

Desarrollo de un bioproceso industrial de la producción de ácido cítrico por *aspergillus niger*

César Reyes, Luis López, Humberto Rubí y Octavio Ramírez

C. Reyes, L. López, H. Rubí y O. Ramírez
Universidad Politécnica del Valle de Toluca, Kilometro 5.6, carretera Toluca-Almoloya de Juárez,
Santiaguito Tlalcilcali, código postal 50904
cesarey2003@yahoo.com.mx

M. Ramos., V. Aguilera., (eds.) .Ciencias Naturales y Exactas, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago,
Guanajuato, 2013.

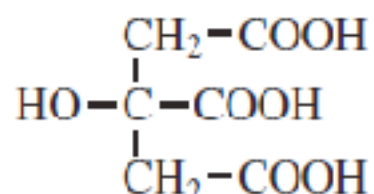
Abstract

Organic acids, such as citric acid, have increased their demand in the food industry and is one of the main metabolites produced by microorganisms in the Biotechnology industry. There are several citric acid-producing microorganisms: bacteria, fungi and yeasts, but the most used is the filamentous fungus *Aspergillus niger* called because it is the most adaptable to grow on various types of substrates .. The main purpose is to mount a bioprocess for producing citric acid, for this strain was obtained from *A. niger* (ATCC) citric acid producing subsequently mounted analytical techniques: biomass dry weight substrate and DNS method citric acid by the method of pyrimidine. Then optimized the culture medium to remove excess salts (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}). Later process was optimized in shake flasks of 500 ml nominal volume of 200 mL of culture medium at 200 rpm's being the best production. Finally, I simulate the process scaling to reactors 10 and 350,000 liters. The simulation process: fermentation and purification was 8 days, obtaining 27 tons of citric acid with an investment of 1, 616,723.00 USD.

12 Introducción

El consumo mundial de ácido cítrico va aumentando gradualmente año con año debido a que cada día se le encuentran más aplicaciones. La producción global de ácido cítrico se incrementó en 1.7 millones de toneladas en 2007, de acuerdo a estimaciones de Business Communications Co. (<http://www.bccresearch.com>). Debido a sus numerosas aplicaciones, el volumen de producción de ácido cítrico por fermentación se incrementa anualmente en un 5 % (Figenova *et al*, 2005) ^[1]. Por lo tanto, es importante mejorar el proceso de su producción y diseñar métodos más eficientes para su extracción y purificación. El ácido cítrico para uso comercial es producido por medio de fermentación de azúcares, principalmente la sacarosa y melazas, usando al hongo *Aspergillus niger* y levaduras. Este proceso puede ser por fermentación en sólido o sumergida (Reed y Prescott, 1991). El ácido cítrico (*Figura 12*) es un ácido orgánico que ha sido exitosamente producido en bioreactores a gran escala, por lo tanto, los métodos de síntesis aún no son competitivos con este tipo de tecnología.

Figura 12 Estructura química del ácido cítrico.



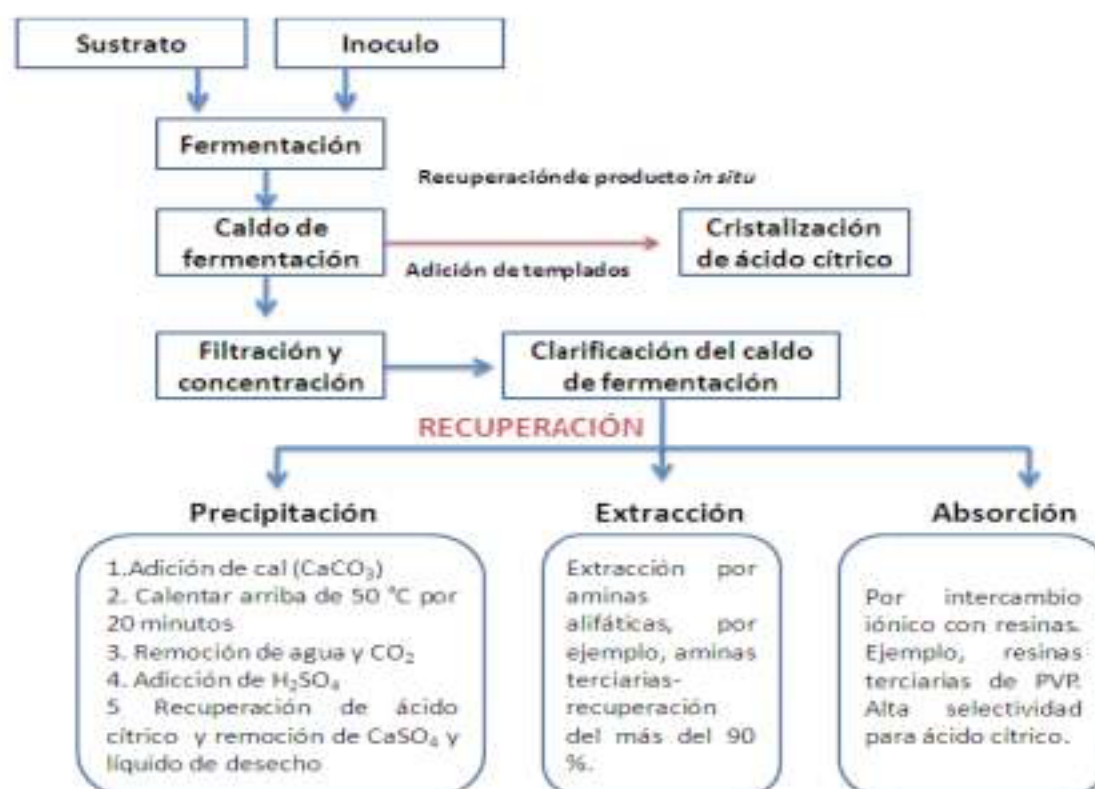
El ácido cítrico es utilizado en la industria de alimentos, medicina, agricultura e industria química, debido a sus propiedades únicas. El ácido cítrico se utiliza para ajustar el pH, como sustancia quelante o para formar complejos estables con iones metálicos multivalentes, también es usado para estabilizar emulsiones y otros sistemas multifásicos.

En resumen, el ácido cítrico es dulce, limpio, tiene sabor agradable y es utilizado como acidulante en diversos alimentos (Kirk-Othmer, 2002). El ácido cítrico, citrato de sodio y el citrato de potasio se utilizan para la elaboración de bebidas carbonatadas y no carbonatadas (National Soft Drink Association, 1982). Las bebidas bajas en calorías, isotónicas, utilizan solo ácido cítrico en combinación con sales de citrato para otorgar sabor y propiedades de *buffer* y para incrementar la actividad antimicrobiana. La alta solubilidad del ácido cítrico es importante para la elaboración de jarabes. Se puede combinar con ácido málico para obtener perfiles únicos de sabor. También se utiliza para estabilizar el pH en bebidas dietéticas. La concentración presente en muchas bebidas carbonatadas y de sabores están alrededor del 0.10-0.25 % (p/p).

Se estima que alrededor del 80 % de la producción mundial de ácido cítrico se obtiene por fermentación sumergida, en medios de cultivo que usan como base a la sacarosa y glucosa con *A. niger* (Vanderberghe, 1999), utilizando principalmente productos que utiliza la industria del azúcar, así como desechos agroindustriales (Rivas *et al*, 2008). Los procesos de fermentación sumergida usan fermentaciones en lote y lote alimentado, Dependiendo de las condiciones de fermentación, estas concluyen entre 5 a 12 días. Este tipo de procesos tienen mecanismos sofisticados de control, menor riesgo de contaminación, bajo costo en mano de obra, alta productividad y rendimientos. Las desventajas son: medio de cultivo caro, sensible a la inhibición por trazas de metales (Fe, Mn, Mg), riesgo de contaminarse y grandes cantidades de desecho (Vanderberghe, 1999).

La extracción del ácido cítrico producido en fermentaciones sumergidas se obtiene por el método clásico (Figura 12.1). Estos métodos pueden ser por cristalización, precipitación, extracción y absorción.

Figura 12.1 Esquema de la recuperación de ácido cítrico por el método convencional



12.1 Precipitación

Es uno de los métodos convencionales para extraer el ácido cítrico de una fermentación sumergida. En este caso, el caldo de fermentación se calienta a 50 °C por 20 minutos y es precipitado como citrato de calcio, usando carbonato de calcio y ácido sulfúrico (Pazouki y Panda, 1998). El precipitado (citrato de calcio) es entonces filtrado y lavado con agua varias veces, después es llevado a un acidulador y tratado con ácido sulfúrico. La solución es nuevamente filtrada para remover el CaSO_4 (Kioustelidis *et al*, 1979). El método de precipitación, a pesar de ser simple y extenso, genera problemas alternos, como la formación de productos indeseables.

12.2 Extracción por solventes

Aunque el método clásico por precipitación es la técnica más utilizada en procesos industriales, la separación por solventes también ha sido usada para separar ácido cítrico. La extracción por medio de aminas parece ser un método prometedor para ácidos carboxílicos disueltos en soluciones acuosas. El ácido cítrico es fácilmente extraído por un gran número de solventes orgánicos, tales como las aminas alifáticas de alto peso molecular (Pazouki y Panda, 1998) y se reportan hasta 90 % de recuperación de ácido cítrico con el método de extracción antes mencionado. El método de extracción por aminas es muy favorecido a pH's muy bajos (abajo del pKa más pequeño) y se favorece su reactividad con aminas terciarias básicas. Las ventajas de este método son: consumo mínimo de ácidos y bases minerales, y menor generación de co-productos, no se evaporan grandes cantidades de agua.

12.3 Justificación

Alrededor del mundo existe una tendencia por incrementar la producción de ácido cítrico debido a la gran cantidad de nuevas aplicaciones que se le están descubriendo. Sin embargo, México a pesar de producir ácido cítrico de la fruta del limón y tener algunas plantas industriales de producción por medio de fermentación sumergida no existe autosuficiencia. Un gran porcentaje del ácido cítrico consumido en la industria de alimentos, industria química y otras es importado de otros países como Estados Unidos. Por lo cual existe una oportunidad para implementar tecnologías para su producción en nuestro país. Una de ellas es la producción de ácido cítrico por medio de fermentación sumergida usando a *Aspergillus niger* como microorganismo productor.

12.4 Objetivos General

Desarrollar un bioproceso para la producción industrial de ácido cítrico por medio de *Aspergillus niger*

Particulares

Diseñar medios de cultivo para producir ácido cítrico por medio de *A. niger*.

Escalar el proceso a reactores agitados mecánicamente para producir ácido cítrico.

Diseñar y montar un procesos de bioseparación y purificación de ácido cítrico producido a través de fermentación sumergida por *A. niger*.

Simular el proceso en el programa *Design Pro Plus* (Ver. 8.7)

Estimar costos de equipo

12.5 Método

Métodos analíticos

Propagación de esporas en cajas Petrí. El hongo se crece en agar papa dextrosa (PDA-sigma). Se encuban a 30 °C y subcultivandolo cada dos semanas. Después de 7-10 días de incubación se les adicionan a cada placa 10 mL de Tween al 0.1 % (Sigma) para retirar las esporas y diluirlas en una suspensión a 1.0×10^7 esporas/mL. La concentración de esporas se usó una cámara de Neubauer.

Conteo de esporas por Cámara de Neubauer. De la suspensión de esporas se pipetea una suspensión de células en el porta, en el borde del cubre, rellenando la cámara de recuento por capilaridad. En el fondo del porta hay grabada una rejilla de 1 mm^2 , dividida en 25 cuadrados grandes, cada uno de los cuales está dividido en 16 cuadrados más pequeños. El volumen total de la rejilla es de $0,02 \text{ mm}^3$ ($1/50 \text{ mm}^3$).

Se cuentan las esporas de uno de los 25 cuadros grandes (en la práctica se cuentan varios cuadros y se hace saca el promedio).

El número de células multiplicado por 25 es el número en 0.02 mm^3 .

El número multiplicado por 50, es el número en 1 mm^3 .

El número multiplicado por 1000 es el número en 1 mililitro (1 centímetro cúbico).

Si existen 12 esporas en uno de los 25 cuadros grandes, se obtendría el siguiente número de esporas: $12 * 25 * 50 * 1000 = 1.5 \times 10^7$ células /ml.

Determinación de biomasa por peso seco:

La determinación de la concentración de biomasa se llevó a cabo por un método gravimétrico de peso seco (en g/L).

Se mezclan 10 mL de caldo de cultivo con 1.0 mL de EDTA (0.1 M) y 1.0 mL de NaCl (1.0 M).

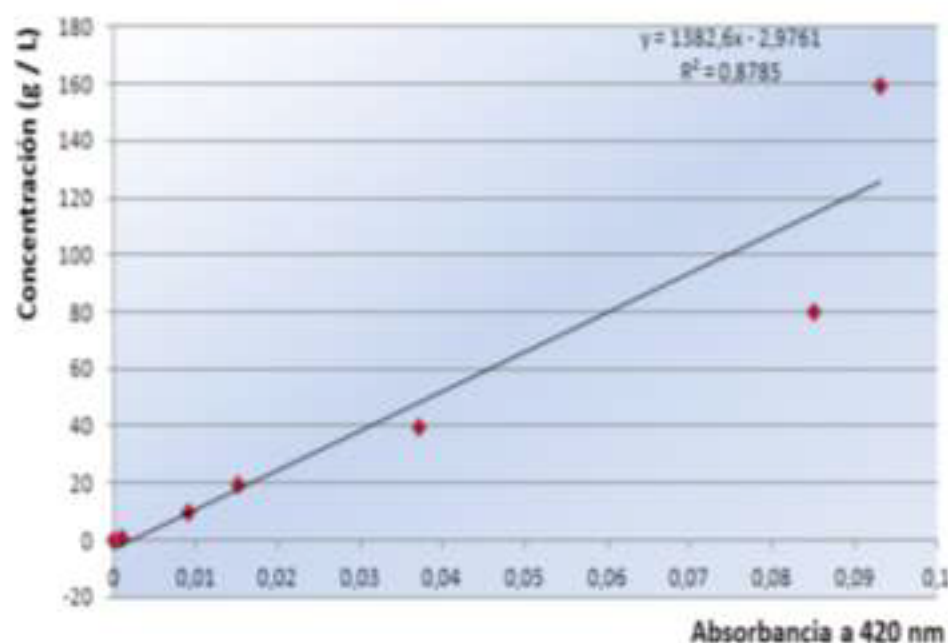
La suspensión anterior se filtra al vacío a través de membranas *Nucleopore* de 0.45M de tamaño de poro, previamente taradas.

La membrana se seca por 24 horas a 70 °C en estufa, para finalmente pesarse y obtener por diferencia de peso la cantidad de biomasa (peso seco).

Determinación de ácido cítrico (Marrier y Boulet, 1958)

Se determina usando el espectrofotómetro a longitud de onda de 420 nm. Se le adiciona piridina y acético anhídrido. Por cada 3 mL de muestra, se le agregan 1.7 mL de piridina y 5.6 mL de acético anhídrido (Sigma Co). Después se desarrolla color, la curva patrón se muestra en la Grafico 12.

Grafico 12 Curva Patrón para la determinación de ácido cítrico.



Determinación de sacarosa por el método de-fructofuranosidasa-DNS: Este método se basa en la hidrólisis de la sacarosa usando una invertasa y la posterior medición de los azúcares reductores libres por la reducción del ácido dinitrosalicílico (DNS), formando un compuesto nitroaminado colorido (amarillo), cuya densidad óptica es proporcional a la concentración de grupos reductores (Miller, 1959).

Preparación de reactivos: la solución de DNS se preparó pesando 16 g de hidróxido de sodio, 300 g de tartrato de sodio y 10 g de DNS y mezclar en este orden en 1.0 L de agua destilada, calentando para una disolución total, con adición lenta del DNS para evitar precipitación.

La solución enzimática se preparó como sigue: mezclar 2.5 mg de la enzima fructofuranosidasa (Gist-Brocades con una actividad de 243 U/mg a 40 °C) con 1 mL de amortiguador de citratos (0.32 M, pH 4.6).

El procedimiento es como sigue:

Se tomó una alícuota de 1.0 mL del caldo de fermentación y se diluyó 1/25 con agua destilada y se sirvieron 0.9 mL en tubos de ensayo y se mezclaron con 0.1 mL de la solución enzimática.

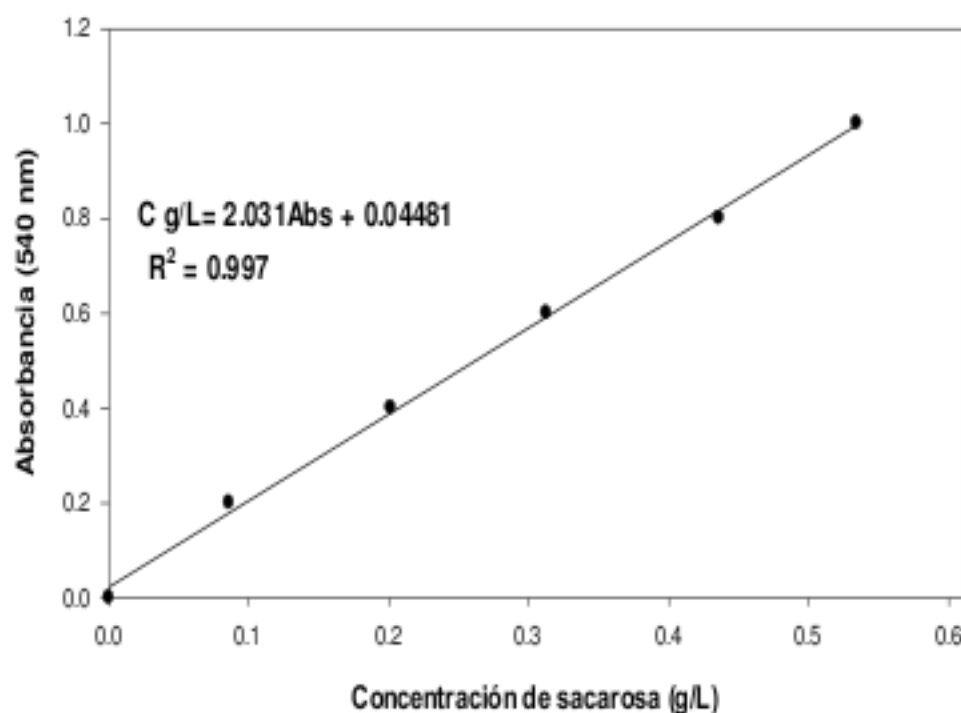
La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente se adicionaron 1 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico, Sigma Chemical Co.) a cada muestra.

Los tubos se calentaron a ebullición durante 5 minutos e inmediatamente después se enfriaron en baño de hielo.

A cada tubo se le adicionaron 10 mL de agua destilada y se leyó la absorbancia a 540 nm (espectrofotómetro Beckman DU 650) contra un blanco de reactivos.

Los valores se extrapolaron en la curva patrón (Grafico 12.1), la cual se elaboró utilizando soluciones de sacarosa en concentraciones de 0.2 a 1.0 g/L.

Grafico 12.1 Curva patrón para la determinación de sacarosa



12.6 Métodos de Ingeniería

Cultivo en matraces agitados

Los cultivos en matraces se realizan por duplicado, llevándose a cabo en matraces Erlenmeyer convencionales de 500 mL de volumen nominal, conteniendo 200 mL de medio Burk, a velocidades de agitación de 100-250 r.p.m., excentricidad de 2.5 cm y 30°C, durante 220 horas, en una incubadora New Brunswick, modelo G-25.

12.7 Determinación del suministro de potencia en matraces

El suministro de potencia en cultivos de matraces agitados se reportó por medio de la siguiente ecuación Büchs *et al* (2000a):

$$\frac{P_g}{V_L} = \frac{C \rho n^3 d^4 \text{Re}^{-0.02}}{V_L^{2/3}} \quad (12)$$

Donde:

P_g/V = Potencia volumétrica gaseada.

$C=1.94$ (coeficiente de la ecuación de Büchs *et al* (2000)).

$\dot{\rho}$ = densidad.

N = velocidad de agitación.

d = diámetro máximo del matraz.

μ = Viscosidad.

V_L = volumen del líquido.

Para Reynolds:

densidad del líquido (kg/m^3)

velocidad de agitación (s^{-1})

diámetro máximo interno del matraz (m)

viscosidad del caldo de cultivo (Pa s)

12.8 Determinación de consumo de potencia en fermentador

Para la determinación del suministro de potencia en el fermentador de 14 litros (con 10 litros de volumen), a éste se le adaptó una base para poder montarlo sobre un dinamómetro de cojinete neumático (Reséndiz *et al*, 1991). Este tipo de dinamómetro permite la determinación del torque de reacción debido a la rotación del impulsor inmerso en el fluido.

Una celda de carga detecta la fuerza de reacción. Con la ayuda de ésta y el brazo de palanca, se calcula el torque de reacción. El torque relaciona el brazo de palanca utilizado y la fuerza suministrada, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$M = F * B \tag{12.1}$$

donde:

B= Brazo de palanca utilizado (0.20 m)

M= Torque (N.m)

F= Fuerza (N)

La potencia se relaciona con el torque (M) transmitido por el impulsor de acuerdo a la siguiente relación:

Velocidad angular

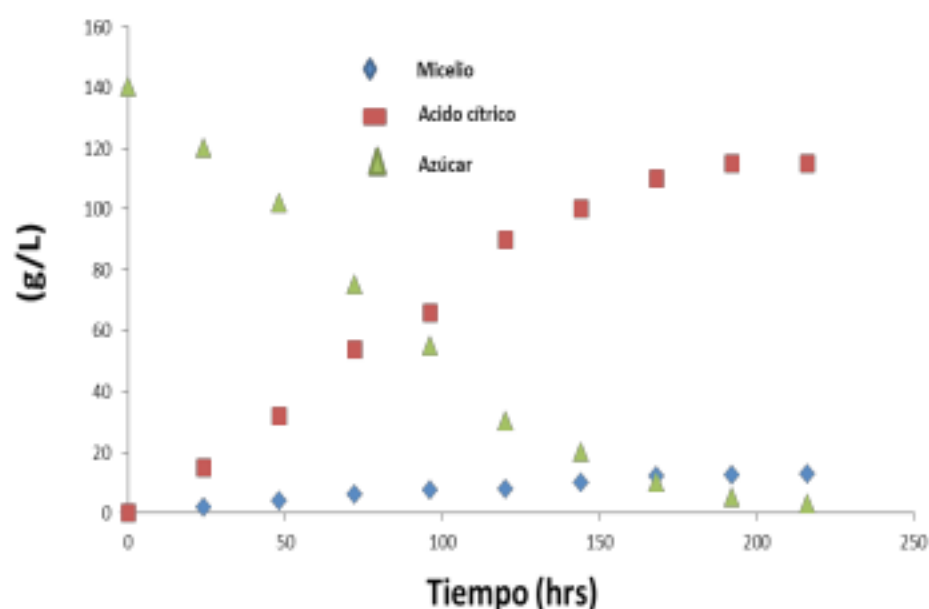
Velocidad de agitación

Software: Programa SuperPro Designer: Se obtuvo un Demo del Programa Super Pro DesignerTM de Intelligent, Inc. (New Jersey, USA). Este Demo corre programas de estudios de caso del libro (Heinzle *et al*, 2006), este software nos permite correr y simular procesos.

12.10 Resultados y discusión

De acuerdo a las ecuaciones mostradas a 200 rpm's con 2.5 cm de excentricidad a 30 °C se obtuvieron los mejores resultados de matraces agitados (Grafico 12.2). En este caso se obtuvo una potencia de 0.17 W/L.

Grafico 12.2 Producción de ácido cítrico, consumo de sustrato y formación de biomasa en matraces agitados a 200 rpm's con 200 mL de cultivo. El consumo de potencia en este caso fue de 0.17 W/L



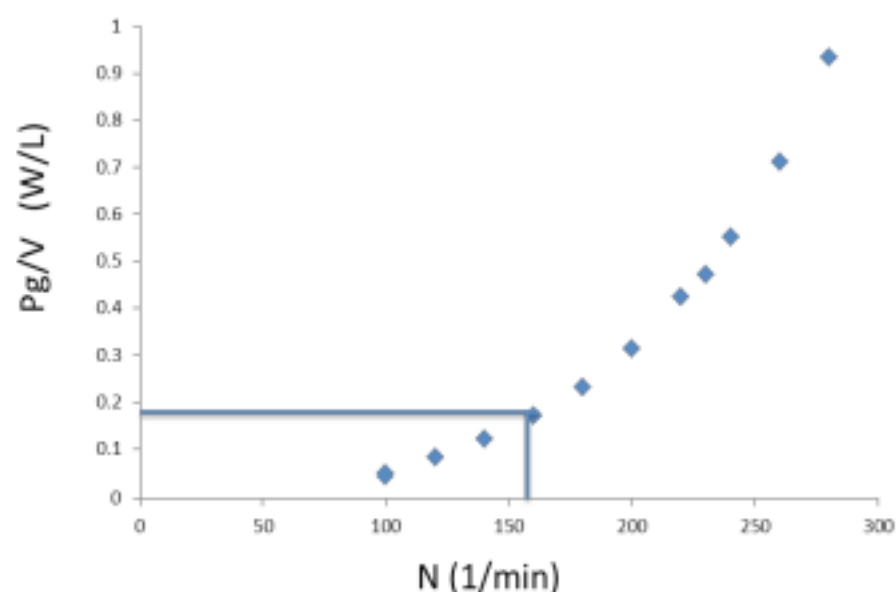
La cinética muestra que obtienen 114 g/L de ácido cítrico a partir de 140 g/L de azúcar, mientras que el azúcar residual se consume por completo, la concentración de biomasa al final del cultivo fue de 13 g/L, el proceso deja de producir ácido cítrico a partir de las 170 horas de cultivo.

Estas cinéticas fueron el resultado de la optimización del medio de cultivo, donde se disminuyó de forma constante el Fe, Mg y Cu (las cinéticas no se muestran), el exceso de sales minerales inactivan a las enzimas del Ciclo de Krebs, las cuales son responsables de la formación de ácido cítrico.

Para escalar se utilizó como criterio de escalamiento a la potencia volumétrica (W/L) a bioreactores de varias escalas: 14 lts y 35, 000 litros.

Los resultados de consumo de potencia en el reactor de 10 litros se muestran a continuación (Grafico 12.3).

Grafico 12.3 Determinación experimental del consumo de potencia en el bioreactor de 10 Litros a través de un dinamómetro



Al escalar el proceso a reactor de 14 litros con 10 litros de volumen de trabajo se encontró que a 160 rpm, se obtiene la potencia estimada en matraces (0.17 W/L).

Mientras que en el reactor de 350,000 litros se estimó el mismo consumo de potencia pero a una agitación de 63 rpm.

La determinación experimental nos sirvió para ajustar los valores del consumo de potencia; la geometría en ambos reactores se mantuvo, con 3 pares de turbinas Rushton y 0.8 VVM's.

Una vez conseguidas las condiciones de operación en los bioreactores simuló su producción (esto se realizó debido a que existen muchos casos de éxito de escalamiento de matraces a bioreactores y en bioreactores de diferentes escalas) (Galindo, 2012 Comunicación personal).

Manteniendo los mismos rendimientos de matraces ($Y_{x/s}$ y de $Y_{x/p}$) se obtienen los siguientes resultados (Tabla 12):

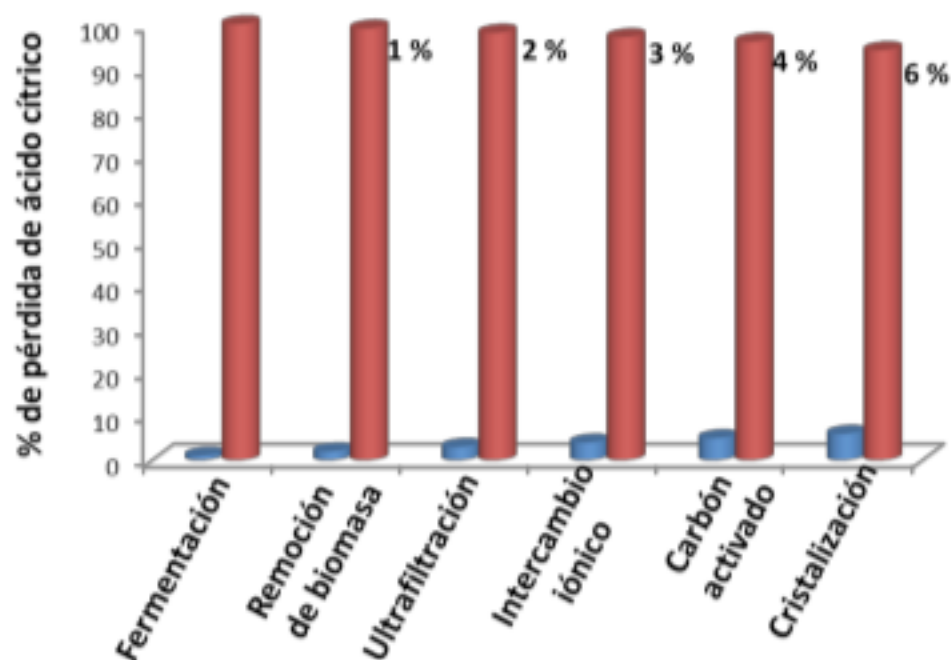
Tabla 12 Producción volumétrica de ácido cítrico y biomasa en los diferentes reactores: a partir de la misma concentración de azúcar (140 g/L)

Matraz de 0.5 L Vol. de trabajo 0.2 L	Fermentador de 14 L Vol. de trabajo de 10 L	Fermentador de 350,000 L Vol. de trabajo de 238,888 L
Azúcar = 0.028 Kg Biomasa = 0.0026 Kg Ac. Cítrico = 0.0228 Kg	Azúcar = 1.4 Kg Biomasa = 0.13 Kg Ac. Cítrico = 1.14 Kg	Azúcar = 33,444.3 Kg Biomasa = 3,105 Kg Ac. Cítrico = 27,233 Kg

El cuadro muestra que se logran producir en el reactor industrial (350, 000 litros) 27,233 kilos de ácido cítrico por lote, este resultado concuerda con varias publicaciones donde se reportan resultados similares, significa que se está alcanzando la optimización del medio de cultivo (Datos no mostrados).

Una vez determinadas las condiciones del reactor industrial y de su producción por *batch*, se usó el Programa *SuperPro Designer* (Ver. 8.7) para simular la purificación, el cual consiste de: remoción de biomasa, ultrafiltración, columna de intercambio iónico, columna de carbón activado, condensación, cristalización, filtración al vacío y secado. La simulación nos indica los siguientes resultados (Grafico 12.4):

Grafico 12.4 Proceso de purificación de ácido cítrico simulado en *SuperPro Designer*



El resultado de purificación de ácido cítrico resulta en la pérdida del 6 %, principalmente en la cristalización (2 %), mientras que se pierde el 1% en la remoción de biomasa, ultrafiltración, en la columna de intercambio iónico, y en la columna de carbón activado. Quedando solo el 94 % del ácido cítrico obtenido de la fermentación.

Para conocer la producción total de ácido cítrico al año se simuló el desarrollo de todo el bioproceso en *SuperPro Designer* (Ver. 8.7), obteniendo los siguientes resultados (Grafico 12.5).

Grafico 12.5 Distribución del equipo de bioproceso de fermentación de ácido cítrico en *SuperPro Designer*, incluyendo *Upstream* y *Downstream*.



El análisis final muestra que para llevar a cabo un cultivo *batch* es necesario 192 horas (8 días), por lo cual al año se pueden realizar 45 cultivos *batch* de 35,000 litros (Tabla 12.1).

Tabla 12.1 Estimación en base a *SuperPro Designer* (Ver. 8.7) de la producción anual de ácido cítrico en fermentador de 35,000 litros con volumen de trabajo de 238888 litros de trabajo

45 cultivos <i>Batch</i> al año de 238888 L	1225.485 toneladas
Cantidad de ácido cítrico después de la purificación	1151.955 toneladas
Costo del ácido cítrico anual producido al año (1.8 USD/Kg)	2,073,520 USD
Costo total del equipo para el bioproceso	1, 616,723 USD

12.11 Discusión

Este tipo de ejercicios nos permite saber que tan factible es llevar a cabo un proceso a nivel industrial, en este caso, la cepa de *Aspergillus niger* es potencial para llevar a cabo este proceso a la industria, ya que se consiguen productividades bastante aceptables.

En este trabajo se evaluó la producción así como el costo de equipo, el cual es aún está fuera del alcance de la empresa por lo que es necesaria la búsqueda de inversionistas.

De igual forma hace falta hacer un estudio del costo total de la materia prima, de la mano de obra, transporte, gasto en energía, agua para ver la factibilidad del equipo, sin embargo es un avance muy significativo que ha permitido a la empresa METCO S.A. de C.V. llevar a cabo ajustes en su inversión para una producción de ácido cítrico a mediano y largo plazo. Por parte de la Universidad Politécnica del Valle de Toluca hace falta llevar a cabo fermentaciones a escala piloto en bioreactores para seguir optimizando medios de cultivo, así como la evaluación de diferentes cepas de *A. niger*.

12.12 Conclusiones

Se logró diseñar y optimizar el medio de cultivo para producir ácido cítrico por medio de *A. niger*.

Se montaron las técnicas analíticas para llevar a cabo el proceso de ácido cítrico.

Se simuló el escalamiento de matraces a bioreactores de planta piloto y bioreactor industrial (350,000 litros).

Se diseñó y montó un proceso de bioseparación y purificación de ácido cítrico producido a través de fermentación sumergida por *A. niger*.

Se logró simular el proceso en el programa *Design Pro Plus*
Se estimó el costo total del equipo para el bioproceso .

12.13 Referencias

Büchs, J., Maier, U., Milbradt, C., and Zoels, B. 2000a. Power consumption in shaking flasks on rotary machines. I Power consumption measurements in unbaffled flasks at low viscosity. *Biotechnology and Bioengineering*, 68 (6): 589-593.

Finogenova, T.V., Morgunov, I.G., Kamzolova, S.V. and Chemyayskaya, O.G. 2005. Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica*: A review of prospects. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 41:418-425.

Heinzle, E., Biber, A., Cooney C. 2006. *Development of Sustainable Bioprocesses: Modeling and Assessment*. John Wiley & Sons, Ltd. USA.

Kioustelidis, J., Haberstroh, H.J., Werner, P., Koob, H.J. 1979. Separating citric acid from oxalic acid. *Ger.Offen* 2/931/776.

Kirk-Othmer. 2002. Citric acid. *Encyclopedia of Chemical Technology*. Wiley and Sons Inc., pp 631-657.

Marrier, J. R. y Boulet, M. (1958). "Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine-acetic anhydride method". *Journal Dairy Science*, 1, 1683-1692.

Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 107: 59-64.

Pazouki, M. and Panda T. 1998. Recovery of citric acid-A review. *Bioprocess Engineering*. 19:435-439.

Reed, G., Prescott. 1991. *Industrial Microbiology*. 4ta Ed. Prescott and Dunn's. pp 709-749.
Reséndiz, R., Martínez, A., Ascanio, G. and Galindo, E. 1991. A new pneumatic bearing dynamometer for power-input measurements in stirred tanks. *Chemical Engineering Technology*, 14: 105-108.

Rivas, B., Torrado, A., Torre, P., Converti, A. and Dominguez, J.M. 2008. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56:2380-2387.

Vanderberghe, L.P.S., Soccol, C.R., Pandey, Z. and Lebeault, J.M. 1999. Review: Microbial production of citric acid. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 42:263-276.

