

Artículos Originales Completos

Factores que afectan la producción de ácido cítrico en cultivo sumergido por *Aspergillus niger* 110

R. GÓMEZ, I. SCHNABEL Y J. GARRIDO

Instituto de Fermentaciones Industriales. U.E.I. Tecnología de las Fermentaciones y Bioingeniería. Arganda del Rey 28500, Madrid, España

Recibido en agosto de 1987

RESUMEN

Se estudian las condiciones de cultivo para conseguir cultivos sumergidos de *Aspergillus niger* 110, totalmente dispersos en el medio y productores de rendimientos reproducibles y aceptables de ácido cítrico. Los resultados de las fermentaciones llevadas a cabo con diferentes sistemas de agitación, medios de cultivo y flujos de aireación, son utilizados para explicar cómo influyen estos parámetros en la producción de ácido cítrico.

SUMMARY

Culture conditions are studied to achieve fully dispersed submerged cultures of *Aspergillus niger* 110, producing an acceptable yield of citric acid. The results of fermentations carried out with different agitation systems, culture media and aeration flows, are used to explain how those parameters affect citric acid production.

INTRODUCCION

La producción de ácido cítrico por fermentación de sustratos carbohidratados por *Aspergillus niger*, es una de las fermentaciones más antiguas, pero no por ello mejor conocida. Tradicionalmente, la producción de ácido cítrico por fermentación se ha realizado en cultivo superficial, aunque en los últimos años se tiende a la producción en cultivo sumergido, ante las ventajas, sobre todo de índole económico, que tiene este procedimiento.

La fermentación sumergida presenta también serios inconvenientes: mayor complejidad de diseño y las terribles consecuencias de una operación incorrecta; más atención en su cuidado, por ser más sensible a cualquier desviación de las condiciones ambientales idóneas; cizalla del agitador, la cual puede evitar la formación de pellets, que es la morfología del cultivo deseable en esta fermentación.

Numerosa es la bibliografía existente sobre el efecto favorable que tienen en esta fermentación la aireación del cultivo (Clark y Lentz, 1961; Kubicek *et al.*, 1980), y la utilización de medios con alta concentración de sacarosa (Currie, 1917) y concentraciones limitadas de metales (Clark *et al.*, 1966; Sánchez-Marroquín *et al.*, 1970; Kubicek y Rohr, 1977), de fosfato (Shu y

Johnson, 1948; Chmiel, 1975), y de nitrógeno (Kristiansen y Sinclair, 1978).

No obstante, la mayoría de los autores han tratado de encontrar una razón única que explique la acumulación de ácido cítrico por *Aspergillus niger*, lo que lleva al fracaso si no se considera que cada fase de la fermentación depende de la precedente. De poco sirve mantener las condiciones óptimas de cultivo durante la acidogénesis, si primero no ha sido inducida la alteración del metabolismo del hongo durante el desarrollo de sus esporas, la formación del inóculo y el crecimiento vegetativo de este.

En este trabajo se muestra la visión global del proceso, incluyendo en él: a) diseño del equipo de fermentación a escala de laboratorio; b) desarrollo normalizado del proceso de manufactura de ácido cítrico, para la fermentación sumergida de azúcar de caña, extensivo a melazas tratadas.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos

Se utilizó la cepa *Aspergillus niger* 110, perteneciente a la colección de microorganismos del Instituto de Fermentaciones Industriales. Esta cepa esporula abundantemente en los medios patata-glucosa-agar (PGA) y extracto de malta, y tolera en cultivo superficial concentraciones altas de fosfato y de hierro (Gómez et al., 1985) características deseables de una cepa industrial.

Preparación de inóculo

Se realizó mediante la técnica de inoculación que se describe seguidamente, que permite el desarrollo del hongo en pellets (Gómez et al., 1987) que es la morfología del cultivo deseable en esta fermentación. Se inocularon 2 ml de la suspensión de esporas en 100 ml del medio a fermentar, contenidos en ampollas de 300 ml (Llaguno y Garrido, 1960), que se incubaron en un agitador recíproco (28 °C, 26 h). El fermentador se inoculó con dos de estos precultivos, con una relación aproximada de volumen de inóculo al de medio a fermentar del 8 %.

Las suspensiones de esporas se prepararon arrastrando con 100 ml de agua estéril, las que cubrían la superficie del medio PGA de una caja petri. El número de esporas se determinó "turbidimétricamente", después de relacionar la densidad óptica con el conteo directo de esporas. La suspensión final contenía de 5 a 65×10^7 esporas/ml.

Composición de medios

Se utilizaron los medios PGA, para esporular la cepa, diferentes medios sintéticos para preparar el inóculo y realizar los experimentos en el fermentador. Estos últimos han sido el medio S-17 y los resultantes de variar las concentraciones de sacarosa y fosfato en este, que se muestran en las leyendas de las figuras 2, 3 y 4. El medio S-17 tiene la siguiente composición: sacarosa, 100 g/l; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,16 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,4 g/l; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,35 g/l; K_2SO_4 , 0,33; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g/l, pH inicial 3,0.

Equipo de fermentación

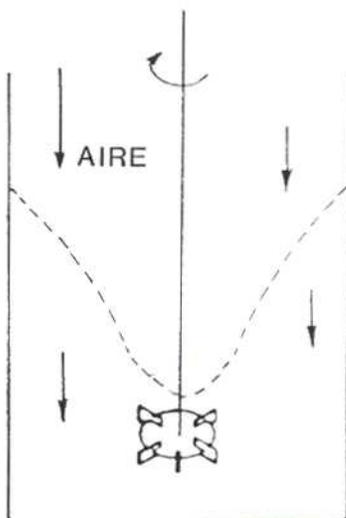
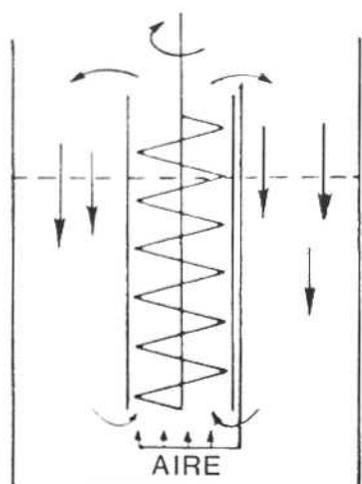
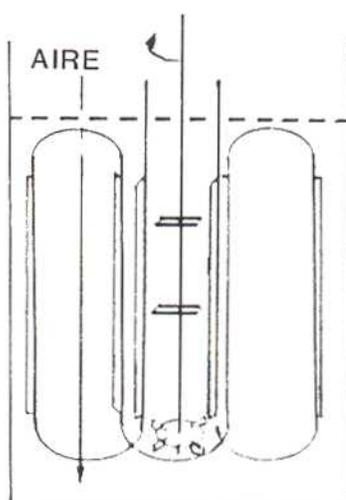
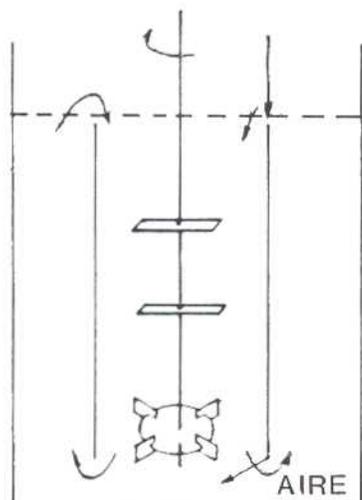
Se diseñó un fermentador de vidrio pyrex, cuyas tapas superior e inferior fueron de acero inoxidable, material utilizado también en las sondas y en los sistemas de agitación (S.A.), ensayados (mostrados en el esquema 1). La tapa superior llevaba ocho orificios, por los que se introducían herméticamente los elementos que a continuación se describen: a) eje del agitador; b,c,d) tubos de sujeción de los tres primeros S.A., utilizándose uno de ellos para la entrada al fermentador del aire estéril; e) tubo de salida de gases; f) sonda de temperatura; g-h) sondas medidoras de pH y oxígeno disuelto (O.D.).

Procedimiento de fermentación

Se ajustó el O.D. al 100 % de saturación en el momento de inocular el fermentador, después de 2 h de conectar la aireación.

Las fermentaciones se realizaron a 28 °C, a 1 000 rpm y 0,9 o 1,3 vvm de velocidad de aireación, utilizándose este segundo nivel de aireación en la fermentación de 150 g/l de sacarosa, únicamente. La toma de muestras se realizó a intervalos de 2 h, durante el período de transición entre las fases de crecimiento y acidogénica, y cada 24 h posteriormente.

SISTEMAS DE AGITACION UTILIZADOS EN EL FERMENTADOR



Determinaciones analíticas

La acidez total se estimó por valoración con NaOH, 0,1 N y el ácido cítrico por HPLC. Los azúcares reductores se determinaron por el método Shaffer Somogyi (Browne y Zerban, 1941) en los medios fermentados, después de neutralizados. En algunos ensayos también se determinaron por HPLC. El peso seco se estimó, después de filtración y secado de 10 ml de muestra (85 °C, 24 h).

RESULTADOS

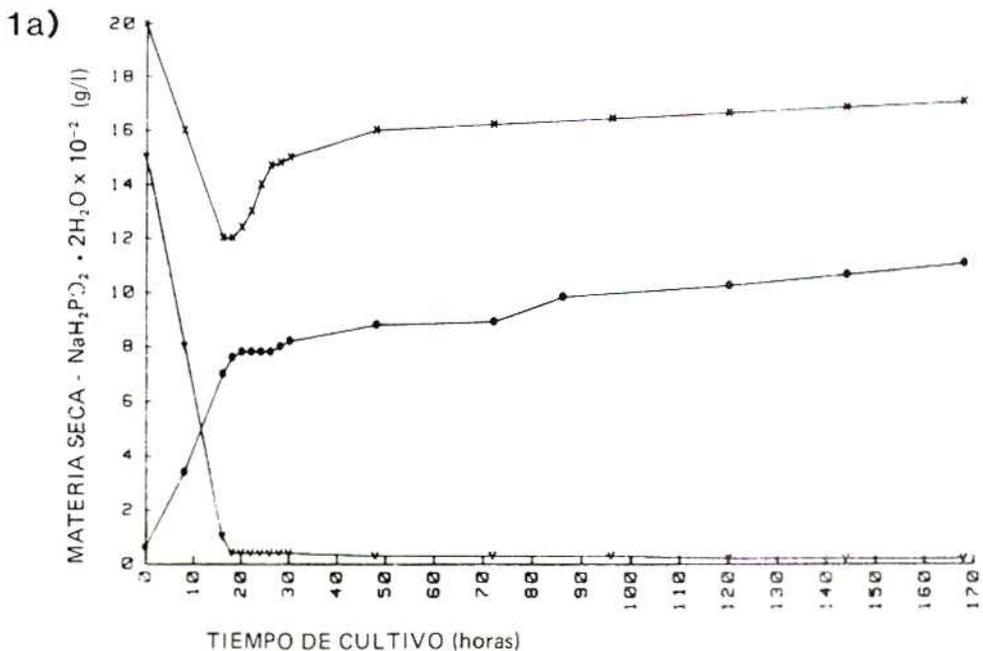
Diseño del equipo de fermentación

El sistema IV de agitación (S.A.) es el único de los mostrados en el esquema 1 que resultó efectivo para conseguir cultivos de *Aspergillus niger* 110 totalmente dispersos en el medio, y productores de rendimientos reproducibles y aceptables de ácido cítrico.

El hongo desarrolló en pellets estándares (pequeños, compactos y suaves), cuando fue inoculado en forma de pellets en el fermentador provisto del mencionado S.A., y fue cultivado a 1 000 rpm, desde el comienzo de la fermentación (Gómez *et al.*, 1987). Las hifas de estos pellets, observadas al microscopio, presentaron unos ensanchamientos característicos (probablemente clamidosporas), típicos de los cultivos productores de ácido cítrico (Schweiger, 1961).

Crecimiento y producción de ácido cítrico de *Aspergillus niger* 110

Aspergillus niger produce ácido cítrico por metabolismo aerobio del sustrato carbohidratado. Se distinguen dos fases diferenciadas en la fermentación, la de crecimiento y la de acidogénesis (Waldy Suzuki, 1976). La figura 1 muestra el curso de la fermentación cítrica del medio S-17 en cultivo sumergido por la cepa *Aspergillus niger* 110. El hongo aumentó su biomasa exponencialmente hasta que agotó el fosfato del medio, 14 horas de cultivo, y creció lentamente durante el tiempo restante de fermentación (figura 1a), en el que produjo ácido cítrico (figura 1b).



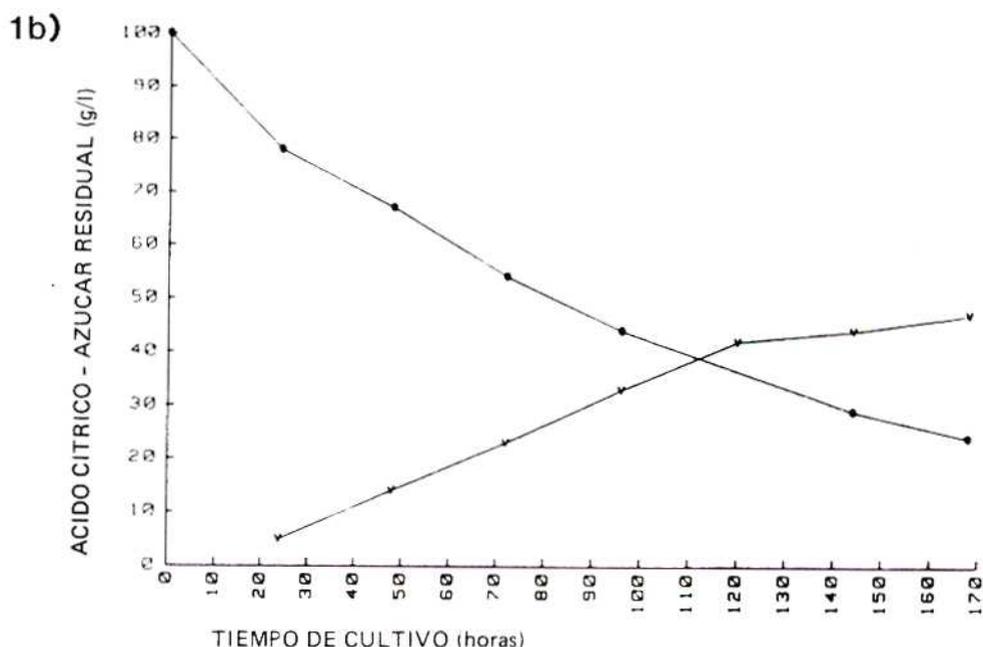


FIG. 1. Evolución de diferentes parámetros durante la fermentación cítrica sumergida de *Aspergillus niger* 110. 1a) oxígeno disuelto (X), incremento de materia seca (O), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ residuales (V); 1b) azúcar residual (O), acumulación de ácido cítrico (V). Los cultivos se llevaron a cabo en el medio S-17, a 1 000 rpm y 0,9 vvm de velocidad de aireación, durante 168 h a 28 °C.

El oxígeno disuelto en el medio (O.D.) disminuyó linealmente durante las primeras 18 horas de cultivo, fase de crecimiento del hongo. Alcanzó su valor mínimo al final de esta fase, y se mantuvo a continuación en valores superiores al mínimo, durante la acidogénesis (figura 1a). Evolución semejante de este parámetro, durante la fermentación cítrica, había sido referida anteriormente por Berovic y Cimerman (1982).

La producción de ácido cítrico comenzó a las 24 horas de cultivo, aumentó linealmente hasta las 120 horas, y disminuyó posteriormente la velocidad de producción entre las 120 y 168 horas de cultivo (figura 1b).

Optimización del proceso

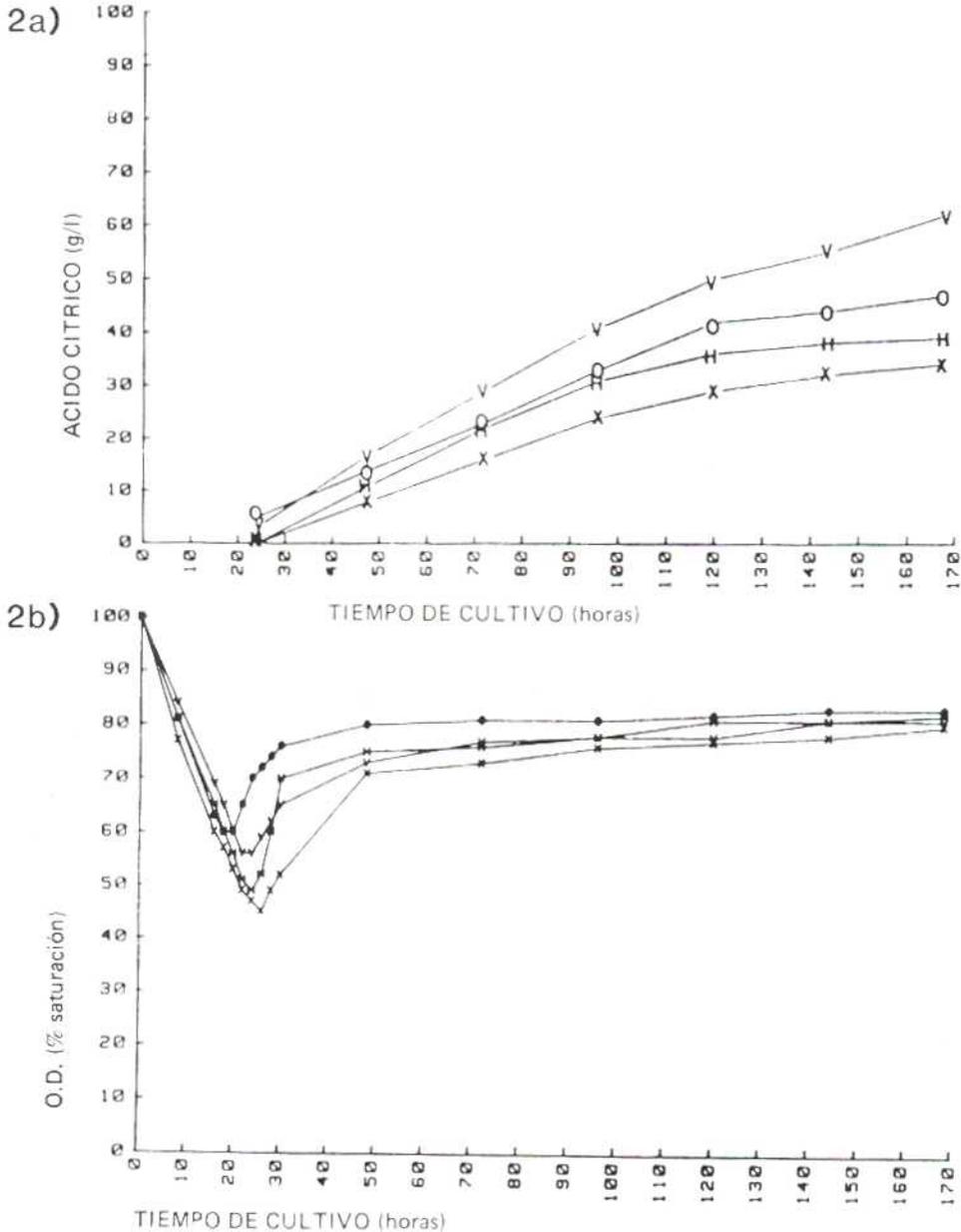
Aspergillus niger produce ácido cítrico en medios en alta concentración de sacarosa (Currie, 1917), y deficientes en fosfato (Shu y Johnson, 1948; Chmiel, 1975).

No obstante, si el medio está muy limitado en la concentración de este último nutriente, crecerá poco la biomasa que, en definitiva, es la que excreta el ácido, y probablemente la producción de ácido también será baja. La proporción de sacarosa a fosfato es también un factor importante (Furukawa *et al.*) para la alta productividad de ácido cítrico.

A continuación se muestra el efecto de ambos nutrientes sobre la producción de ácido cítrico por *A. niger* 110, y su relación con el nivel de O.D. en el medio.

Fosfato

La figura 2a muestra que *Aspergillus niger* 110 produjo la máxima cantidad de ácido cítrico a partir de 100 g/l de sacarosa, con 0,25 g/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ en el medio (relación sacarosa/fosfato 400, figura 3). El incremento de la concentración de este nutriente prolongó la duración de la fase de crecimiento (figuras 2b y 2c), y favoreció la producción de biomasa (figura 2c). Una vez finalizada la mencionada fase, o lo que es lo mismo, en el comienzo de la fase acidogénica, los valores de O.D. estuvieron en relación inversa a la concentración inicial de fosfato en el medio (figura 2b).



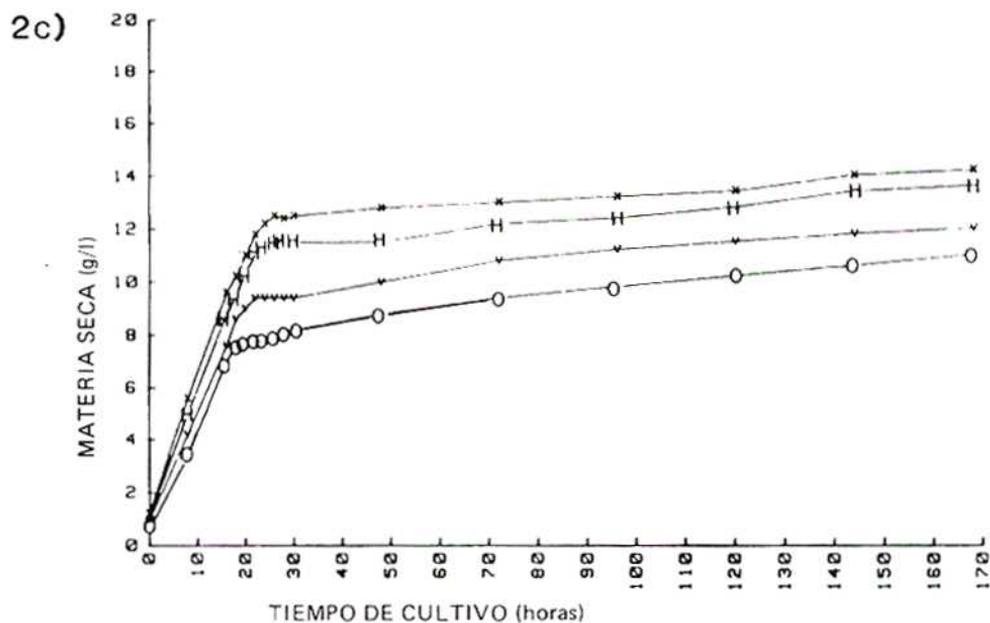


FIG. 2. Efecto de la concentración inicial de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ sobre la producción de ácido cítrico (2a); el nivel de O.D. (2b), y materia seca(2c), durante la fermentación cítrica. Símbolos: 0= 0,166; V= 0,250; H= 0,333; X= 0,500 g/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$. Los cultivos se efectuaron en las condiciones indicadas en la figura 1, exceptuando la concentración de fosfato.

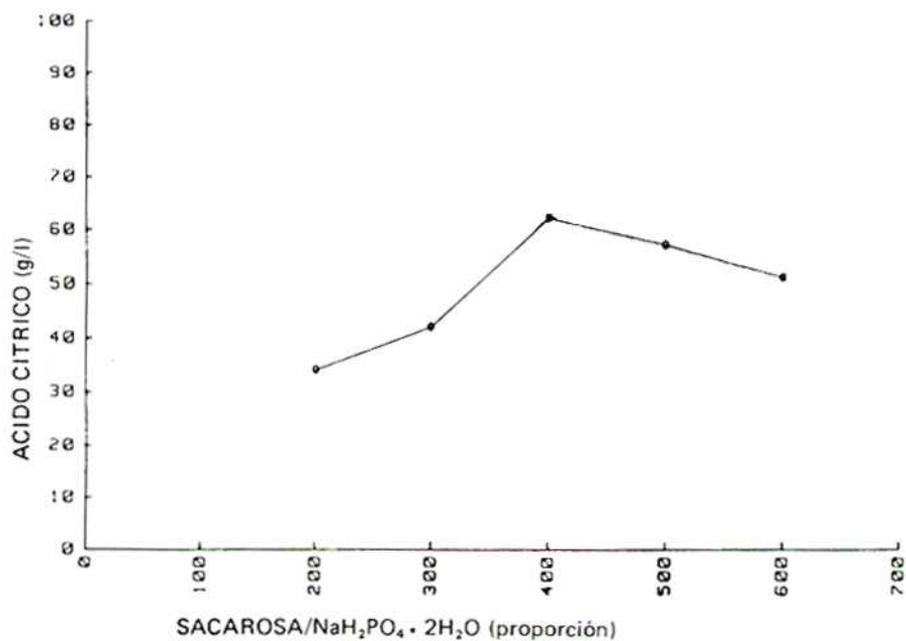
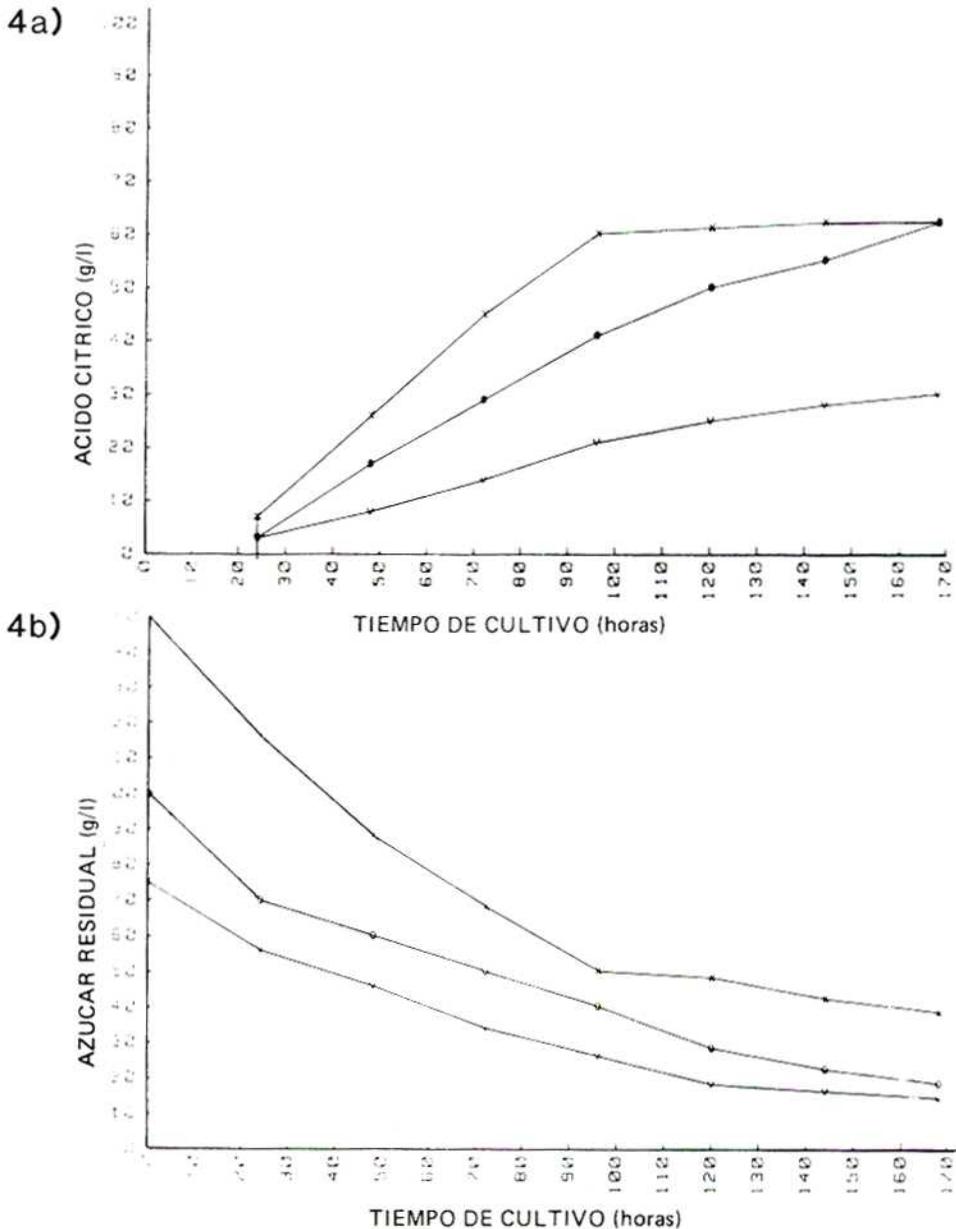


FIG. 3. Efecto de la proporción sacarosa/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ sobre la producción de ácido cítrico. Las condiciones de cultivo utilizadas fueron las indicadas en las figuras precedentes.

Sacarosa

La producción de ácido cítrico aumentó al incrementar la concentración de sacarosa hasta 100 g/l, y fue similar la cantidad obtenida con 100 o 150 g/l de sacarosa, independientemente de que se mantuviese fija la concentración de fosfato en estos medios (0,25 g/l) (tabla 1), o se variara (figura 4a), para mantener la proporción óptima entre ambos nutrientes. En la misma figura se muestra que esto se debió a la interrupción sufrida en la fermentación de 150 g/l de sacarosa, al haber bajado el O.D. al 25% de saturación (figura 4c), nivel inferior al crítico para la producción de ácido cítrico (Siebert y Schultz, 1979).



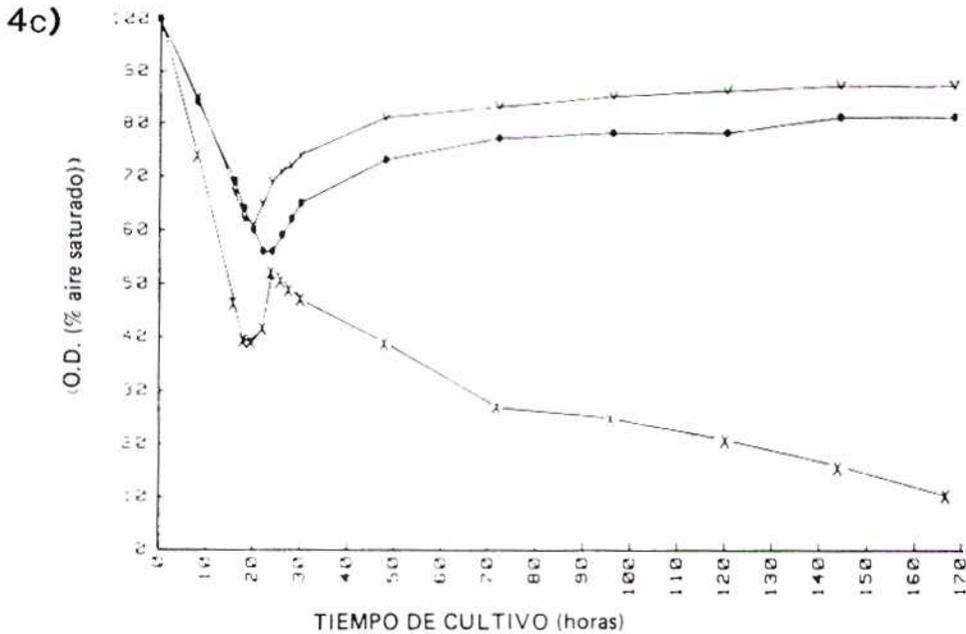


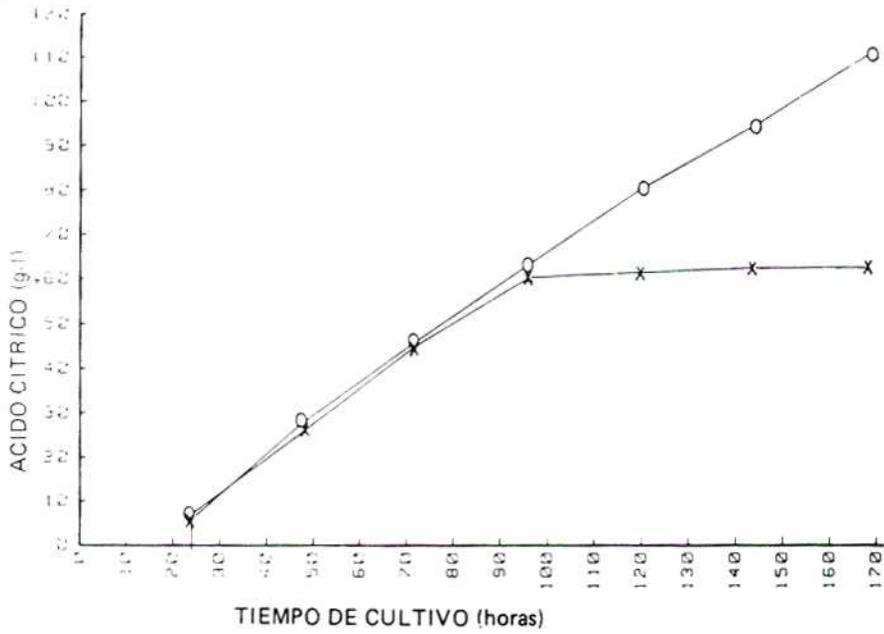
FIG. 4. Fermentación cítrica de diferentes medios (proporción sacarosa/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O} = 400$): 4a) acumulación de ácido cítrico; 4b) azúcar residual; 4c) oxígeno disuelto. Los medios contenían 75 g/l de sacarosa y O, 187 g/l de $\text{Na}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (V); 100 g/l de sacarosa y 0,250 de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (O); y 150 g/l de sacarosa y 0,375 g/l de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (X). La duración y temperatura de fermentación, así como las condiciones de aireación son las indicadas en las figuras precedentes.

Velocidad de aireación.

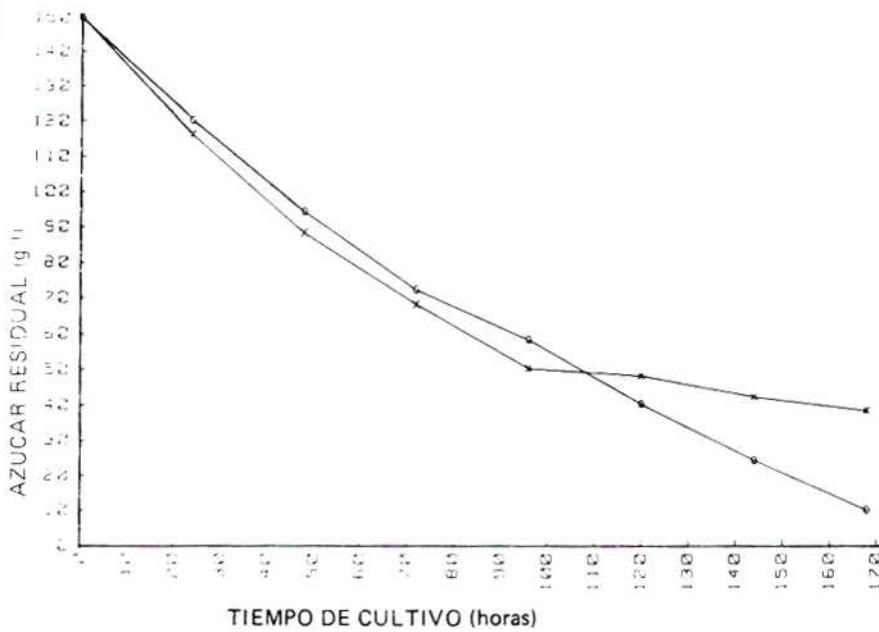
Aspergillus niger 110 produjo 61,3 y 110 g/l de ácido cítrico en el medio con 150 g/l de sacarosa (sacarosa/fosfato 400), según se cultivase a las velocidades de aireación 0,9 o 1,3 vvm (figura 5a), al interrumpirse la producción del ácido a las 96 h en el primer caso. Durante este período de tiempo, la acidez producida fue similar en ambas condiciones de aireación, a pesar de observarse un consumo superior de azúcar en la fermentación realizada a menor aireación (figura 5b). Al final de la fermentación (168 h), el consumo de azúcar sí fue proporcional a la producción de ácido cítrico, quedando 40,0 g/l de azúcares reductores (19,5 g/l de glucosa y 20,5 g/l de fructuosa) en medio fermentado a 0,9 vvm, y únicamente 10,0 g/l (trazas de glucosa y 10,0 g/l de fructuosa) en el fermentado a mayor aireación.

La evolución y niveles de O.D. durante la fermentación también dependieron de la aireación suministrada (figura 5c), observándose las diferencias más notorias después de finalizar la fase de crecimiento exponencial. Este parámetro disminuyó durante las primeras 19 h de los cultivos (fase de crecimiento exponencial), realizados a las velocidades de aireación 0,9 o 1,3 vvm (del 100 % al 38 % y 50 % de saturación respectivamente), aumentando posteriormente en ambos casos durante las 5 h siguientes (al 51 % y 60 % de saturación respectivamente) (figura 5). Después de este período inicial de fermentación, los niveles de O.D. disminuyeron del 51 % de saturación (24 h), al 47 % (30 h); 25 % (96 h), y 10 % de saturación (168 h) en la fermentación realizada a 0,9 vvm de velocidad de aireación, y aumentaron desde el 60 % de saturación (24 h), al 70 % (30 h), y 80 % de saturación (96 - 168 h) en la realizada a mayor aireación.

5a)



5b)



5c)

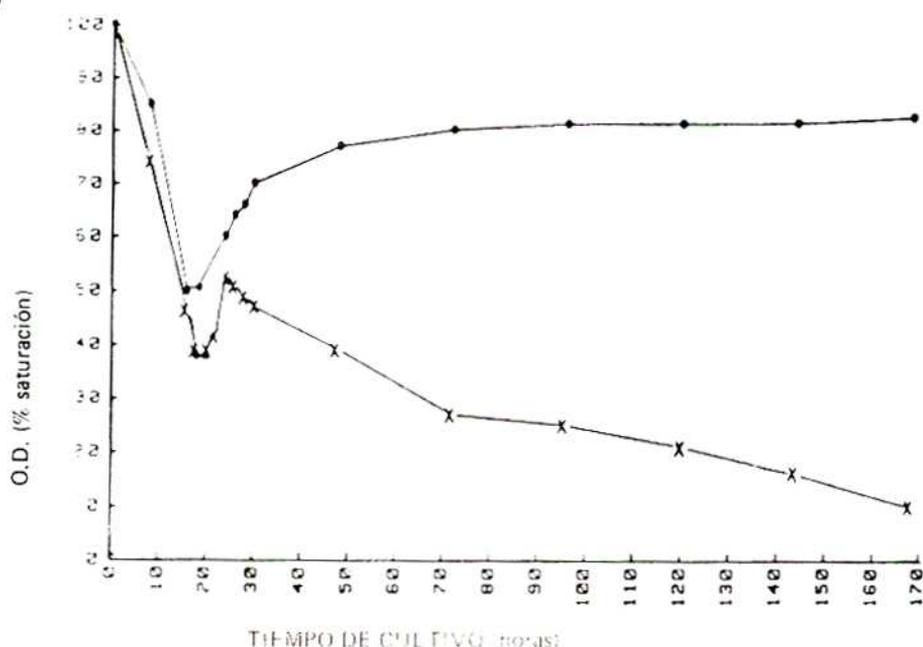


FIG. 5. Efecto de la velocidad de aireación sobre la fermentación cítrica de 150 g/l de sacarosa: 5a) acumulación de ácido cítrico; 5b) azúcar residual; 5c) oxígeno disuelto. Símbolos: X) 0,9 vvm; O) 1,3 vvm.

DISCUSION

Los resultados de este y de previos estudios (Gómez *et al.*, 1987), indican que el crecimiento uniforme de biomasa en el medio y su desarrollo en pellets, son factores importantes para la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* 110. El hongo desarrolla con esta morfología, cuando es cultivado en el fermentador provisto del IV S.A. (esquema 1), a 1 000 rpm desde el comienzo de la fermentación y se utiliza la técnica de inoculación mostrada en este trabajo.

La fermentación cítrica consta de dos fases diferenciadas, y excluyentes: la de crecimiento exponencial del hongo y la acidogénica (Wold y Suzuki, 1976). Nuestros resultados indican que la alternancia entre ambas fases está regulada por la concentración inicial de fosfato del medio (figura 1a y b y 2b), nutriente que también controla la producción de ácido cítrico (figura 2a), el crecimiento celular (figura 2c), y el nivel de O.D. después de finalizar la fase de crecimiento (figura 2b). Dado que esta fermentación necesita altas cantidades de O.D. (Kubicek *et al.*, 1980), la disminución de producción de ácido cítrico observada con las concentraciones crecientes de fosfato (figura 2a), posiblemente se deba a la reducción que este nutriente provoca en el nivel de O.D., después de finalizar la fase de crecimiento.

Otro factor importante en esta fermentación es la concentración inicial de sacarosa en el medio (Currie, 1917), mostrándose en este trabajo que su efecto depende de la concentración inicial de fosfato (proporción sacarosa/fosfato, figura 3), y principalmente de la aireación suministrada al cultivo. No se observa aumento de producción de ácido cítrico al incrementar la concentración de sacarosa de 100 a 150 g/l, cuando los cultivos se llevan a cabo en un agitador rotatorio (Gómez *et al.*, 1987) o en el fermentador a 1 000 rpm y 0,9 vvm de velocidad de

aireación. En cambio, se observa aumento de acidez proporcional al incremento de sacarosa, si la fermentación de 150 g/l de sacarosa se efectúa a la misma agitación, y a 1,3 vvm de velocidad de aireación.

Tabla 1
EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE SACAROSA SOBRE LA PRODUCCION DE ACIDO CITRICO DE ASPERGILLUS NIGER 110

Los cultivos se llevaron a cabo en el fermentador a 1 000 rpm 0,9 vvm de velocidad de aireación, durante 168 horas de cultivo a 28 °C, en los medios resultantes de variar la concentración de sacarosa en el S-17.

<i>Sacarosa</i>	<i>Ácido cítrico</i>	<i>Azúcar residual</i>	<i>Materia seca</i>	<i>Resultado: Ácido cítrico/azúcar utilizado</i>
(g/l)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	%
5	23	18	10	40
100	63	20	12	78
150	68	40	15	61

Lo expuesto anteriormente se debe a que en las condiciones de menor aireación, la fermentación del medio con 150 g/l de sacarosa se interrumpe a las 96 h de cultivo (figura 4a) ante el bajo nivel existente de O.D. en el medio (25% de saturación) (figura 4c) inferior al nivel crítico para la producción de ácido cítrico (Siebert y Schulz, 1979).

Es importante destacar la disminución progresiva del O.D. durante la acidogénesis; únicamente se observa en la fermentación del medio con 150 g/l de sacarosa en las condiciones de menor aireación (figura 4c y 5c) en la que el nivel de O.D. al finalizar la fase de crecimiento es el 38 % de saturación, inferior al nivel existente en la fermentación realizada a mayor aireación (50 % de saturación, figura 5c) y en las de los medios con concentraciones inferiores de azúcar (56 y 61 % de saturación, figura 4c). Las diferencias observadas en el nivel O.D. en las fermentaciones de estos medios (figura 4c), que se realizan a la misma aireación, se atribuyen al aumento del consumo del oxígeno en la fase de crecimiento, al incrementar las concentraciones iniciales de sacarosa y fosfato del medio.

Los resultados descritos precedentemente, indican que la producción de ácido cítrico está influenciada por el nivel de O.D. al finalizar la fase de crecimiento, que depende de las condiciones de aireación y del consumo de oxígeno durante el crecimiento de *Aspergillus niger 110* que, a su vez, está relacionada con las concentraciones iniciales de los nutrientes mencionados.

Nuestra conclusión final es que la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger 110* no es consecuencia de un factor único en una determinada etapa de la fermentación, sino de varios íntimamente relacionados. Preliminarmente, el crecimiento uniforme de biomasa en el medio, preferiblemente en pellets, proporciona las condiciones homogéneas de cultivo imprescindible para la fermentación. El desarrollo del mencionado tipo morfológico está determinado por la densidad de esporas del inóculo, y la velocidad de agitación durante la germinación de las esporas e iniciación de su crecimiento vegetativo (Gómez *et al.*, 1987). Posteriormente, las condiciones de cultivo durante la fase de crecimiento exponencial, nivel de agitación empleado (Gómez *et al.*, 1987) y composición del medio (concentración de sacarosa y proporción sacarosa/fosfato), son decisivas para la fase siguiente, la acidogénica. Por último, la alta concentración de sacarosa y la ausencia de fosfato en el medio, así como niveles de O.D. superiores al 25 % de saturación, son condiciones de cultivo necesarias en la fase acidogénica, para conseguir alta productividad de ácido cítrico.

REFERENCIAS

- BEROVIC, M. y A. CIMERMAN (1982). *Redox potential in submerged citric acid fermentation*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **16**: 185-188.
- BROWNE, C. A. y F. W. ZERBAN (1941). *Physical and Chemical methods of sugar analysis*. pp.846-851, Wiley and Sons, London.
- CHMIEL, A. (1975). *Kinetic studies on citric acid production by Aspergillus niger. II. The two stage process*. Acta microbiológica. Polon. Ser. B. 7 (27), 4: 237-242.
- CLARK, D. S. y C. P. LENTZ (1961). *Submerged citric acid fermentation of sugar beet molasses. effect of pressure and recirculation of oxygen*. Can. J. Microbiol. **7**: 447-453.
- CLARK, D. S.; K. ITO y H. HORITSU (1966). *Effect of manganese and other heavy metals of submerged citric acid fermentation on molasses*. Biotechnol. Bioeng. **8**: 465-471.
- CURRIE, J. N. (1917). *The citric fermentation of Aspergillus niger*. J. Biol. Chem. **32**: 15-37.
- FURUKAWA, T.; T. OGINO y T. MATSUYOSHI (1982). *Fermentative production of citric acid from n-paraffins by Saccharomycopsis lipolytica*. J. Ferment. Technol. **60**, 4: 281.-286.
- GOMEZ, R.; I. SCHNABEL y J. GARRIDO (1985). *Influencia de la composición del medio sobre la producción de ácido cítrico por Aspergillus niger. I. Cultivo superficial*. Bol. Soc. Micol. Castellana **10**: 89-96.
- GOMEZ, R.; I. SCHNABEL y J. GARRIDO (1987). *Pellet growth and citric acid yield of Aspergillus niger* 110. Enzyme and Microbial Technology, en prensa.
- KRISTIANSEN, B. y C. G. SINCLAIR (1978). *Production of citric acid in batch culture*. Biotechnol. Bioeng., **20**: 1711-1722.
- KUBICEK, C. P. y M. ROHR (1977). *Influence of manganese on enzyme synthesis and citric acid accumulation in Aspergillus niger*. European J. Appl. Microbiol. **4**: 167-175.
- KUBICEK, C. P.; O. ZEHENTGRUBER; HOUSAM EL-KALAK y M. ROHR (1980). *Regulation of citric acid production by oxygen: Effect of Dissolved oxygen tension on Adenylate levels and respiration in Aspergillus niger*. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **9**: 101-115.
- LLAGUNO, C. y J. GARRIDO (1960). *Producción de ácido fumárico por fermentación*. Revista de la Ciencia Aplicada **49**: 1-5.
- SANCHEZ-MARROQUIN, A.; R. CARENNO y M. LEDEZMA (1970). *Effect of trace elements on citric acid fermentation by Aspergillus niger*. Appl. Microbiol. **20**, 6: 888-892.
- SCHWEIGER, L. B. (1961). *Production of citric acid by fermentation*. US Patent 2, 970, 084.
- SHU, P. y M. J. JOHNSON (1948). *The interdependence of medium constituents in citric acid production by submerged fermentation*. J. Bact., **56**: 577-581.
- SIEBERT, D. y G. SCGYKZ (1979). "Citric acid production by fermentation." Proceeding of the International Microbiology and Food Industry Congress: *Production of nucleotides, flavouring and other specific elements*. pp. 1-5.
- WOLD, W. S.M. e I. SUZUKI (1976). *The citric acid fermentation by Aspergillus niger: regulation by zinc of growth and acidogenesis*. Can. J. Microbiol., **22**: 1083-1092.