han mostrado reducir drásticamente la producción de ácido cítrico bajo condiciones óptimas (Clark et al., 1966).

Mattey y Bowes (1978) reportaron que la adición de 10 mg de Mn^{2+} por litro reduce la producción de ácido cítrico aproximadamente al 50%. Shu. y Johnson (1948) establecieron que los niveles óptimos de Zn^{2+} y Fe^{3+} son 0.3 y 1.3 ppm respectivamente. A altos niveles de zinc el cultivo de hongos se mantiene en fase de crecimiento y no se genera el ácido cítrico, pero a bajos niveles, el crecimiento se ve limitado y *Aspergillus niger* pasa a la fase de producción de ácido cítrico (Grewal y Kalra, 1995).

3. Sustratos

Para la fermentación sumergida se pueden utilizar además de melaza de caña y melaza de remolacha, sustratos con más alta pureza como almidón hidrolizado, glucosa, azúcar refinada o pura, remolacha purificada y condensada o jugo de caña. Esto es porque utilizar un sustrato más puro incrementa el rendimiento y reduce el tiempo de la fermentación (Lesniak, 1999).

La melaza, como subproducto de la industria azucarera, ha permanecido como una elección para ser la fuente de carbono en la producción del ácido cítrico. La melaza de caña ha sido aclamada por ser una materia prima de bajo costo y cuyo contenido de azúcares es de entre 40-55% en forma de sacarosa, glucosa y fructosa, el inconveniente es que contiene altas concentraciones de metales traza

(calcio, magnesio, manganeso, hierro y zinc) quienes tienen un efecto retardante en la síntesis del ácido cítrico, por lo que la melaza de caña requiere un pretratamiento para la reducción/remoción de los metales traza (Grewal y Kalra, 1995).

3.1 Melaza de caña

La melaza como subproducto de la industria azucarera, ha sido una elección para ser la fuente de carbono en la producción del ácido cítrico, ya que es una materia prima de bajo costo que contiene de 40 a 55% de azúcares en forma de sacarosa, glucosa y fructosa (Grewal y Kalra, 1995). La operación básica en el tratamiento de la melaza es remover los iones de metales pesados, ferrocianuro de potasio y otros compuestos complejos son utilizados comúnmente, al igual que el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Los medios de cultivo para la melaza a veces se purifican en un intercambiador de cationes, no todos los microelementos deberán ser removidos durante este proceso puesto que algunos de ellos son necesarios para el crecimiento del micelio de *Aspergillus niger* (Lesniak, 1999).

La composición de la melaza de caña contiene alrededor de 20% agua, 62% azúcares, 10% de compuestos diversos que no contienen azúcar y 8% de sales inorgánicas que incluyen iones como Mn, Mg, Al, Fe y Zn en proporciones variables (Prescott y Dunn's, 1987).

4. Hongo *Aspergillus niger*

A través de los años un gran número de microorganismos, incluidos los hongos, levaduras y bacterias han sido utilizados para la producción de ácido cítrico, de cualquier manera, los hongos de *A. niger*, utilizados la primera vez por Curie, han permanecido como la elección del organismo para la producción comercial (Grewal y Kalra, 1995). Las ventajas principales de utilizar este organismo son: (1) facilidad de manejo; (2) la capacidad para fermentar una gran variedad de materias primas baratas y; (3) altos rendimientos (Curie, 1917).

Los principales factores que afectan la morfología en los cultivos sumergidos y subsecuentemente influyen el proceso y el resultado final son: los niveles de agitación aplicado, el pH del medio, la tasa de crecimiento del microorganismo, factores nutricionales, el tipo y la concentración del inóculo. La agitación intensiva está asociada al desarrollo corto, grueso y ramificado de los filamentos que sobre producen ácido cítrico, además, el gran esfuerzo cortante puede causar la ruptura de los filamentos. La fragmentación y el recrecimiento de los filamentos son benéficos para

la producción de ácido cítrico porque el micelio, que es más susceptible a la fragmentación, es la parte más vieja y pesada de las vacuolas de los filamentos que son metabólicamente inactivos, de las nuevas puntas generadas por la fragmentación surgen nuevos filamentos que producen ácido cítrico (Papagianni et al., 1999).

5. Proceso Industrial

Llevar a cabo la elaboración del ácido cítrico mediante una fermentación sumergida requiere poco espacio y tiene altos rendimientos de producción, la fabricación se puede llevar a cabo ya sea en un reactor de tanque agitado o en una torre de fermentación. En vista del bajo nivel de pH que se produce durante la fermentación y el hecho de que el ácido cítrico es corrosivo, el uso de biorreactores hechos de materiales resistentes al ácido son preferibles. El medio de preparación de las fermentaciones sumergidas involucra la apropiada dilución de la melaza, su pre tratamiento, la adición de nutrientes y la esterilización del sustrato. La inoculación es llevada a cabo ya sea adicionando una suspensión de esporas, cuando las esporas son utilizadas necesitan estar dispersas en el medio, por lo tanto, la adición de un agente tensoactivo es necesario. Para el micelio pre cultivado, el tamaño del inóculo debe ser aproximadamente el 10% del medio fresco (Grewal y Kalra, 1995).

El aire es burbujeadado a través del medio de fermentación en un rango de entre 0.5 a 1.5 vvm, sin embargo, debido a las consideraciones económicas, es preferible comenzar con un flujo de aireación bajo (0.1 a 0.4 vvm). Durante la fermentación puede existir una formación considerable de espuma, esto se puede corregir mecánicamente mediante rompedores de espuma o agentes químicos antiespumantes (Berovic et al., 1979). Bajo las condiciones óptimas, la fermentación se completa de 5 a 10 días, dependiendo de las especificaciones del proceso. La fermentación sumergida se puede llevar a cabo por lotes y de manera continua, el proceso continuo se utiliza a escala laboratorio pero comercialmente no ha sido aplicado (Grewal y Kalra, 1995).

6. Bioquímica del ácido cítrico

Las vías metabólicas de las reacciones que conducen a la producción de ácido cítrico a partir de sacarosa empiezan fuera de la célula, con una invertasa (enzima) unida a la membrana celular que hidroliza la sacarosa a fructosa y glucosa para transportarlas dentro de la célula (Figura 1) (Arrollo, 2012).

Después de que la glucosa y fructosa son transportadas dentro de la célula, se dirigen hacia la vía metabólica conocida como glicólisis. En esta vía se degrada una molécula de glucosa en una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente, dando dos moléculas de piruvato más otras dos moléculas del mismo compuesto obtenidas de la fructosa (Figura 1) (Lehninger, 1987).

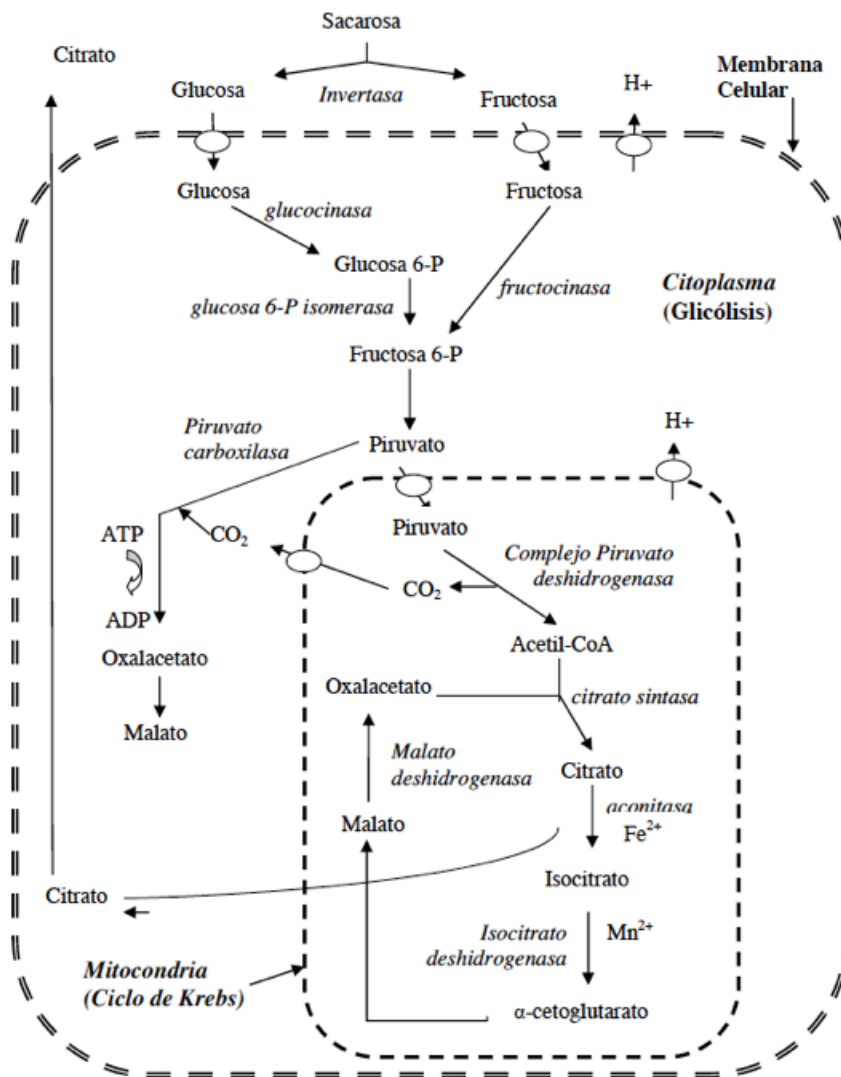


Figura 1. Representación esquemática de las reacciones metabólicas involucradas en la producción de ácido cítrico, las enzimas (en cursiva), la glicólisis, el ciclo del ácido cítrico (líneas punteadas) y su localización en la estructura celular de *A.niger* (Papagianni, 2007).

En condiciones aeróbicas, el piruvato, es oxidado finalmente a CO₂ y H₂O a través del ciclo del ácido cítrico. Antes de poder entrar a este ciclo, el piruvato debe sufrir una oxidación para dar lugar

al grupo acetilo del acetil-coenzima A (acetil-CoA), la forma en que el ciclo del ácido cítrico acepta la mayor parte del combustible aportado (Figura 1) (Lehninger, 1987). El piruvato es oxidado a acetil-CoA y CO₂ mediante una agrupación estructurada de tres enzimas, el complejo piruvato deshidrogenasa.

En esta reacción, el piruvato pierde un grupo carboxilo en forma de molécula de CO₂, mientras que los dos carbonos restantes se transforman en el grupo acetilo del acetil-CoA (Figura 2) (Lehninger, 1987).

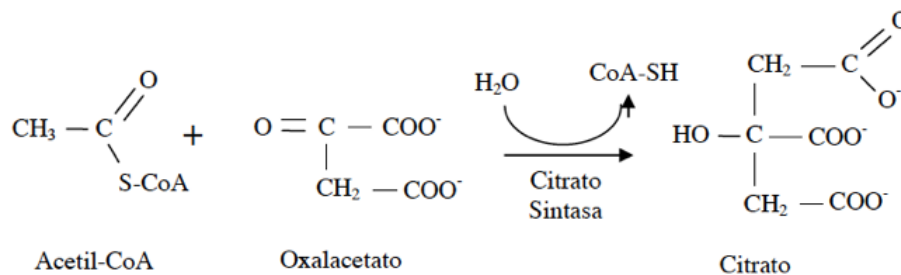


Figura 2. Reacción de conversión del piruvato a Acetil-CoA

7. Ciclo de Krebs

El Ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA), es una secuencia de reacciones que ocurre en la mitocondria de la mayoría de los organismos aeróbicos. Es catalizado por un sistema multienzimático, que acepta el grupo acetilo de acetil-coenzima A (acetil-CoA) como combustible y lo desdobra a dióxido de carbono y átomos de hidrógeno (Lehninger, 1987).

En cada vuelta del ciclo TCA, una molécula de acetil-CoA, condensa con una molécula de oxalacetato para formar ácido cítrico (Figura 3).

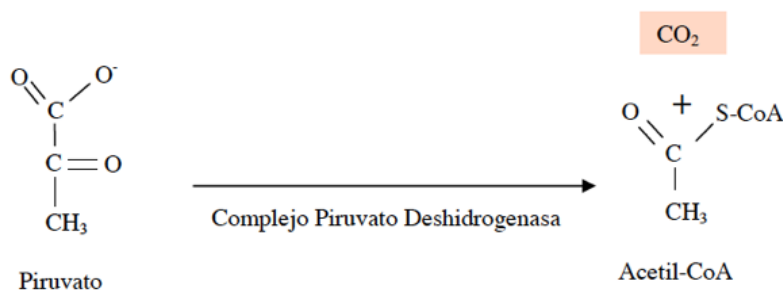


Figura 3. Reacción de formación de ácido cítrico

El ácido cítrico es entonces degradado a través de una secuencia de reacciones, que produce dos moléculas de CO₂ y regenera oxalacetato. Otra vuelta del ciclo puede ahora empezar por la reacción del oxalacetato con otra molécula de acetil-CoA. Así en cada vuelta del ciclo entra una molécula de ácido acético, se forman dos moléculas de ATP y CO₂ y una molécula de oxalacetato es utilizada para formar citrato, pero es regenerado al final del ciclo (Lehninger, 1987).

Se esperaría que cuando algunos compuestos intermediarios del ciclo TCA salieran de éste para promover la formación de compuestos nuevos, se produciría un descenso en la velocidad de flujo a través del ciclo como consecuencia de la disminución en la concentración de dichos intermediarios. No obstante es posible reponer los intermediarios perdidos mediante las reacciones anapleróticas. Así, el piruvato producido a partir de glucosa no es solamente descarboxilado a Acetil-CoA por el complejo piruvato deshidrogenasa, si no que también es parcialmente carboxilado a oxalacetato por la acción de la piruvato carboxilasa (Figura 4) (Lehninger, 1987).

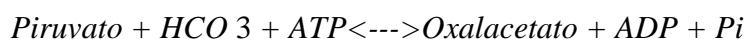


Figura 4. Reacción catalizada por la piruvato carboxilasa

La piruvato carboxilasa es una enzima reguladora, que se encuentra prácticamente inactiva en ausencia de acetil-CoA. Siempre que exista un exceso de acetil-CoA, el combustible del ciclo del ácido cítrico, se estimulará la reacción de la piruvato carboxilasa y se producirá más oxalacetato, lo que a su vez permitirá que el ciclo utilice una mayor cantidad de acetil-CoA en la reacción de la citrato sintasa (Lehninger, 1987).

A diferencia de las enzimas de muchos otros eucariotas, la piruvato carboxilasa de *A. niger* está localizada en el citosol (disolución acuosa dentro de la célula, en la que se encuentra embebido el material celular) (Arrollo, 2012).

El piruvato puede así, ser convertido a oxalacetato sin ser transportado dentro de la mitocondria, y puede ser convertido a malato por la enzima citosólica malato deshidrogenasa, enzima que transforma el malato en oxalacetato, para así poder regresar al ciclo TCA como se muestra en la siguiente figura.

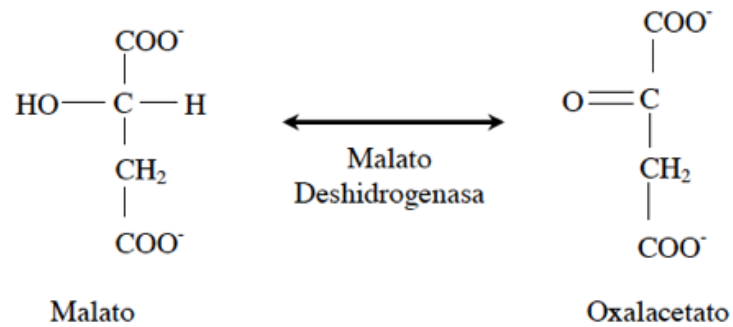


Figura 5. Reacción de conversión de malato a oxalacetato.

Muchas investigaciones se han centrado en identificar el fondo del ciclo TCA para explicar la acumulación de ácido cítrico, y han reportado que la inactivación de una enzima que degrada el citrato (la aconitasa o isocitrato deshidrogenasa, Figura 1) es esencial para la acumulación del ácido cítrico (Ahmed et al., 1972).

Capítulo II

DESARROLLO EXPERIMENTAL

1. Sistema de Fermentación

Para llevar a cabo la fermentación se implementaron dos diferentes sistemas.

1.1 Sistema “A”

Para el primer sistema se empleó un reactor de vidrio enchaquetado con capacidad de 3 litros de volumen (se utilizó un volumen de operación de 2.1 l), para la agitación mecánica se utilizó un impulsor tipo Rushton de cuatro paletas de acero inoxidable, el aire se hizo pasar a través de una manguera conectada a una línea de aire estéril, el flujo de aire se controló mediante una válvula de aguja y un rotámetro. La temperatura del reactor se mantuvo a $30\pm 2^\circ\text{C}$ mediante un flujo de agua calentada con una resistencia eléctrica, a través de la chaqueta del reactor.

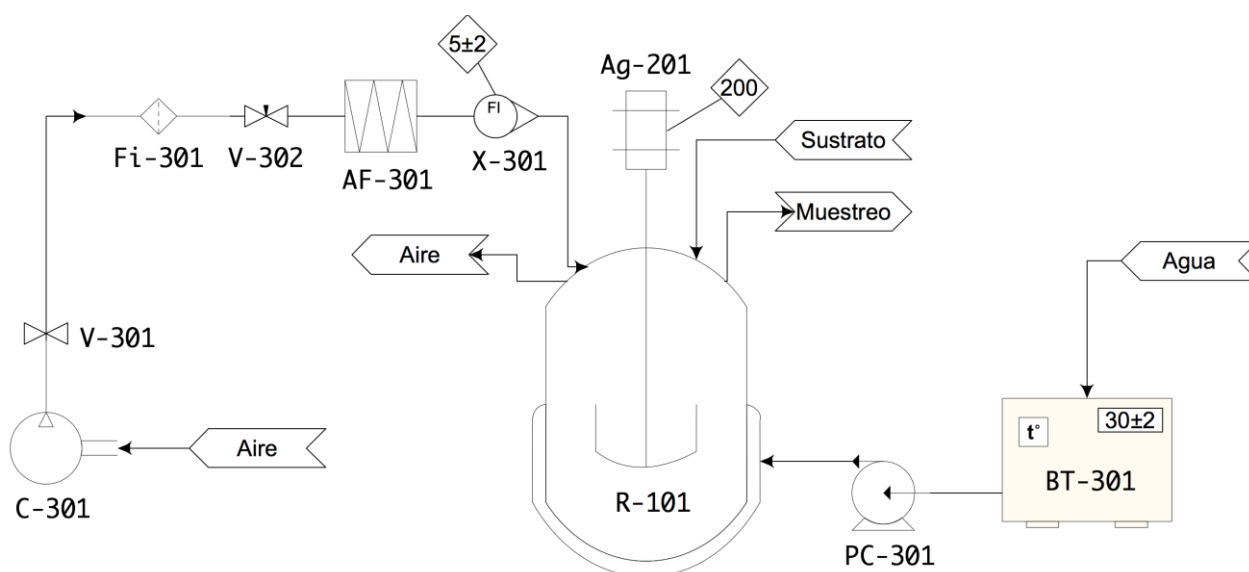


Figura 6. Diagrama de flujo de proceso del sistema “A”

Identificación	Descripción
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 5±2 l/min
PC-301	Bomba centrífuga
BT-301	Baño termostático 30±2°C

1.2 Sistema "B"

Para el segundo sistema se utilizó un shaker orbital de la marca Thermo Scientific, se montó un sujetador para cuatro matraces de un litro de capacidad (se utilizó un volumen de operación de 700 ml) y para mantener la temperatura en un rango de 30±2°C, se construyó un sistema de control de temperatura, además se fabricó un cubo hecho de policarbonato para mantener el sistema aislado. El aire estéril se hizo pasar mediante mangueras a cada matraz y el flujo de aire se controló mediante una válvula de aguja y un rotámetro.

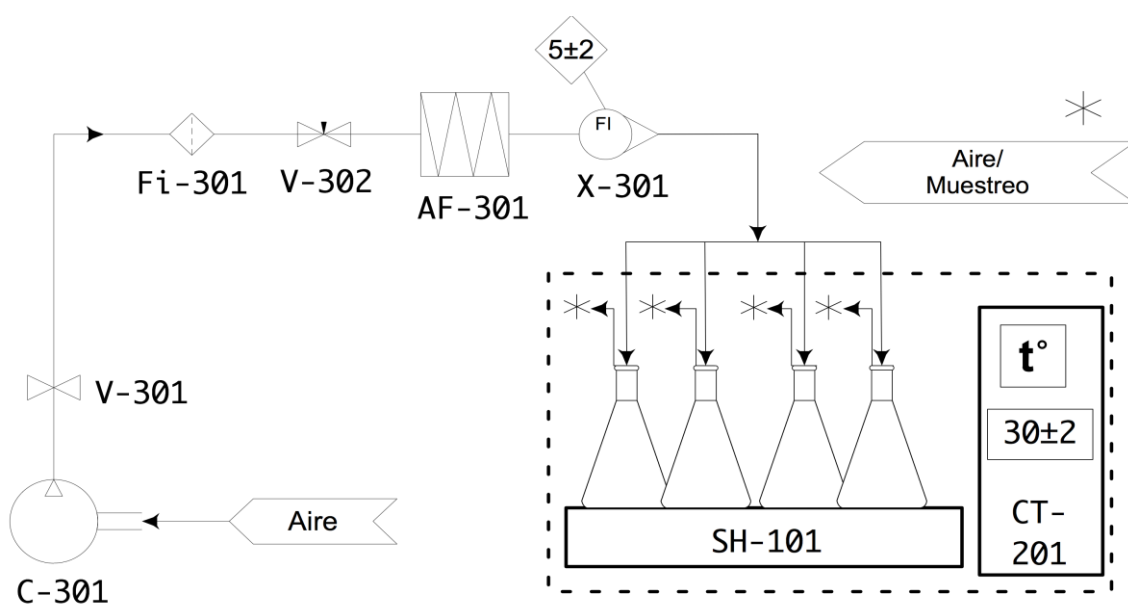


Figura 7. Diagrama de flujo de proceso del sistema "B"

Identificación	Descripción
SH-101	Shaker Orbital 200rpm
CT-201	Controlador de temperatura 30±2 °C
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 5±2 l/min

1.3 Microorganismo

Se utilizó una cepa del hongo filamentoso *Aspergillus niger* con clasificación CDBB 623 adquirido en la Colección de Cepas y Cultivos Microbianos del Centro de Investigación y Estudio Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional.

1.4 Inóculo

El inóculo que se le agregó al reactor, consistió en una suspensión de esporas, que se obtuvo por lavado de un cultivo del hongo en botellas Roux desarrollado durante 6 días a 28°C. La técnica consistió en agregar una solución salina estéril (0.85% de NaCl) y agitar vigorosamente durante 1 minuto, con la finalidad de arrastrar todas las esporas maduras. El inóculo representó el 1% (v/v) del volumen de operación del reactor (Jímenez y Pérez, 2004).

2. Medios de cultivo

2.1 Medio de preservación de la cepa

Para la preservación de las cepas de *Aspergillus niger*, se utilizó el Agar Dextrosa y Papa (PDA), en tubos de agar inclinado incubados a 28°C durante 6 días y posteriormente mantenidos en refrigeración a 4°C. A partir de estos tubos, se realizaron las resiembras necesarias durante el proyecto.

2.2. Medio de cultivo para producción (sustrato).

El sustrato para todas las fermentaciones es melaza de caña, sin embargo, las variables estudiadas son el tratamiento con resina de intercambio catiónico para la reducción/remoción de elementos traza, el cual consiste en agregar una cantidad variable de resina al sustrato y mantenerlo en agitación durante 30 minutos, posteriormente filtrar la resina.

La segunda variable de estudio es la el efecto de la hidrólisis del sustrato mediante el procedimiento utilizado por Sikandier Ali (2002), el cual consiste en diluir al 25% el nivel de azúcar de la melaza, agregar 35 ml de H₂SO₄ 1N por cada litro de solución y hervir durante media hora, dejar enfriar y neutralizar la solución con CaO, dejar reposar durante una noche para que se lleve a cabo la clarificación. Finalmente diluir al 15% el sobrenadante líquido.

Todos los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C y 15 lb/in² por 15 minutos, para finalmente ser inoculados utilizando una suspensión de esporas.

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

Tratamiento	Medio 1	Medio 2	Medio 3	Medio 4	Medio 5
Fuente de carbono [g/l]	37.5	37.5	150	150	150
gramos de resina catiónica	350	175	175	350	350
Hidrólisis	Sí	Sí	No	No	No

Tabla 1. Composición de los medios de producción utilizados en las fermentaciones

2.3 Fermentación

Para el sistema 1, un inóculo del 1% (v/v) fue transferido al reactor agitado mecánicamente, el cual poseía una capacidad de 3 litros con 2.1 litros de volumen de operación. Para el sistema 2, el inóculo representó el 1% (v/v) de cada matraz de 1 litro, cuyo volumen de operación fue de 700ml. En ambos sistemas se llevó a cabo una fermentación sumergida durante 10 días y se tomó una muestra diaria. Se utilizó una velocidad de agitación de 200 rpm y un flujo de aire de aproximadamente 5 l/min. Se mantuvo una temperatura de 30± 2 °C; La biomasa fue separada

mediante el uso de filtros (0.45 mm de abertura de poro) y un sistema de vacío. El filtrado fue separado para llevar a cabo las determinaciones correspondientes.

3. Métodos analíticos

3.1 Determinación de ácido cítrico (Método de Marrier y Boulet)

Este método está basado en la reacción de Furth-Herman, que consiste en añadir anhídrido acético caliente y piridina a una muestra de ácido cítrico, se efectúa bajo condiciones de sequedad total. Así, el ácido cítrico da un color rojo carmín, el ácido aconítico rojo violeta y el ácido tartárico verde esmeralda. Sin embargo, el desarrollo de color es errático cuando se aplica a muestras líquidas. Esta dificultad puede ser superada utilizando un exceso de anhídrido acético. Bajo estas condiciones, el ácido cítrico, con la adición de piridina da un color amarillo, el cual es proporcional a su concentración (Saffran y Denstedt, 1948).

3.1.1 Procedimiento

Se colocaron en tubos de ensaye alícuotas de 1ml la solución muestra (diluídos al 90%), enseguida se adicionaron 1.3 ml de piridina (Marca). Se agitaron vigorosamente y se les añadieron 5.7 ml de anhídrido acético (J.T. Baker). Posteriormente se colocaron en un baño de agua a 32° C durante 30 min., transcurrido este tiempo, se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Con el tratamiento anterior se desarrolla un compuesto de color amarillo en la mezcla cuya coloración es proporcional a la concentración de ácido cítrico. Finalmente, se leyó la absorbancia de las muestras a 405 nanómetros, en un espectrofotómetro visible marca Spectronic Instruments modelo 21D, utilizando como blanco melaza. Las lecturas obtenidas se interpolaron en una curva de calibración de ácido cítrico en g/ml contra la absorbancia, una vez encontrada la concentración del ácido se multiplicaron por un factor de 10 (debido a la dilución de la melaza).

3.1.2 Curva de calibración

Para la obtención de la curva de calibración se siguió el tratamiento químico ya mencionado, a partir de una solución estándar de ácido cítrico a una concentración de 769.5µm/ml (Tabla 2). La curva de calibración se muestra a continuación.

Tubo	Concentración ácido cítrico [mg/ml]	Melaza [ml]	Piridina [ml]	Anhídrido acético [ml]	Absorbancia ($\lambda=405$ nm)
1	0	1	1.3	5.7	0
2	0.0776	0.9	1.3	5.7	0.13
3	0.1552	0.8	1.3	5.7	0.201
4	0.3104	0.6	1.3	5.7	0.252
5	0.4656	0.4	1.3	5.7	0.29
6	0.6208	0.2	1.3	5.7	0.364
7	0.776	0	1.3	5.7	0.517

Tabla 2. Curva de calibración del ácido cítrico utilizando melaza.

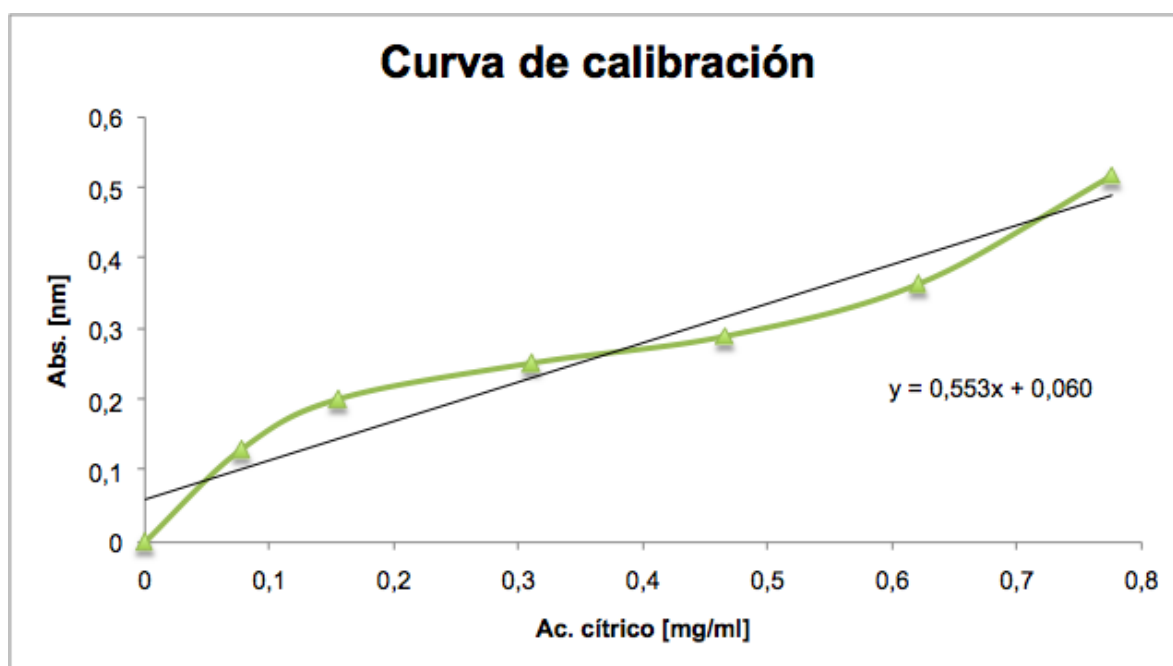


Figura 8. Curva de calibración para el ácido cítrico.

3.2 Determinación de Azúcares por refractometría

Para la determinación de los grados Brix en las soluciones se utilizó un refractómetro marca Atago 1T modelo NAR-it, se colocó una gota de agua para calibrar y posteriormente se leyó una gota de muestra.

3.3. Determinación de Biomasa

La biomasa producida durante el proceso, se calculó separándola del medio de cultivo por filtración en membranas de 0.45µm de apertura de poro y llevándolas a peso constante a 50°C, utilizando la diferencia de pesos, dividido entre el volumen de la muestra (Jiménez y Pérez, 2004).

Capítulo III

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1.1 Fermentación uno

La fermentación uno se llevó a cabo en el sistema “B”, la mayor producción de ácido cítrico se registró en el tercer día de fermentación con 22 [mg/ml], después decayó notablemente hasta el quinto día de fermentación y de ahí, hasta el noveno día la producción disminuyó de manera constante. Los azúcares se consumieron de modo prácticamente constante, y la generación de biomasa aumentó lentamente conforme transcurrieron los días de fermentación, es decir, el hongo *Aspergillus niger* no logró crecer. Comparando los azúcares consumidos y el crecimiento del hongo se puede observar que el organismo sólo consumió azúcares hasta el quinto día de fermentación y la generación de ácido cítrico observada se debe a la hidrólisis del sustrato además del tratamiento de resina utilizado, de 350 g de resina catiónica por litro de solución.

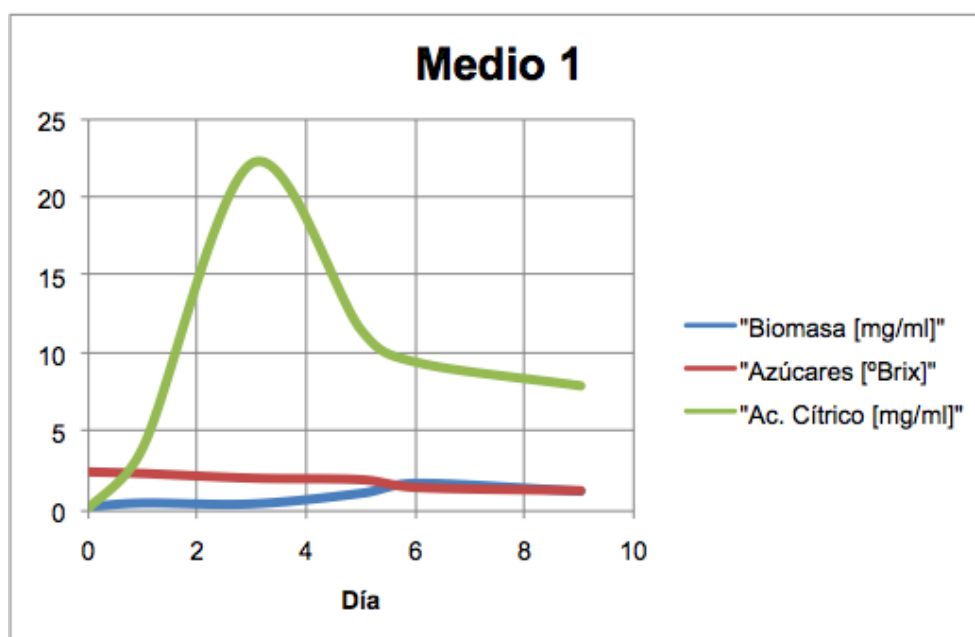


Figura 9. Producción de ácido cítrico, biomasa y consumo de azúcares, utilizando el sustrato uno.

1.2 Fermentación 2

En esta fermentación se observa la producción máxima de tan sólo 2.2 [mg/ml] de ácido cítrico, el crecimiento de biomasa máximo de 3.4 [mg/ml] y el consumo de azúcares de 2.5 a 1.3 °Brix, todos las variables son demasiado bajas, esto se atribuye a que el sustrato estaba hidrolizado y que el tratamiento con resina catiónica fue de 175 gramos por litro.

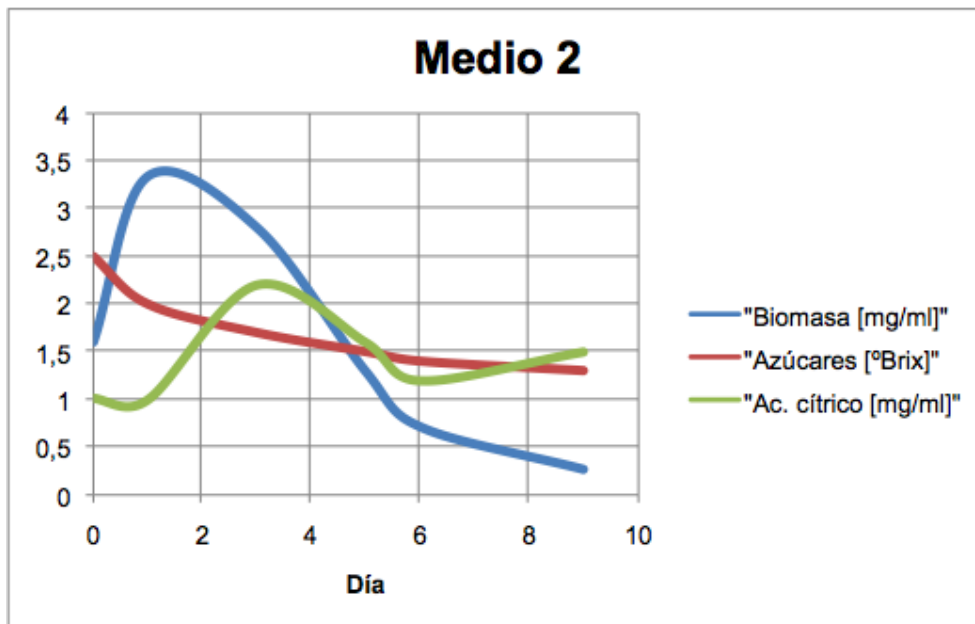


Figura 10. Producción de ácido cítrico, biomasa y consumo de azúcares, utilizando el sustrato dos.

1.3 Fermentación tres

La máxima producción de ácido cítrico se desarrolló el quinto día de fermentación, con una producción de 16 [mg/ml], los azúcares consumidos pasaron de 12 a 9 °Brix, por lo que el consumo de azúcar fue prácticamente constante, la biomasa generada fue de 26 [mg/ml], excesiva en comparación con la producción del ácido. Esto se debe a que el tratamiento con resina para este sustrato fue de tan sólo 175 gramos por litro de solución, la fermentación se llevó a cabo en el sistema "B".

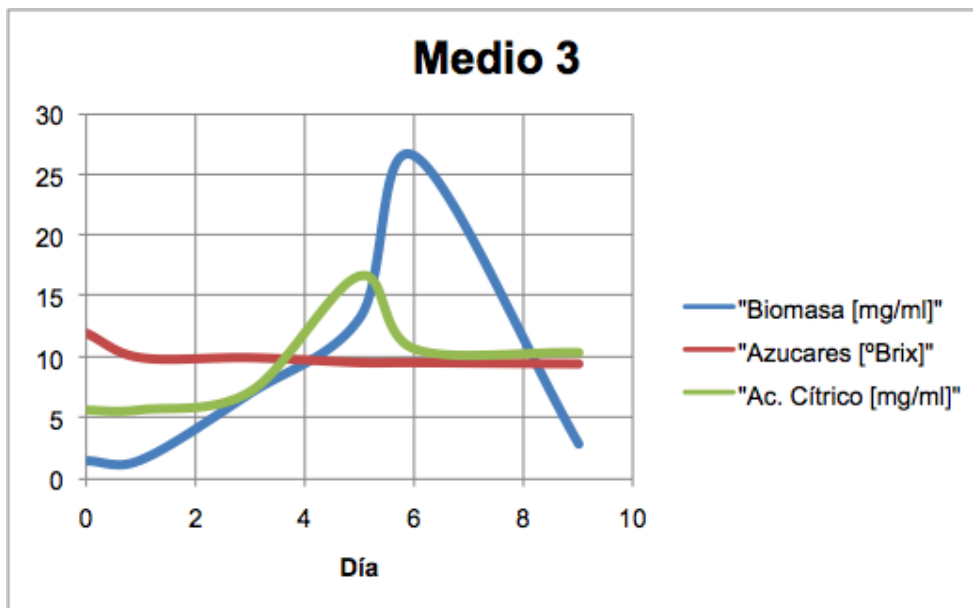


Figura 11. Producción de ácido cítrico, biomasa y consumo de azúcares, utilizando el sustrato tres.

1.4 Fermentación cuatro

La mejor producción de ácido cítrico se registró en este lote de fermentación, en el quinto día, con una concentración de 39 [mg/ml], la máxima producción de biomasa fue de 23 [mg/ml] y el consumo de azúcares permaneció casi constante de 15 a 12 °Brix. Esta fermentación presenta las mejores condiciones de operación, debido a la relación del consumo de azúcares con el crecimiento de biomasa y desde luego, la producción del ácido, esto se debe a que el sustrato no se encontraba hidrolizado y el tratamiento de resina de intercambio catiónico fue de 350 gramos por litro de solución, la fermentación uno se llevó a cabo en el sistema “B”.

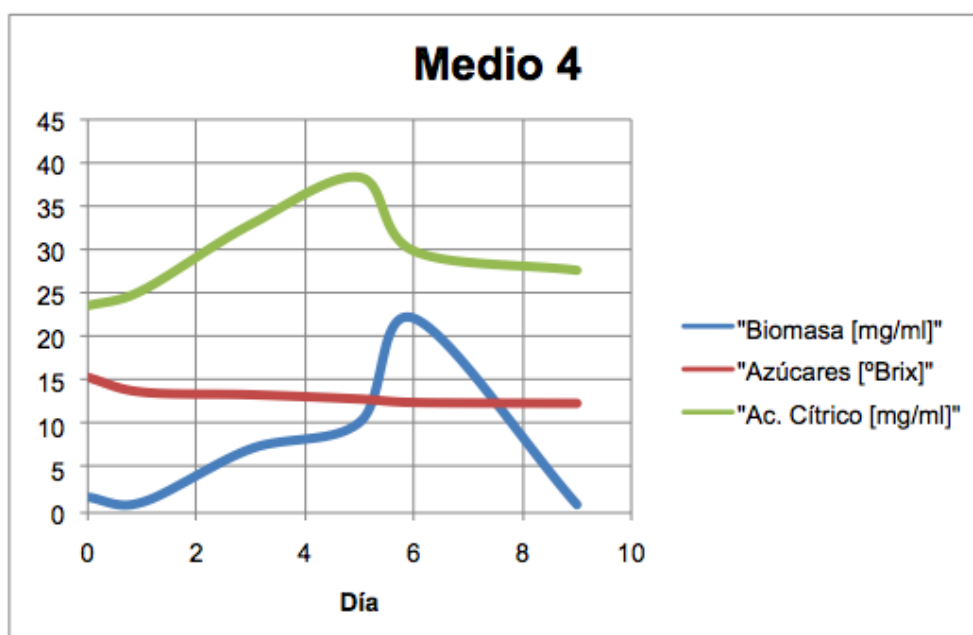


Figura 12. Producción de ácido cítrico, biomasa y consumo de azúcares, utilizando el sustrato cuatro.

1.5 Fermentación cinco

La máxima producción de ácido se llevó a cabo el sexto día con una concentración de 23 [mg/ml], al igual que el máximo crecimiento del hongo fue el sexto día con 10 [mg/ml], el consumo de azúcares pasó de 9.5 a 6 °Brix. Este lote tiene la misma composición y tratamiento que el lote cuatro, la diferencia radica en que esta fermentación se llevó a cabo en el sistema “A”, es por ello que la producción de ácido fue menor, debido a que el hongo estaba bajo un esfuerzo cortante ejercido por las paletas de agitación, mientras que la agitación del lote cuatro en el sistema “B” se realizó por medio del shaker, en donde no hay ningún contacto con el medio de producción.

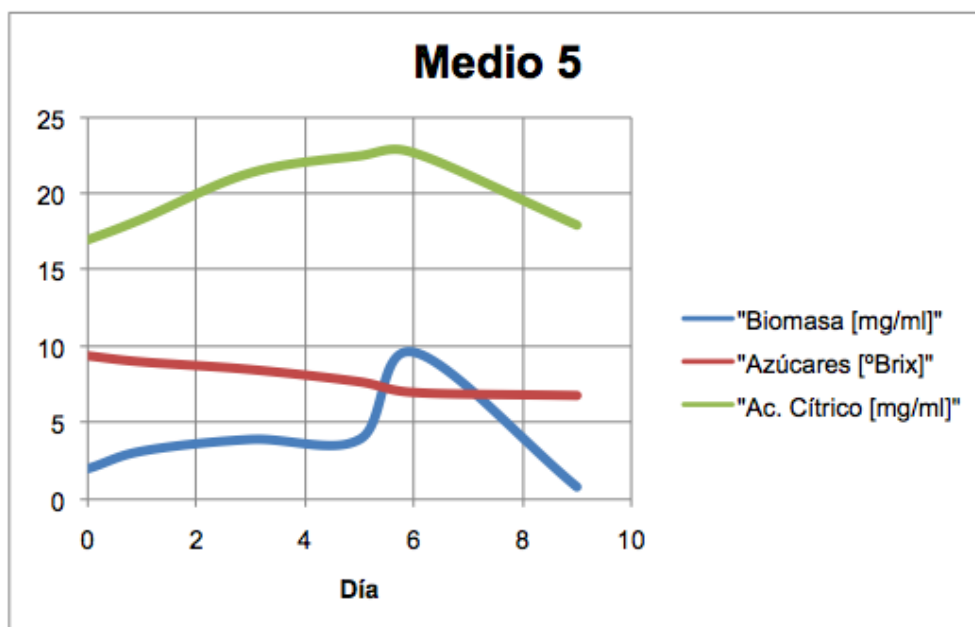


Figura 13. Producción de ácido cítrico, biomasa y consumo de azúcares, utilizando el sustrato cinco.

Capítulo IV

CONCLUSIONES

En todas a cada una de las fermentaciones llevadas a cabo se produjo ácido cítrico, aunque la cantidad obtenida depende de las condiciones en las cuales se llevaron a cabo dichos experimentos. Así se tiene una producción mínima de 2.2 mg/ml en la fermentación 2 y una producción máxima de 39 mg/ml para la fermentación 4.

En cuanto al tratamiento de hidrólisis, en las fermentaciones 1 y 2 este tratamiento se llevó a cabo. Podemos asegurar que, la hidrólisis favorece a la fermentación sumergida empleando melaza como sustrato, ya que se utiliza una menor cantidad de melaza y se obtiene una buena producción de ácido cítrico, como se constata en la fermentación uno. Cabe destacar que en la fermentación 2, la hidrólisis no favoreció dicho proceso por la influencia de los metales traza.

El tratamiento con resina de intercambio catiónico es esencial para la reducción/remoción de metales traza en la melaza, sin embargo, una relación baja como la que se utilizó de 175 gramos de resina por litro de solución, no da buenos resultados, prueba de ello son las fermentaciones 2 y 3, en donde se registró un mayor producción de biomasa. Los valores máximo (26 mg/ml) y mínimo (2 mg/ml) de biomasa corresponden a las fermentaciones 3 y 1.

Los mejores rendimientos del ácido se obtuvieron en las fermentaciones 4 y 5, a pesar que de que se sometieron a las mismas condiciones, la fermentación 4 se ve favorecida debido a que no hay ningún esfuerzo cortante ejercido contra el hongo. Este esfuerzo cortante se debe al contacto de las paletas de agitación con el sustrato, en donde el hongo está inmerso y por lo tanto se ve afectada su estructura. Situación que no sucede cuando la agitación es orbital en el Shaker.

En cuanto al consumo de azúcares, se puede afirmar que éste es menor cuando el sustrato está hidrolizado ya que disminuye la concentración de melaza en solución.

A partir de los resultados obtenidos se aprecia un aumento en la biomasa al mismo tiempo que una disminución en la concentración de azúcares.

Referencias

Ahmed S.A., Smith J.E., Anderson J.A. (1972), Mitochondrial activity during citric acid production by *Aspergillus niger*. *Trans Br Mycol Soc.*; vol. 59, 51-61

Arroyo G. (2012), Optimización de variables en la síntesis de ácido cítrico utilizando *Aspergillus niger*, Tesis de Ingeniería Bioquímica, Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

Berovic M. and Cimerman A. (1979), Foaming in submerged citric acid fermentation on beet molasses, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 7, 313.

Berovic M., Legisa M. (2007), Citric acid production, *Biothechnol Annu. Rev.*, 13:303-43.

Clark D., Ito K., Horitsu H. (1966), Effect of manganese and other heavy metals on submerged citric acid fermentation of molasses, *Biotechnol Bioeng* vol. 8, 465–71.

Curie J.N. (1917), The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*, *J. BioL Chem.*, vol. 31, 15-37.

El-Enshasy H., Kleine J., Rinas U. (2006), Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pellets growth forms of recombinant *Aspergillus niger*, *Process Biochem*, 42: 2103-2112.

Grewal H., Kalra K. (1995), Fungal production of citric acid, *Journal of Biotechnology Advances*, vol. 13, 209-234.

Hossain M., Brooks J.D. and Maddox I.S. (1984), The effect of sugar source on citric acid production by *A. niger*, *AppL MicrobioL Biotechnol.*, vol. 19, 393-397.

Jiménez G.J.C. y Pérez, E.T. (2004), Estudio cinético de la obtención del ácido cítrico, en un biorreactor a nivel laboratorio y planta piloto, Tesis de licenciatura en Ingeniería Química, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco.

Kishore K., Kumar M., Krishna R., Reddy G. (2008), Optimization of Process Variables of Citric Acid Production Using *Aspergillus niger* in a Batch Fermentor, *Engineering Letter*, 16:4 - 17

Lehninger, A. (1987), Principios de Bioquímica, Omega 2ªEd. pp. 447- 465.

Leopold H. (1959), Ober das Verhalten Von invertase and glukoseoxydase wahrend der citronens~iureg~rung, *Die Nahurang*, vol. 3, 987.

Lesniak W. (1999), Citric acid biotechnology: fermentation substrates En: Kristiansen B., Matthey M. and Linden J. (editoriales), London, Taylor Francis Ltd., pp. 149–159.

Matthey, M. (1992), The production of organic acids, *Crit. Rev. Biotechnol.* vol. 12, 87-132.

Najafpour D. Ghasem (2007), Biochemical engineering and biotechnology, Iran, ELSEVIER, primera edición.

Papagianni M. (2007), Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling, *Journal of Biotechnology Advances*, vol. 25, 244-263.

Papagianni M. (1995), Morphology and citric acid production of *Aspergillus niger* in submerged culture, PhD Thesis, University of Strathclyde.

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, 710–7.

Prescott, S. y Dunn's (1987), A. Industrial Microbiology, 4ta edición. CBS Publishers and Distributors, New Dehli, India, August, 710-715.

Ramírez C. (2001), Factores determinantes para la selección y desarrollo de proveedores, en cuanto a insumos que no se producen en México o no son insuficientes (caso empresa de la industria química), Tesis de maestría en ciencias con especialidad en administración de negocios, Instituto Politécnico Nacional, Escuela Superior de Comercio y Administración.

Saffran M., Denstedt F., (1948), A rapid method for the determination of citric acid, Department of biochemistry, Montreal Canada.

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.

Shu P., Johnson M. (1948), Citric acid production by submerged fermentation with *Aspergillus niger*, *Ind Eng Chem* vol. 40, 1202–5.

Xu D.B., Kubicek C.P. and Rrhr M. (1989), A comparison of factors influencing citric acid production by *A. niger* grown in submerged culture and on filter paper, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 30, 444-449.

Conadesuca 1 http://www.infocana.gob.mx/mos_boletin.php?id=212 16/10/13

Conadesuca 2
<http://www.cndsca.gob.mx/documentos%20de%20interes/Minuta%20de%202013%20junio%202013.pdf> 16/10/13

Zafranet 1 <http://www.zafranet.com/2013/05/produccion-de-melaza-de-caa-alcanzara-los-2-millones-de-toneladas/> 16/10/13

Zafranet 2 <http://www.zafranet.com/2013/03/se-espera-alta-produccion-de-melaza/> 16/10/13

Zafranet 3 <http://www.zafranet.com/2013/04/sobrarn-alrededor-de-250-mil-toneladas-de-melaza-los-precios-a-la-baja/> 16/10/13