



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**Producción de Acido Cítrico por Metodos  
Microbiológicos en Cultivos Sumergidos Utilizando  
Agitación y Aereación**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO  
BIOLOGO**

P R E S E N T A N

MARIA ELENA AGUILAR GORDILLO

REYNALDO DE JESUS BERMUDEZ  
GORDILLO

1978



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

LAB TESIS 1978  
N.º M. 10  
FECHA \_\_\_\_\_  
PROC. \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



A G R A D E Z C O

A MIS PADRES: QUE CON SU ES  
FUERZO LOGRE UNO DE MIS OB-  
JETIVOS EN LA VIDA.

A MIS MAESTROS: QUE CON SUS  
ENSEÑANZAS Y EXPERIENCIA CON  
TRIBUYERON A MI FORMACION —  
PROFESIONAL.



A MIS HERMANOS:

MARIO ARTURO

MIGUEL ANGEL

GILBERTO AUGUSTO

MA. OFELIA

A MI MADRINA:

DELFINA GORDILLO M.

Y A CECILIA SANCHEZ ROVELO.  
POR SU APOYO Y COMPRENSION  
EN TODO MOMENTO.

I N D I C E

	PAG.
INTRODUCCION Y OBJETIVO.....	3
GENERALIDADES.....	7
EQUIPO, MATERIALES, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO..	37
METODOLOGIA.....	40
RESULTADOS.....	75
DISCUSION DE LOS RESULTADOS.....	86
CONCLUSIONES.....	90
BIBLIOGRAFIA.....	93

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PRODUCCION DE ACIDO CITRICO POR METODOS  
MICROBIOLOGICOS EN CULTIVOS SUMERGIDOS-  
UTILIZANDO AGITACION Y AERACION.

MARIA ELENA AGUILAR GORDILLO

REYNALDO DE JESUS BERMUDEZ GORDILLO .

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO.

1978.

PRESIDENTE \_\_\_\_\_

V O C A L \_\_\_\_\_

Jurado asignado ori  
ninalmente según el  
tema.

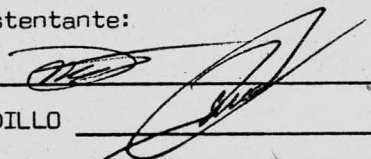
SECRETARIO \_\_\_\_\_

1er.SUPLENTE \_\_\_\_\_

2do.SUPLENTE \_\_\_\_\_

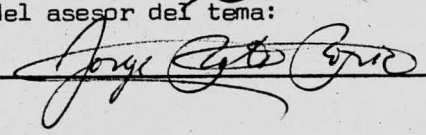
Sitio donde se desarrolló el tema: LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA  
INDUSTRIAL

Nombre completo y firma del sustentante:

MARIA ELENA AGUILAR GORDILLO \_\_\_\_\_ 

REINALDO DE JESUS BERMUDEZ GORDILLO \_\_\_\_\_

Nombre completo y firma del asesor del tema:

Q.P.B. JORGE SOTO SORIA \_\_\_\_\_ 

## CAPITULO I

## INTRODUCCION Y OBJETIVO

## 1.1.- Introducción.

La producción anual de ácido cítrico en el mundo es de aproximadamente 100,000 toneladas la mayor parte de los cuales se produce por fermentación de hongos, mientras que en otros tiempos tenía que extraerse de frutos cítricos con gran costo y una gran limitación del producto.

El ácido cítrico se fabrica por muy pocas industrias y se mantiene en secreto la técnica de su producción por lo que en las patentes o técnicas publicadas en revistas se encuentra una información limitada, por otra parte el ciclo de Krebs del ácido cítrico ha sido objeto de amplia investigación basado principalmente en las cepas seleccionadas de Aspergillus niger, si bien es cierto que se van empleando otras especies se cree que todas las industrias poseen sus propias cepas seleccionadas y quizás mutadas de este microorganismo. Solo en los Estados Unidos la producción es de 50 000 toneladas anuales, más del 60 se destina a bebidas y alimentos, 20 % a productos farmacéuticos y el resto a diversos fines industriales. Así por ejemplo en Estados Unidos se consumen medio millón de kilos para conseguir que el papel de los cigarrillos arda mejor desplazando a los nitratos de Sodio y Potasio. Hasta en 1940 la mayor parte de la producción mundial se obtenía de los cítricos pero en estos últimos años se han puesto a la orden del día los procesos de obtención por fermentación al principio en cultivo superficie y más tar-

de se desarrollaron los sistemas de fermentación con -- cultivos profundos con ayuda de organismos adaptadas pa -- ra producir el ácido en estas condiciones.

Anteriormente en México el ácido o la mayor -- parte de este era producto de importación pero última -- mente se han desarrollado en nuestro país algunas indus -- trias productoras de ácido cítrico; la mayor parte del -- ácido cítrico; que se produce se obtiene por extracción de los subproductos cítricos aunque actualmente existen una o dos plantas que lo están produciendo por el méto -- do fermentativo pero desafortunadamente se desconoce -- la técnica que se usa para su obtención ya que estas -- industrias guardan celosamente estas experiencias, aun -- que tomando en cuenta algunos datos como es la localiza -- ción de la planta y la materia prima que utilizan puede uno suponer que usan un método de fermentación de saca -- rosa. Como ejemplo citaremos una fábrica llamada - - "MEXAMA", esta se localiza en la ciudad de Cuernavaca - Morelos; en esta industria se produce ácido cítrico en -- regular escala entre otros productos y lo obtienen por -- dos métodos; de extracción de cítricos y fermentación, -- esto seguramente para mejorar la calidad del producto - que se obtiene por fermentación haciendo una mezcla. En esta industria no se nos proporcionó ninguna informa -- ción acerca del proceso utilizado ya que para ellos es -- un secreto que no se debe divulgar debido a la competen -- cia. Suponemos que usan estas dos formas de obtención -- ya que en cierto modo podría tener importancia mezclar -- los dos productos ya que estos podría estandarizar los -- costos de producción y a la vez uniformizar la calidad -- del producto, pues el que se obtiene por fermentación - podría presentar algunos problemas en cuanto a pureza - y haciendo la mezcla podría facilitar establecer un gra -- do de pureza.

A pesar de que ya se cuenta con algunas industrias interesadas en la producción del ácido cítrico ya sea por extracción que es de donde se obtiene la mayor parte o por fermentación el consumo de este ácido es mayor que la producción, por lo que hay necesidad de importar a los Estados Unidos por medio de empresas transnacionales distribuidoras, esto se debe a que es un producto de gran uso en la Industria alimenticia, farmacéutica e industria en general.

## 1.2.- Objetivo.

El objetivo de nuestro trabajo es el de tratar de establecer por medio de las técnicas que se han publicado un método de fermentación con cultivos sumergidos y aireación que se adapta a las condiciones de la materia prima (melaza de caña) esto debido a que la melaza contiene además de una gran cantidad de Sacarosa - muchas impurezas, estas se pueden eliminar por algunos métodos de purificación como pueden ser por medio de resinas intercambiadoras de iones o por precipitación - de sales, pero esto implica un incremento considerable en el costo de la producción, por lo tanto tratamos de establecer siguiendo, las técnicas publicadas, una técnica en la cual la melaza se puede usar sin mayores - tratamientos de purificación, esto se puede lograr haciendo una adaptación del organismo, para que este crezca y produzca ácido cítrico en presencia de las impurezas que contengan la melaza. El principal problema de impurezas que se tiene es la presencia del ión Férrico, aunque pueden estar presentes otros iones como Mn, Zn y Cu., que a pesar de ser necesarias a bajos niveles - cuando se encuentran en concentraciones muy altas pueden causar problemas, pero son fáciles de superar ya -

que hay un proceso de adaptación del organismo. Para poder obtener un buen rendimiento en estas condiciones se necesita tener una cepa adaptada a niveles altos de hierro y a la adición controlada de  $Cu^{++}$  ya que el cobre contraresta el efecto del exceso de Fierro.



CAPITULO II

2.1.- GENERALIDADES:

El ácido cítrico (del latín citrus, limón) - es el ácido 2-hidroxi-1,2,3, propanotricarboxílico, - - ácido - hidroxitrícar balílico,  $\text{HOOCCH}_2\text{C}(\text{OH})(\text{COOH})\text{CH}_2\text{COOH}$ , pero molecular 192.12, este ácido tiene dos formas estables: el  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 - \text{H}_2\text{O}$ , del cual el 91.42 % de ácido cítrico y 8.58 % de agua, y el ácido cítrico anhidro que presenta en cristales ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) incoloros, - - translucidos o polvo fino y granular, blanco, inodoro y con un sabor ácido agradable. Un isomero estructural raro es el ácido - hidroxitrícarbalílico, este carece de importancia comercial.

\* El ácido cítrico es el ácido orgánico, más usado en el campo de los productos alimenticios y farmacéuticos, su buen sabor y la facilidad con que es asimilado favorece su utilización como ingrediente ácido para mantener el pH o para obtener un pH conveniente y hacer resaltar el sabor de una gran cantidad de productos en la industria alimentaria y farmacéutica, recientemente se han convertido en una materia prima para usos industriales de carácter general con muchas aplicaciones - y cada vez con mayor frecuencia, se usa en la limpieza - y pulimento de fierro y el acero, como componente en - - ciertas soluciones no ferrosas, para galvanoplastia y - en el tratamiento y acondicionamiento de aguas industriales, el ácido cítrico se usa también para preparar resinas alquídicas, pinturas y lacas y en el estampado de telas, varios compuestos especialmente el citrato de sodio neutro se emplean como plastificantes para materia-

les adhesivos, de revestimiento y en otros plásticos.

El ácido cítrico se aisló por primera vez en 1884 por Scheele en forma cristalina de jugo de limones, el alquimista Vicentius Bellocacensis, hacia el año de 1200 observó que el jugo de limón y el de la lima contenían una sustancia ácida especial y aludió en su Speculum Naturale, el uso del jugo de limón como disolvente ácido, Liebig la reconoció en 1838 como un ácido tribásico, en 1880 fue preparado sintéticamente por Grimoux y Adam partiendo de la glicerina y más tarde de 1893 -- Wenmer indicó que algunos hongos o mohos podían producir ácido cítrico cuando se desarrollaban en soluciones azucaradas.

El ácido se encuentra como constituyente natural de los frutos cítricos como piña, peras, melocotones, higos y otros frutos y tejidos, el ácido cítrico que se obtiene de estos productos se denomina ácido cítrico natural, en relación al que se obtiene por fermentación.

De las frutas cítricas las que son fuente principal de obtención del ácido cítrico natural son los limones, limas y piña, en Italia (principalmente Sicilia), California, Hawai y en las Indias Occidentales, anteriormente en estos países se obtenía el ácido cítrico de los frutos cítricos antes mencionados.

Los hongos que Wehmer (1893) mencionó como productores de ácido cítrico por fermentación fueron: Citromyces pfefferianus y Citromyces glaber, (clasificados por Thom como penicilios) estos producen el ácido a partir de soluciones nutritivas de sacarosa que con-

tienen carbonato de calcio, más tarde Wehmer encontró -- que también se produce ácido cítrico con Penicillius lu  
teum y Mucor piriformis.

En 1917, Currie del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos publicó los resultados de -- una importante investigación sobre la producción de áci -- do cítrico con una variedad de Aspergillus niger, en -- 1934 Doelger y Prescott, corroboraron los resultados -- de Currie, contribuyendo con sus aportaciones al conoci -- miento de esta fermentación.

## 2.2 Propiedades Físicas y Químicas:

El ácido cítrico cristaliza de soluciones --  
acuosas frías en forma de monohidrato, los cristales --  
son incoloros y translucidos, pertenecen al sistema or --  
torombico, su densidad es de 1,542, el monohidrato del  
ácido cítrico es estable en el aire de humedad normal, --  
pero en el aire seco o en vacío con ácido sulfúrico --  
pierde agua, los cristales monohidratos se ablandan a --  
temperatura aproximada de 70 - 75°C con pérdida de agua  
y por último funden completamente entre 135 - 152°C, si  
el calentamiento se hace rápidamente los cristales se --  
funden a 100°C, el ácido cítrico cristaliza de solucio --  
nes acuosas concentradas y calientes, la temperatura --  
media de transición de monohidrato a la forma anhidra --  
es de 36.3 + 0.15 °C, los cristales anhidros son trans --  
lucidos e incoloros la densidad es de 1.665, el ácido --  
cítrico es ópticamente inactivo y no manifiesta peizo --  
electricidad, el ácido cítrico es un ácido orgánico --  
fuerte como lo indica la constante de disociación del pri --  
mer átomo de hidrógeno que es de 8.2 X 10<sup>-4</sup> a 18°C, las

constantes de disociación del segundo y tercer átomo de hidrógeno son de  $1.77 \times 10^{-5}$  y  $3.9 \times 10^{-6}$  respectivamente, el calor de combustión a  $20^{\circ}\text{C}$  es de 471.5 kilocal/mol. para que el acidocitrico monohidratado y 474.5 kilocal/mol. para el ácido cítrico, solo la tensión superficial en contacto con el aire es de 68.51 dinas/cm a  $-30^{\circ}\text{C}$ , el coeficiente de conductividad eléctrica es de  $-8.0 \times 10^{-4}$  a  $25^{\circ}\text{C}$ , el ácido cítrico es bastante soluble en el agua, medianamente soluble en alcohol y poco soluble en éter.

En la Tabla I se dan las densidades de las soluciones acuosas, en la Tabla II se indica el descenso del punto de congelación y la elevación del punto de ebullición de las soluciones acuosas, en la tabla III se indica la solubilidad en agua y en las tablas IV, V y VI las solubilidades en distintos disolventes orgánicos, sulfuro de carbono, tetracloruro de carbono y tolueno.

### 2.3.- Estado Natural:

El ácido cítrico abunda en la naturaleza, se encuentra muy extendido en el reino vegetal y en el reino animal, se encuentra en considerable cantidad en los limones, limas, naranjas y toronjas y por lo general en todos los frutos cítricos, el jugo de limón lo contiene en concentraciones de 6 a 8 %, se encuentra también en los endrinos, los arándanos, las grocellas y la remolacha, junto con el ácido málico se encuentra en los cerezos, frambuezas y fresas, también se encuentra en el tamarindo y en las serbas. El ácido cítrico y el tartárico se encuentran como ácido libre o como sal, en las-

semillas y los jugos de gran variedad de flores y plantas.

El ácido cítrico es un componente del vino, (se encuentra en porciones de 0.4 g/l); de la leche (en porción a 1 a 4 g/l), en los productos lácteos y los tejidos y los líquidos animales. El ion citrato existe normalmente en la sangre, en la orina y probablemente sintetizado y oxidado en procesos metabólicos normales del organismo animal. El suero de la sangre contiene aproximadamente 25 mg/l y diariamente se excretan en la orina de los seres humanos aproximadamente 0.5 g/l.

#### Métodos de Fabricación.

El ácido cítrico se puede obtener mediante fermentación de soluciones azucaradas por hongos u obtención directa por extracción del jugo de frutas cítricas (limones, limas, naranjas, etc.) y también por extracción del jugo de los residuos de paja en las fábricas de conservas, siendo estas las tres formas importantes para la obtención del ácido cítrico, la recuperación es esencialmente idéntica en los tres procedimientos.

#### 2.4 Producción Microbiológica.

El descubrimiento de Wehmer condujo a extensos estudios de los factores que influyen en la producción del ácido cítrico por métodos microbiológicos, así como el estudio de las diversas cepas de hongos o mohos capaces de producirlo y en el conocimiento del mecanismo por el cual se forma una sustancia de cadena ramificada partiendo de compuestos azucarados de tipo lineal, el hongo que inicialmente uso Wehmer fue un hongo parecido al *Penicillium* que se le llamó *Citromyces*.

TABLA I. Densidades de soluciones acuosas de ácido cítrico a 15° C.

Acido cítrico monohidratado, % en peso	$D_{15}^{15}$	Gramos/Litro de solución	Libras/galón U. S. de solución	Acido cítrico monohidratado, % en peso	$D_{15}^{15}$	Gramos/litro de solución	Libras/galón U.S. de solución
6	1.02227	61.36	0.5121	40	1.1709	468.4	3.909
10	1.0392	103.9	0.8673	46	1.1998	551.9	4.606
16	1.0632	170.0	1.420	50	1.2204	610.2	5.092
20	1.0805	216.1	1.803	56	1.2514	700.8	5.848
26	1.1060	287.6	2.400	60	1.2738	764.3	6.378
30	1.1244	337.3	2.815	66	1.3071	862.7	7.199

TABLA II. Descenso del punto de congelación y elevación del punto de ebullición de soluciones acuosas de ácido cítrico.

Concentración, moles/100 g. de agua	Descenso del punto de congelación, °C.	Elevación del punto de ebullición, °C.	Concentración moles/1000 g de agua	Descenso del punto de congelación, °C.	Elevación del punto de ebullición, °C.
0.01	0.023	—	2.00	1.00	1.214
0.05	0.042	—	5.00	—	3.512
0.10	0.203	—	10.00	—	8.39
0.50	0.965	0.284	20.00	—	16.6
1.00	1.94	0.577			

TABLA III. Solubilidad del ácido cítrico en agua

Temperatura, °C.	Acido cítrico, % en peso	Fase sólida	Temperatura °C.	Acido cítrico, % en peso	Fase sólida
10	54.0	$C_6H_8O_7$	60	73.5	$C_6H_8O_7$
20	59.2	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	70	76.2	$C_6H_8O_7$
30	64.3	$C_6H_8O_7 \cdot 2H_2O$	80	78.8	$C_6H_8O_7$
36.6°	67.3	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O - C_6H_8O_7$	90	81.4	$C_6H_8O_7$
40	68.6	$C_6H_8O_7$	100	84.0	$C_6H_8O_7$
50	70.9	$C_6H_8O_7$			

13  
 TABLA IV. Solubilidad del ácido cítrico hidratado y anhidro en algunos disolventes orgánicos a 25°C.

Disolvente	$d_{25}$ de la sol. saturada	Solubilidad, gramos/100-gramos sol-saturada	Disolvente	$D_{25}$ de la sol. saturada	Solubilidad gramos/100 gramos sol. saturada.
Monohidrato			Anhidro		
Acetato de amilo	0.8917	5.980	Cloroformo	1.4850	0.007
alcohol amílico	0.8774	15.430			
Acetato de etilo	0.9175	5.276	Acetato de amilo	0.8861	4.22
Eter.	0.7228	2.714	Eter abs.	0.7160	1.05

TABLA VI. Distribución del ácido cítrico entre agua y éter a 15° C. y 25.5 C.

Moles /litro a 15°C			Moles /litro a 25.5°C.		
En agua	En éter	Coefficiente en reparto	En agua	En éter	Coefficiente de reparto.
0.902	0.0077	177	0.9175	0.0063	114
0.460	0.0036	128	0.487	0.0031	155
0.220	0.0017	129	0.241	0.00155	155
0.297	0.0023	129	0.315	0.0020	158

TABLA V. Solubilidad del ácido cítrico hidratado y anhidro en soluciones acuosas de alcohol etílico a 25°C.

Monohidrato			Anhidro		
Alcohol etílico, % de peso	$d_{25}$ de la sol. saturada.	Solubilidad gramos /100 gramos sol. saturada.	Alcohol etílico % en peso	$d_{25}$ de la sol saturada	Solubilidad gramos/100 gramos sol. saturada.
20	1.286	66.0	20	1.297	62.3
40	1.257	64.3	40	1.246	59.0
50	1.237	63.3	60	1.190	54.8
60	1.216	62.0	80	1.120	48.5
80	1.163	58.1	100	1.010	38.3
100	1.068	49.8			

Se han efectuado muchos estudios sobre otros organismos que son capaces de producir el ácido cítrico a partir de soluciones azucaradas, pero la mayor parte de los estudios se han efectuado con cepas de *Aspergillus niger*; de acuerdo a los resultados de estos estudios se ha demostrado que puede producirse el ácido cítrico por medio de hongos partiendo de compuestos con 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, y 8- átomos de carbono, además se ha acumulado una gran cantidad de datos cualitativos, sin embargo a pesar de todos los trabajos y del intenso estudio del problema por numerosos investigadores se desconoce aún el mecanismo de las reacciones que intervienen en la conversión de los azúcares en ácido cítrico por el método de fermentación y ninguna teoría de las formuladas hasta ahora explica satisfactoriamente todos los hechos observados.

X [A nivel industrial, la producción de ácido cítrico por fermentación se considera como un gran progreso en el campo de la microbiología industrial.] En 1922 en Italia se obtuvo la mayor producción mundial de citrato de calcio empleado para la producción de ácido cítrico, la mayor parte se exportó a E.E.U.U., Inglaterra, Francia, sin embargo desde 1927 es muy poco el citrato de calcio cítrico que se importa en los Estados Unidos. Esto se debe a varios factores, a la producción del ácido por fermentación por hongos, el aumento de limoneros en el país a la importancia del zumo de limón concentrado y a los grandes impuestos que causa la importación.

En 1917 Currie del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos publicó los resultados de una importante investigación sobre la producción de ácido -



oítrico por fermentación mediante una variedad de Aspergillus niger; Doelger y Prescott, 1934 corroboraron — los resultados de Currier contribuyendo con sus aportaciones al conocimiento de esta fermentación.

Después de las investigaciones históricas de Wehmer se ha demostrado que existen gran número de organismos capaces de producir ácido cítrico, algunos dan pequeños rendimientos y otros producen sustancias indeseables, otros a causa de sus características inestables de cultivo resultan no satisfactorios en la escala comercial, de esto se deduce la importancia de hacer una selección de organismos.

De acuerdo a los estudios realizados por varios investigadores se han empleado con buenos resultados: Aspergillus niger, A. Clavatus, Penecillum luteum, P. citrium, Paecilomyces divaricatum, Mucor piriformis, Ustilina bulgaris y otras especies de Mucor sin embargo solo las razas de Aspergillus niger tienen importancia en la escala industrial.

Según Currie, Doelger y Prescott, además del carbono, hidrogeno y oxigeno suministrado por los hidratos de carbono son necesarios también el medio de fermentación nitrogeno, potasio, fósforo, azufre y magnesio. Doelger y Prescott en 1934 observaron que la concentración de las sales depende las variedades de Aspergillus niger empleado en la fermentación, también encontraron que cantidades mayores de 2.50 g de nitrato de amonio 1.50 g de fosfato de potasio y 0.30 g de sulfato de magnesio, aumentan la formación de ácido oxálico, y disminuyen el rendimiento de ácido cítrico, esto se —

debe a que durante la fermentación se obtiene una mezcla de estos ácidos, y dependiendo de estos factores, puede obtenerse en mayor proporción el ácido cítrico o el oxálico. El nitrato de amonio en concentración de 2.50 g por litro provoca la formación de una capa gruesa de micelio en la superficie del líquido, el sulfato de magnesio en cantidades superiores a .030 g/lit, favorece la esporulación, en general se obtiene mayor rendimiento cuando las capas de hongos finos y la esporulación muy ligera, estos resultados se obtienen con una cantidad mínima de sales inorgánicas, la restricción en el abastecimiento de nitrógeno tiende a aumentar la producción de ácido cítrico.

Se ha supuesto que con el uso de otros elementos pueden aumentarse los rendimientos de ácido cítrico aunque generalmente es suficiente el empleo de los ya mencionados, sin embargo algunos investigadores afirman que el hierro y el zinc aceleran la formación de ácido cítrico, otros opinan que estimulan el crecimiento del micelio sin aumentar los rendimientos y hay otros autores que han demostrado que las sales de zinc tienen un efecto inhibitorio sobre la producción de ácido cítrico. Indudablemente la raza de hongo empleada tiene una gran influencia sobre el elemento requerido y son muchos los autores que lo han demostrado, Osnizha ya empleando una raza de Aspergillus niger obtuvo un marcado aumento en la producción del ácido cítrico a partir de sacarosa mediante la adición de un 0.03% de nitrato de magnesio, pero al emplear otra raza distinta la adición ocasionó una pequeña disminución en el rendimiento.

Perlam, Dorrel y Johnson en 1946 estudiaron los efectos de la adición de iones metálicos a medios purificados de ácido cítrico por el método de cultivo superficial, empleado cinco razas de Aspergillus niger y llegaron a la conclusión sobre la base de múltiples experiencias, de que la concentración óptima de cada ión metálico para estimular la producción del ácido, -- varia según la raza de A. niger usada, además de in- cluir iones de aluminio, cromo, hierro y magnesio que son los únicos que estimula la producción de ácido por A.niger, mientras que iones como los del molibdeno, co bre, zinc y calcio inhiben la producción del ácido, por lo tanto la presencia o ausencia de indicios mínimos de ciertos elementos en el medio, puede tener un marcado efecto sobre el resultado obtenido.

→ Otro de los factores que influyen notablemente durante la fermentación y sobre los resultados obtenidos es el pH. El mantenimiento de un pH favorable es muy importante para el éxito de la fermentación, se ha demostrado que regulando el pH y las sales inorgánicas se puede variar considerablemente la proporción el ácido cítrico y oxálico, obtenido en realidad cuando se emplean las condiciones más favorables para la producción de ácido cítrico se suprime casi por completo la formación de ácido oxálico, así el empleo de un pH bajo favorece la producción de ácido cítrico suprimiendo la formación del oxálico, reduce al mínimo el peligro de contaminación y facilita la esterilización; mediante esto se han llevado a cabo con éxito fermentaciones de la boratario sin recurrir a la esterilización térmica del medio cuando el pH inicial es bajo (2.2 ó menos) en general los hongos que mejor producen ácido cítrico toleran también mejor los valores de pH bajos. Currier em-

HCl

18

pleó ácido clorhídrico para ajustar el pH de 3.4 a 3.5, Doelger y Prescott recomiendan también el empleo de este ácido porque se halló que el cloro tenía un valor de finido como constituyente del medio, según estos autores el intervalo más satisfactorio del pH se encuentra entre 1.60 a 2.20.

Desde el punto de vista de la producción de ácido cítrico se descubrió que los ácidos sulfúrico, nítrico y acético eran inferiores al ácido clorhídrico - y también se descubrió que una pequeña cantidad de ácido fórmico suficiente para bajar el pH a 3.0 impide la germinación de las esporas.

↳ Cuando se trata de una fermentación superficial los factores que influyen notablemente son el área superficial y el volumen. En la fermentación cítrica la conversión de azúcares es efectuada por las enzimas intracelulares y por tanto tiene lugar dentro de las células vivas, que constituyen el micelio. El azúcar pasa al interior de la célula por ósmosis y por lo consiguiente tanto este proceso de difusión como el enzimático son los que determinan la duración del período de fermentación, de acuerdo con esto en un recipiente profundo y de gran capacidad la formación del ácido cítrico será relativamente lenta porque de la capa de hongos superficial será pequeña en comparación con el volumen en cambio cuando se usan bandejas o recipientes de poco fondo se consigue una gran superficie de contacto y como consecuencia tendremos una gran superficie de micelio y la conversión de azúcar en ácido cítrico se efectuará con gran rapidéz.

De acuerdo a lo anterior cuando se emplea este método de fermentación, habrá que emplear una rela

ción área de superficie -volumen numéricamente más alta que corresponde a una mayor conversión y un menor tiempo de fermentación junto con una mínima cantidad de sustrato no transformado.

➤ En este tipo de fermentación la aplicación de aire en grandes cantidades tiene un efecto perjudicial sobre el rendimiento de ácido, según Porges, Doelger y Prescott, sin embargo, el paso de pequeñas cantidades de aire sobre la capa de mohos no es perjudicial, esto según Wells y colaborándose de acuerdo a la siguiente experiencia pasaron una corriente de aire estéril húmedo y sin dióxido de carbono sobre la capa de hongos existentes en matraces erlenmeyer de 2 litros con velocidad de 15 ml/seg. obteniendo los mismos resultados que sin el paso de aire.

Son muchos los factores que hay que tomar en consideración cuando se está efectuando este tipo de fermentación como consecuencia lógica a algunos se le debe dar mayor énfasis pero en general todos son de gran importancia en relación a los riesgos y consecuencias que se exponen cuando cualquiera de estos no es manejado hábilmente y de acuerdo a las necesidades del microorganismo. ➤ Uno de los factores más importantes es la temperatura ya que si durante la fermentación no se usa la adecuada, influirá directamente en el desarrollo del hongo y si no hay buen desarrollo se verán afectados el tiempo de fermentación y la conversión de azúcar en ácido cítrico.

➤ La temperatura empleada dependerá en parte de organismo y de las condiciones de fermentación, generalmente para este tiempo de fermentación con A. niger-

se usan temperaturas entre 25 a 25°C, según Doeler y Prescott el intervalo óptimo de temperatura es entre 26 a 28°C, a 30°C mayor temperatura disminuye la producción de ácido cítrico, aunque aumenta la acidez total por la formación de ácido oxálico.

## 2.5.- Métodos de Cultivo.

El paso sucesivo de esporas de un medio a otro de la misma composición uniforme puede estimular en el hongo la producción de ácido cítrico en grandes cantidades. Doelger y Prescott han demostrado esto mediante 18 pases sucesivos logrando con esto el aumento de la acidez total, esto se llevó a cabo mediante la inoculación de 12 matraces de 250 ml. conteniendo cada uno 75 ml, de medio conteniendo este 14 % de glucosa y un pH de 2, con las esporas de un sólo cultivo de una variedad de Aspergillus niger, se incubó a temperatura de 26°C durante 10 días, con las esporas de los velos de los hongos de esta primera serie de matraces se inoculan otros 12 y así sucesivamente, esta operación se efectuó durante 8 meses a intervalos de 10 días.

Los resultados que obtuvieron estos investigadores fueron positivos ya que lograron aumentar la acidez total en el medio hasta un 50 % con relación al valor inicial.

En general los métodos de cultivo que se han utilizado para la producción de ácido cítrico tiene como base fundamental proporcionar una fuente de carbono-sintética para facilitar la conversión, pero el objetivo de estos estudios es observar el comportamiento del

Microorganismos  
micro orgánico con un medio sintético para luego adap-  
tarlo a un medio simplificado como vienen siendo el - -  
azúcar en forma de melaza pero además se han hecho estu-  
dios sobre otros como el que proporciona la melaza de -  
remolacha o con otras fuentes de carbono como la pata--  
ta, la harina de trigo, el agar, la malta de cebada, la  
xilosa (azúcar de madera), las gransas de maíz, la casta-  
ña de indias.

Otros factores importantes para la conver- -  
 sión de soluciones azucaradas en ácido cítrico por los-  
hongos son las concentraciones estas de solución, en --  
las técnicas de cultivo e inoculación, la temperatura -  
el pH y la aireación, todos estos factores se han in-  
 vestigado y los datos obtenidos no son concordantes, en  
 gran parte la influencia de cada factor está determina-  
 da por la cepa de hongo empleada y además sustancias ex-  
 trañas en el medio de cultivo, que no han sido determi-  
 nadas por encontrarse en pequeñas cantidades o por ser  
 insospechable la presencia de estos materiales, que en-  
 los resultados pueden tener gran repercusión ya sea en-  
 forma favorable o desfavorable. /

Algunos de los medios de cultivo que han em-  
 pleado algunos investigadores son los siguientes.

✓ Según Currie en 1917 encontró que el medio -  
más favorable para la obtención de ácido cítrico tenía-  
la siguiente composición.

	g/litro
Sacarosa.....	125 - 150
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	2 - 2.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.75 - 1
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O.....	0.20 - 0.25
HCl hasta un pH de	<u>3.4 - 3.5</u>

Doelger y Prescott en 1934 encontraron - - - que el siguiente medio era el más adecuado, ya que la variedad de *Aspergillus niger* que utilizaron produjo grandes rendimientos de ácido cítrico con menos del 2 % de ácido oxálico.

Sacarosa.....	140.00
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	2.23
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1.00
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	0.23

Según estos autores se disuelven las sales y los azúcares con agua destilada hasta un litro, se ajusta el pH de 2.20 a 1.60 con ácido clorhídrico normal y se esteriliza durante 30 minutos a 1/2 - 2/3 atm.

Estos medios y métodos se han empleado en la producción del ácido cítrico por medio de un cultivo su



perforación de hongos en el cual al final de la fermentación se saca la solución del fermentador y posteriormente se prensa la capa de hongos para separar el ácido que se encuentra en esta masa, la solución ácida que se obtiene del prensado se trata con una sal de calcio en caliente para precipitar el ácido cítrico como citrato de calcio, luego tratando el precipitado con una cantidad equivalente de ácido sulfúrico se libera el ácido cítrico que se recupera por separación del sulfato de calcio, en otro método el azúcar no convertido, después de la fermentación a alcohol por una levadura, lo que hace que cristalice directamente el ácido cítrico.

→ Producción de ácido cítrico por métodos de → cultivos sumergidos.

Los primeros estudios para producir ácido cítrico por métodos de cultivo sumergidos fracasaron, debido a que los rendimientos obtenidos por este método fueron bajos y en ocasiones se produjo ácido glucónico a espesas de ácido cítrico, Wehmer en 1912 intentó producir ácido cítrico a partir de una solución nutritiva de sacarosa con cal y con paso de aire esteril, el ácido cítrico lo obtenía como citrato de calcio, pero la conversión era baja, resultados similares obtuvo Elving en 1918-1919, en 1926 Bleyer dió a conocer un proceso en el cual se producía ácido cítrico en tanques abastecidos de aire con agitación mecánica ocasional pero -- Schereyer en 1928 descubrió que la agitación mecánica -- continua y la aireación aumentaban considerablemente la acidez total pero el ácido que se producía en mayor cantidad era el glucónico y el cítrico se obtenía en cantidades similares a los resultados anteriores, es decir --

un rendimiento bajo en relación al que se obtenía en cultivos superficiales.

A raíz de los primeros estudios que se hicieron sobre la producción del ácido por el método de cultivos sumergidos varios investigadores empezaron a trabajar por separado para que luego de los trabajos publicados se hiciera un estudio de los diferentes métodos que se presentaron y de este modo se ha llegado a la conclusión de que existen algunos factores que afectan a la producción del ácido cítrico por el método de cultivos sumergidos.

→ Uno de los factores que afecta indudablemente son las razas de los hongos esto se confirma gracias a los estudios que realizó Perlman con 70 razas de *Aspergillus niger*, este estudio lo enfocó en relación con la capacidad para producir el ácido.

*conclusiones*

→ Este investigador encontró que las esporas jóvenes son mejores que las viejas para producir ácido cítrico y que la temperatura de almacenamiento de las esporas tiene gran afectos obre su capacidad para la producción del ácido. De las temperaturas ensayadas encontró que el intervalo más adecuado es de 0 a 5°C otro de los factores a que se refiere este autor es la variación de la concentración como el nitrógeno, potasio, fósforo, magnesio y azufre, para definir la concentración en que deben estar presentes estos elementos en el medio de cultivo es necesario hacer un estudio a diferentes concentraciones y según el comportamiento del microorganismo a las diferentes concentraciones, se ha

rá la elección de la cantidad que debe estar presente en el medio, para esto no existe una concentración estándar ya que como se dijo anteriormente dependerá directamente de la raza de Aspergillus niger que se esté empleando para la producción del ácido cítrico, claro que para esta elección de concentraciones se hará un pequeño ajuste, pues se puede considerar que se deben tomar como base las concentraciones indicadas en los medios propuestos con anterioridad.

Perlman indica también que la temperatura desempeña un papel muy importante en la producción de ácido cítrico y como regla general la mayor de las razas producen una mayor cantidad a una temperatura de 26 a 30°C, por lo tanto y de acuerdo a los resultados obtenidos por otros investigadores el usar una temperatura que este comprendida entre este rango favorecerá la obtención del ácido en mayor cantidad.

✦ En general según Karow y Waksman la fermentación cítrica es muy particular en ciertos aspectos, como son: La raza del hongo empleado, el uso de un medio especial para el desarrollo y acondicionamiento del hongo, la aireación del medio con oxígeno o aire a presión junto con la agitación mecánica así como el uso de un medio adecuado para incrementar la producción del ácido cítrico, según autores la fermentación se puede dividir en dos etapas, una de crecimiento y otra de fermentación que viene siendo la más importante y a la vez la más delicada pues una pequeña variación en las condiciones establecidas puede causar serios problemas en el rendimieto del ácido cítrico.

El ácido cítrico además de obtenerlo por fermentación se obtiene por extracción del jugo de algunos frutos cítricos como el limón que contiene entre un 5 % a 8 % de ácido cítrico o una variedad que se cultiva -- en la India denominada Citricus limonia, además, se puede obtener de la piña.

Antes de que se desarrollará la producción -- de ácido por el método de fermentación, la industria de extracción más importante se encontraba en Italia, también se producía en gran cantidad en California y en las Antillas. En la época de producción máxima de ácido cítrico en Italia en el año de 1927 no sólo se empleaban los frutos de desecho sino también frutos maduros de buena calidad, en California se empleaban los limones mal conformado, con cicatrices, de pequeño tamaño o que por alguno otro motivo no tuvieran buen aspecto -- ni fueran de buena calidad.

En las fábricas en que la obtención de ácido cítrico es por extracción de cítricos, llegan estos en camiones o en vagones de ferrocarril cubiertos y son trasladados a silos de almacenamiento, desde los silos pasan a tanques lavadores para limpiarlos de suciedad -- y de materias extrañas que tengan en su superficie, después se clasifican sobre bandas de inspección para separar los frutos inservibles y pasan luego a la máquina -- mondadora. La corteza se usa para obtener el aceite -- esencial de limón. La porción interior blanca de la -- corteza se aprovecha para la obtención de pectina, que es un subproducto valioso, luego la pulpa se corta se -- desmenuza y se aplasta en grandes rodillos, en los cuales es parcialmente extraído el jugo y trasladado a unos

tanques medidores, la pulpa se somete por lo general -- a dos lixiviaciones con el líquido diluido procedente -- de una extracción anterior, los jugos reunidos que son muy viscosos por que contienen aproximadamente 0.5 % de pectina se recogen en grandes tanques de madera o ace-ro, inoxidable en estos tanques se deja el jugo durante 4 a 10 días para que sufra una fermentación espontánea-- esta es necesaria para poder filtrar el jugo, porque hidrolyza los azúcares, la pectina y las proteínas que -- son sustancias que impiden la filtración y que obstruirían rápidamente el filtro, aunque se empleara una ayuda filtrante.

La fermentación espontánea no se debe permitir que vaya más allá del punto en el cual los azúcares han fermentado completamente porque entonces los fermentos atacarían el ácido cítrico; en condiciones normales esta fermentación no implica ninguna pérdida apreciable de ácido cítrico, para la fermentación no hay necesi-dad de inocular el jugo con un organismo especial, pues basta conservar en el tanque una pequeña cantidad del -- líquido procedente de la fermentación anterior.

Cuando la fermentación espontánea ha alcanzado un punto que permite la filtración, se añade una -- ayuda filtrante por lo general tierra de diatomeas, la filtración se hace en caliente y mientras se calienta -- y se empieza a filtrar el líquido se agita mecánicamente para que las porciones que se estén filtrando sean-- homogéneas, los filtros, que se usan para este propósito son filtros prensa.

El jugo de limón filtrado es completamente -- claro y tiene un color ámbar o de paja, sin diluirlo --

tiene 5-6 % de ácido cítrico, la segunda o tercera extracción que es el jugo diluido contiene un 3 - 4 % de ácido cítrico.

En la industria Italiana se acostumbra concentrar el jugo hasta una densidad de 1.24 y se exportaba como jugo de limón hervido (agro cotto) para evitar los aranceles impuestos por muchos países al ácido cítrico o la sal de calcio.

Una segunda fuente natural de ácido se encuentra en los residuos y los desperdicios de la industria empacadora de piña, la piña contiene 0.39 - 1.10 % de ácido cítrico con un promedio aproximado de 0.72 % - en estas industrias de conservas se manejan anualmente grandes cantidades de piña, como estas tienen que ser cortadas ajustándose para que entren en los botes, se obtiene una gran cantidad de materiales de desperdicio que junto con el fruto que no puede utilizarse para el enlatado por su tamaño, su calidad defectuosa o aspecto, se emplean para la producción de ácido cítrico, los residuos y el material que no pasa por el estricto control de calidad se recogen, se cortan y se transforman en pulpa con maquinaria adecuada y después se prensa, la pulpa se somete a una lixiviación con agua, o con el líquido diluido procedente de una extracción anterior y luego se concentra y el ácido cítrico se obtiene como sal de calcio.

## 2.6.- Aspectos Económicos.

La industria del ácido cítrico se inició - - en Inglaterra antes de 1860 y en 1880 se extendió a los Estados Unidos, Francia y Alemania, hasta 1913, cuando-

Italia empezó a fabricar ácido cítrico, los Estados -- Unidos, Inglaterra, Francia, Alemania producían casi -- todo el consumo mundial de ácido cítrico y partían del -- citrato de calcio italiano, en 1922 producía el 90 % -- del citrato de calcio mundial, la mayor parte era trans -- formado en ácido cítrico, el mayor importador de citra -- to de calcio y ácido cítrico eran los Estados Unidos.

Los esfuerzos de otros países por independi -- zarse del monopolio Italiano intensificando el cultivo -- del limonero tuvieron éxito primero en los Estados Uni -- dos al extenderse la industria de los subproductos cí -- tricos en California, también Inglaterra fue uno de los -- países que disminuyó su importación de citrato de cal -- cio pues empezaron a obtenerlo en forma natural de los -- frutos cítricos.

En los Estados Unidos empezó a disminuir en -- grandes cantidades la importación del ácido cítrico -- o el citrato de calcio después de 1922, esto se ocasio -- nó gracias a la producción del ácido por el método de -- fermentación, en 1929 la cantidad producida por este mé -- todo ascendía ya a 3,500 toneladas, en el mismo año se -- inauguró una fábrica similar en Inglaterra y en el año -- siguiente se empezó a producir por este mismo método -- en Bélgica y Checoslovaquia, gracias al éxito en la fa -- bricación de ácido cítrico por fermentación y al aumen -- to de la producción de ácido natural en California, los -- Estados Unidos pudieron satisfacer todas sus necesida -- des y aún tener sobrantes para la exportación y de esta -- manera el mercado norteamericano no independizó de Ita -- lia y además para este año (1929) Estados Unidos se ha -- bía convertido en el país productor de ácido cítrico --

más importante del mundo con una producción anual de 4,500 toneladas sobrepasando a Italia que antes solo exportaba el jugo concentrado o la sal de calcio.

La producción del ácido en los Estados Unidos ha aumentado considerablemente durante los últimos años a pesar de eso la producción total es insuficiente para satisfacer la demanda interior así como las exportaciones, por lo que constantemente se hacen nuevos estudios o desarrollan nuevas técnicas para la fabricación del ácido por los métodos de fermentación así como para la obtención por extracción de los residuos de los frutos cítricos de las industrias empacadoras de conservas.

En México a pesar de ser una materia prima de gran importancia en la industria farmacéutica y alimentaria no se cuenta con la producción y técnicas suficientes a pesar de tener los recursos naturales suficientes, la mayor parte del ácido cítrico que se fabrica se obtiene de los subproductos de las industrias conserveras y del jugo de los frutos cítricos que abundan en los campos mexicanos, a pesar de que se conoce el método de fermentación es mínima la cantidad que se produce por este método.

## 2.7.- Aplicaciones:

En la Industria Alimentaria.

Bebidas y Jarabes.- El ácido cítrico es acidulante preferido para bebidas tanto carbonatadas como de otro tipo, ya que es el ácido que se encuentra en la-



forma natural en las frutas, ya que por sus características:

1.- Imparte propiedades refrescantes y de acidez a las bebidas duplicando a menudo las de los productos naturales.

2.- Actúa como preservativo en los jarabes y en los refrescos ya envasados.

3.- Actúa como secuestrante de metales que ocasionan turbidez y que aceleran el deterioro del color y sabor.

4.- Ayuda a obtener el bouquet deseado al modificar los sabores demasiado dulces.

Fabricación de dulces.- En la manufactura de dulces se ha generalizado el uso del ácido cítrico para intensificar el sabor de frutas y de otros ingredientes comunmente usados en esta industria, además el ácido cítrico en cantidades adecuadas comunica el sabor agridulce necesario en los caramelos.

Fabricación de postres.- En la manufactura de gelatinas de sabor, el control cuidadoso de pH es muy importante para obtener el endurecimiento adecuado de la gelatina y que debe ser entre 3.0 y 3.5, el ácido cítrico además de mantenerlo comunica el sabor agridulce, incrementa el sabor y las propiedades refrescantes tan notorias en este tipo de postres.

Jaleas y conservas.- Existen productos que -

en su forma natural no tienen cantidades suficientes de ácido cítrico, para el pH apropiado y dar el sabor y gusto deseado en la manufactura de jaleas y conservas, por lo que es necesario agregar cantidades adecuadas de ácido hasta lograr el pH adecuado requerido por la pectina, esto dará como resultado jaleas y conservas de alta calidad.

Empacadora de Pescados y Mariscos.- De todos nosotros es bien sabido que los pescados y mariscos desarrollan frecuentemente olores desagradables así como - - ciertas coloraciones rojas, cafés, negras y azúles producto de una incipiente oxidación, los tintes anteriores son resultado de una combinación de sales de fierro o de cobre con las <sup>M.A.</sup>ánimas de los crustáceos o bien con los compuestos de azufre que se desprenden, produciendo una gama de olores diversos que frecuentemente vemos en los mariscos, cuando los pescados y mariscos frescos se sumergen en soluciones de 0,25 al 1 % de ácido cítrico mezclados con otro tipo de antioxidantes como el ácido eritroascórbico, las propiedades secuestrantes del cítrico y las de los antioxidantes de los otros compuestos actúan automáticamente para proteger y retardar la formación de olores y colores desagradables en estos alimentos.

Preparación de jugos de frutas y de vegetales.- En general podemos decir que a pH bajos por el uso de ácido cítrico se ejercen efectos proteccionistas en los pigmentos de los jugos de frutas, como ejemplo podemos indicar que el color de las mieles concentradas de fresas para fuentes de sodas se esterilizan mediante el uso de ácido cítrico, igualmente sucede con sabores natu

rales de uvas y otros tipos de jugos de frutas en los —  
cuales es necesario aumentar sus sabores y el gusto agri—  
dulce que deben tener, aumentando su resistencia al dete—  
rioro.

Ahora bien en la fabricación de vinos y si—  
dras, frecuentemente el producto envasado presenta cier—  
ta turbidez originado por una diversidad de causas, sin—  
embargo, el problema más comun se presenta por la exis—  
tencia de iones férricos en solución que se combinan con  
taninos o fosfatos que se encuentran en el seno del li—  
quido, formando complejos insolubles que provocan la tur—  
bidez, las sales complejas antes señaladas se pueden —  
eliminar si se tiene la precaución de agregar ácido cí—  
trico en pequeñas cantidades.

Frutas congeladas.— Uno de los principales -  
problemas a resolver, cuando se congelan frutas, consis—  
ten en evitar que éstas se manchen como sucede con fre—  
cuencia debido a la oxidación provocada por enzimas pre—  
sentes de la misma fruta, a pesar de la existencia de —  
ácido ascórbico que casi siempre se encuentra presente -  
en las frutas, el ácido ascórbico es un agente antioxi—  
dante sin embargo, su acción de protección es relativa—  
mente corta por las destrucciones del mismo por la ac—  
ción de las enzimas de la fruta, o bien por la acción --  
catalizadora de iones de cobre o de hierro que lo destruy—  
en fácilmente, el ácido cítrico se utiliza durante el -  
proceso de empaclado de frutas congeladas por dos circuns—  
tancias.

1.— Generalmente se efectua una operación —  
de mondaje de la fruta usando soluciones caústicas para—  
facilitar esta operación procediendo de inmediato a la—

lavarla perfectamente con agua y después sumergiéndola-- en una solución de 1 a 2 % de ácido cítrico para llevar a cabo la neutralización de los residuos alcalinos, porque si esta última operación no se lleva a cabo, las trazas de solución alcalina destruyen al ácido ascórbico; - mediante la acción de pH bajo, que también detiene la -- acción oxidante de enzimas presentes.

2.- El ácido cítrico también elimina la acción de ciertos metales pesados que pueden activar una oxidación, protegiendo la destrucción de las vitaminas de la fruta, frecuentemente encontramos al ácido cítrico en la conservación de diversas frutas como duraznos, ciruelas, peras, cerezas, manzanas, plátanos, etc.

Grasas y aceites.- El oxígeno atmosférico en presencia de humedad, luz y calor, oxida fácilmente a los aceites y a las grasas conociéndose este fenómeno como rancidez, la rapidez de oxidación de una grasa se encuentra influenciada grandemente por la presencia en el seno de catalizadores metálicos en forma de sales o jabones, la acción catalizadora de estos compuestos oxida y deteriora a los aceites y las grasas con mucha facilidad en tal forma, que en concentraciones extremadamente bajas de agentes catalíticos de hierro, cobre, níquel, manganeso, cobalto, cromo y estaño, etc., reducen considerablemente la vida de los aceites y de las grasas, por lo que resulta prácticamente imposible durante el proceso de extracción y de elaboración de aceites y grasas, que estas dejen de contaminarse con residuos de los metales antes mencionados.

*Conservación aceites*

El ácido cítrico actúa como secuestrante de los iones metálicos y retarda a los aceites y las grasas,

el efecto de la rancidez evitando así malos olores característicos de esta.

Usos Farmacéuticos.- Preparación de efervescentes.- El ácido cítrico en combinación con bicarbonato de sodio y otras sales, cuando se agregan en el agua producen una bebida refrescante salina y carbonatada, esta combinación es particularmente efectiva en aquellos productos en donde se requiere un corto tiempo de disolución y un sabor característico además de ser agradable a la vista.

Sales de ácido cítrico.- El citrato de sodio y el cítrico de potasio se preparan mediante la acción de ácido cítrico sobre los carbonatos o bicarbonatos de los metales alcalinos correspondientes, las sales antes indicadas se utilizan frecuentemente, como diuréticos y expectorantes. El ácido cítrico se utiliza también para la preparación de citrato de cúprico con características astringentes y antisépticas, así como elixir antianémico y por último soluciones de citrato de magnesio son usadas como purgantes.

Elixirs y drogas.- El ácido cítrico se emplea en la preparación de jarabes de sulfato de efedrina, elixirs compuestos de glicerofosfatos, soluciones de fosfato de sodio y en la preparación del citrato de cafeína tal y como se indica en los formularios medicinales, además el ácido cítrico o una de sus sales se emplea en la preparación de sangre humana para transfusiones, también para preparar jarabe de sulfato ferroso y otras aplicaciones indicadas en la farmacopea.

Protección de vitaminas y compuestos sensiti

vos al oxígeno.- El ácido ascórbico es un compuesto muy sensible a la oxidación que provoca su destrucción, la - cual se intensifica con la presencia de residuos metálicos de fierro y cobre, la presencia de ácido cítrico - - en el ácido ascórbico lo protege de la acción oxidante.

### CAPITULO 3

#### EQUIPOS MATERIALES, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

##### 3.1 EQUIPO

- a) Potenciómetro
- b) Autoclave
- c) Incubadora a 28°C
- d) Refrigerador
- e) Centrifuga
- f) Mufla
- g) Balanza Analítica
- h) Mesa de agitación
- i) Estufa

##### a) Potenciómetro

Marca: COLE-PARMER

Modelo: DIGI SENSE pH METER

Núm. 5985-20

Se usó para ajustar el pH de algunos reactivos para la determinación de azúcares reductores; tam-

bién para ajustar el pH final de los medios de cultivo, -  
medir el pH final de la fermentación.

b) Autoclave

Marca: COLE-MARMER

Modelo: 1510-21

Se usó para esterilizar los medios de cultivo. Se esterilizó a 121°C, 1.1 Kg/m<sup>2</sup>.

c) Incubadora

Marca: W.H. CURTIN & C.O.

Modelo 6

Temp. Máxima PANGE 65°C

Se utilizó un cuarto de incubación de 3 x 1.5 x 3 mts donde se mantiene una temperatura de 28°C.

d) Refrigerador

Para la conservación de los medios de cultivo así como de nuestras cepas de Aspergillus-niger utilizamos un cuarto frío más o menos a una temperatura de 4°C. ±

e) Centrifuga

Marca: INTERNATIONAL EQUIPMENT C.O.



NEEDHAM HTS., MASS U.S.A.

Modelo: HN

Esto lo utilizamos para clarificar y de esta forma separar precipitados que se forman en la determinación del ácido cítrico.

f) Mufla

Marca: HEVI - DUTY ELECTRIC C.O

Modelo: OS1 - PT

La mufla lo utilizamos para poner a peso -- constante los crisoles que usamos para la determinación del ácido cítrico.

g) Balanza Analítica

Marca: E. METTLER

SURICH

Modelo: B 5

Total: 200 gr. sensibilidad 0.1 mg.

También como pieza fundamental del equipo -- usamos una balanza analítica, esto nos ayudó para la pesada de nuestros componentes del medio para tener mayor precisión en la adición de estos al medio de cultivo -- también lo usamos para cuantificar el crecimiento de -- nuestro hongo por medio del peso del micelio, y para la cuantificación de nuestro ácido ya que el método que empleamos para la determinación fué un método gravimétrico.

### 3.2 Material

Se utilizó cristelería en general.

### 3.3 Medios de cultivo.- Fórmulas y preparación.

Durante nuestro trabajo usamos diferentes --- medios de cultivo.

#### 3.3.1 Medio de Sabouraud

Fórmula: g/lit de agua destilada

Dextrosa 40.0

Mezcla de peptonas 10.0

Agar 15.0

pH final 5.6 ±

Preparación.- Se solubilizan los materiales - en un poco de agua fría, luego calentando se disuelve --- bien, hasta que el líquido formado no contenga grumos, se esteriliza a 15 lbs. por 20 minutos y se enfría.

#### 3.3.2 Medio de Melaza Agar

Para adaptar al microorganismo este medio - -- se diseñó con variaciones de la fuente de carbonos (Mela-- za).

Fórmula:

Melaza.....	2,5; 5.0; 10.0 gr.
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5 gr.
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.1 gr.
Extracto de levadura	1 gr.
Agar	2 gr.
Agua	100ml.

3.3.3 Medio de Melaza - Agar - Agua de cocimiento de maiz.

Fórmula:

Melaza.	10 gr.
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5 gr.
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.1 gr.
Agua de cocimiento de maiz	2 gr.
Agar	2 gr.
$\text{H}_2\text{O}$	100 ml.

3.3.4 Medio de Melaza - Agar - Agua cocimiento de maiz -  
modificado. (Sólido)

Fórmula:

Melaza	10 gr.
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5 gr.
Agua de cocimiento de maíz	2.0 gr.
Agar	2.0 gr.
$\text{MgSO}_4$	0.025 gr.
$\text{Cu}^{++}$ como $\text{SO}_4^{++}$	0.006 gr.
$\text{Zn}^{++}$	0.025 gr.
$\text{Fe}^{+++}$	0.13
$\text{Mn}^{++}$	0.1 gr.

3.3.5 Medio de Melaza - Agua de cocimiento de maíz modificado. (Líquido).

Fórmula:

Melaza	10 gr.
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5 gr.
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.1 gr.
Agua de cocimiento de maíz	2.0 gr.
$\text{MgSO}_4$	0.025 gr.

Cu ++ como $SO_4$	0.006 gr.
Zn ++ como $SO_4$	0.025 gr.
Fe+++ como Cl	0.13 gr.
Mn ++ como $SO_4$	0.1 gr.

### 3.3.6 Preparación de los medios de cultivo.

Para la preparación de nuestros medios de cultivo, como en realidad todos los que usamos tienen -- los mismos componentes exepctuando el estado (sólido ó líquido) los preparamos de la siguiente forma:

#### Sustancias y Material:

- a) Melaza
- b) Agua destilada
- c) Agua de cocimiento de maíz
- d) Hidróxido de sodio
- e) Acido clorhidrico
- f)  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $MgSO_4$ ,  $CuSO_4$ , Zn++, Fe+++ , Mn++
- g) Potenciómetro
- h) Matraces de 1 lt. y 300 ml.

i) Algodón, Gasa

j) Carbón activado

a).- Técnica

Una vez teniendo nuestra solución de melaza a la concentración requerida (10%) se acidifica con HCl-In a pH de 4-5, después esterilizar el medio y filtrar - este paso se hace con el fin de eliminar por filtración- todas aquellas sales que precipitan en medio ácido.

b) En este segundo paso se hace lo mismo que en el anterior solamente que esta vez se acidifica se- alcaliniza a un pH de 9-9 con NaOH IN y por filtración- elimina las sales que precipitan.

c) Para clarificar el medio usamos carbón ac tivado, después por filtración en caliente eliminamos el carbón activado, obteniendo una solución un poco más clara que la original.

d) Agua de cocimiento de maíz, esta se incorpo ra al medio después de tener el medio clarificado, en este caso no se le hace ningún tratamiento especial úni- camente se agita para homogenizar durante 5 minutos se - filtra v se agrega al medio junto con los otros componentes.

e) Finalmente se ajusta el pH a 3 - 3.5 y - nuevamente se esteriliza para dejar el medio en condiciones de ser inoculado.

f) Para inocular el medio previamente esterilizado, se toma de los tubos inclinados varias asadas y se suspenden las esporas en 10 ml de agua destilada es téril, se agita vigorosamente hasta tener una solución - homogénea, luego con una pipeta estéril, se inocula al - medio con ml. de esta solución, después se agita cuidado samente al matraz con el medio y el inóculo para tratar- de homogenizar y se pone a incubar a 28°C.

CAPITULO 4METODOLOGIA .

## 4.1 Métodos Químicos de Análisis

## 4.2 Métodos Microbiológicos de Análisis

## 4.3 Desarrollo de la cepa y obtención del Acido Cítrico

4.1.1 Determinación de azúcares Reductores.

Método de L.A UNDERKOFLEDR J.F. GUZMON, M.M. Rayman y ELLIS J. FULLER.

Base del método la determinación cuantitativa de azúcares reductores, es una de las valoraciones — más frecuentemente requeridas en el campo de la Bioquímica, estas determinaciones son especialmente importantes en los estudios de fermentación para observar la rapidez de conversión de azúcares y los productos formados, los agentes oxidantes más frecuentemente usados para el análisis de azúcares reductores son: los reactivos de ferricianuro usados en el método de Hagedorn y Jensen y sus modificaciones y los reactivos de cobre. De acuerdo con Shaffer y Somogi y Pickett el ferricianuro es menos específico en sus reacciones con azúcares que los reactivos de cobre ya que el ión ferrico oxida a otras sustancias diferentes de los azúcares en mayor grado que el ión cuprico, por otro lado los reactivos de cobre tienen la desventaja de que el óxido cuproso reoxidado parcialmente por el oxígeno atmosférico, no obstante esta desventaja la mayor especificidad de los reactivos de cobre

hace



hace que sean los más adecuados para la mayoría de los estudios bioquímicos. Se han sugerido muchos métodos -- para determinar la cantidad de óxido cuproso formado, -- pero el método iodométrico de Shaffer y Hartman es el más indicado y el más ampliamente usado -- en este campo.

El presente método es una modificación del método de Shaffer - Somogyi, este proceso ha estado sujeto a muchas investigaciones se ha comprobado que es completamente satisfactorio para análisis rutinarios de azúcares en los medios de fermentación.

### Reactivos.

a) Una solución que contenga 12.5 % de KI y 25 % de  $K_2C_2O_4 \cdot H_2O$ .

b) Una solución 7.5 normal de  $H_2SO_4$ , esta solución debe conservarse libre de material oxidable, -- no deben usarse material de plástico porque este contiene material no saturado que al ser extraído enturbia la solución.

c) Solución estandar de  $Na_2S_2O_3$  0.0500 normal.

d) Solución indicadora de almidón, que contenga 1 % de almidón soluble en solución saturada NaCl.

e) Reactivo "G" para azúcares. Los componentes del reactivo son los siguientes:

	Peso en g/lt.
$\text{CuSO}_4 - 8\text{H}_2\text{O}$	37.5
Sal de Rochelle (tartrato de Sodio y Potasio) $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	125.0
$\text{Na}_2\text{CO}_3$ (anhidro)	53.0
KI	1.0
$\text{Na}_2\text{SO}_4$ (anhidro)	50
$\text{KIO}_3$	3.5665
NaOH	

El ioduro de potasio tiene efecto estabilizante y hace el reactivo menos sensible a otros agentes reductores diferentes de los azúcares, el Sulfato de Sodio evita la reoxidación del óxido cuproso, estabiliza la solución y evita la autoreducción del reactivo, también reduce el grado de disociación del carbono y disminuye así la alcalinidad de la solución. El reactivo "G" para azúcares se prepara como sigue: El carbonato de Sodio y la Sal de Rochelle se disuelven en 3000 ml. de agua destilada, en seguida se añade el sulfato de cobre previamente disuelto en aproximadamente 500 ml. de agua destilada la adición se efectúa con agitación continua de manera que no se desprenda  $\text{CO}_2$  para ello puede utilizarse un embudo cuyo extremo quede bajo la superficie de la solución carbonato - tartrato, el ioduro de Potasio y el Sulfato de Sodio se añaden agitando hasta que se disuelvan después la solución se lleva a un volumen -

aproximadamente de 900 ml. con agua destilada, la solución de hidróxido de Sodio se añade lentamente y con agitación hasta que el PH alcanza el valor de 9.48, el pH se determina a 25°C con un electrodo de vidrio, el error salino es despreciable, la muestra usada para probar el Ph siempre regresa a la solución principal, la solución resultante se calienta a ebullición, se calienta suavemente 10 minutos en un recipiente cubierto después se enfría a 25°C, el iodato de Potasio es pesado con exactitud se añade y se disuelve completamente y el volumen se lleva a un litro en un matraz volumétrico.

El reactivo recién preparado contiene siempre material suspendido por lo que la solución se deja reposar por lo menos una semana en un matraz pyrex, Shaffer y So mo gyi opinan que no debe usarse recipientes de vidrio suave (blando) por que el óxido cuproso formado en la mezcla se deposita continuamente en estos recipientes, cuando el material en suspensión sedimenta la solución clara se filtra a través de asbesto o se sifona y se coloca en matraces Pyrex, siguiendo el proceso anterior la autoreducción se reduce al mínimo.

### Proceso de Análisis.

Se colocan exactamente 5 ml. de reactivo "G" en un tubo de ensaye (pyrex) de 25 X 100 mm. lo cual puede hacerse con una pipeta con nivelación automática, se añaden 5 ml. de la solución problema y se mezcla completamente por agitación el tubo se tapa con un tapón de plástico provisto de un édaso de tubo capilar - el tubo se sumerge por lo menos dos terceras partes de su longitud en un baño de agua hirviente y se calienta -

por el tiempo estandar de calentamiento adecuado a los azúcares que se determinen, se enfría el contenido del tubo a 30°C en un baño de agua fría, se añaden 2 ml. de solución de ioduro de Potasio - Oxalato (reactivo 1) y se mezcla por agitación, a esta mezcla se le añade cuidadosamente 1 m de  $H_2SO_4$ . 7. SN inclinando el tubo de tal manera que evite una rápida producción de  $CO_2$  el tubo debe inclinarse de tal forma que el líquido forme una superficie notable enseguida se deja que el ácido fluya por el lado del tubo y se mezcla girando lentamente el tubo inclinado hasta que el primer desprendimiento violento de  $CO_2$  - sese por último la solución se mezcla completamente por agitación, después de la adición del ácido sulfurico se deja reposar el tiempo suficiente para que el oxido cuproso se disuelva y para que la solución quede completamente clara.

El exceso de reactivo se titula finalmente con tiosulfato de sodio 0.500 N, usando almidón como indicador cerca del punto final de la titulación, la normalidad del tiosulfato se comprueba frecuentemente contra una solución de  $KIO_3$  aproximadamente a 0.500 se corre un blanco exactamente de la misma forma usando como nuestro problema 5 ml. de agua, la diferencia que corresponde al volumen de tiosulfato 0.0500 N consumido por el oxido cuproso se convierte en Mg de azúcar en 5 ml. de solución por lecturas en la curva estandar. Para la aplicación de la técnica para la determinación de azúcares reductores en melaza primero hubo necesidad de hacer una curva estandar de sacarosa cuya concentración de azúcar conocemos y de esta forma siguiendo la misma técnica determinamos los azúcares en la melaza interpolando los valores -

obtenidos en la determinación y así obtenemos la concentración de azúcares presentes en nuestra muestra de melaza, en esto pueden haber ciertas variaciones ya que dependiendo del tipo de melaza tendremos menor o mayor concentración de azúcares.

Para hacer la inversión de la sacarosa utilizamos el siguiente método.

- a) En un vaso de precipitados agregar 100 mg de sacarosa más 50 ml. de agua destilada más 10 ml. de HCl IN.
- b) Después de mezclar cuidadosamente las sustancias anteriores poner en un baño durante 30 minutos a 70°C.
- c) Ajustar el PH a 7 potenciométricamente.
- d) Aforar a 100 ml. para tener una solución de sacarosa de 1mg/ml.

Inmediatamente después de hacer la inversión de la sacarosa se procede a seguir la técnica para la determinación de azúcares reductores por el método antes mencionado, la inversión de los azúcares se hace para la muestra problema así como para obtener la curva estándar de sacarosa.

Para establecer el tiempo de inversión hicimos varias determinaciones a diferentes tiempos 5, 15 y-

30 minutos y observamos que para tener resultados más -  
precisos y confiables debíamos hacer este proceso de in-  
versión de los azúcares con un tiempo de 30 minutos tan-  
to para la curva estandar como para nuestro problema - -  
(melaza).

Con los valores que obtenemos con la sacaro-  
sa invertida a diferentes concentraciones hicimos una --  
curva estandar para que después interpolando los resultata  
dos de nuestro problema, conocer la concentración que te  
nemos, esto se hizo graficando los ml. gastados de tio--  
sulfato en la valoración contra la concentración de azú-  
cares, los resultados se describen en el capítulo No. 5.

#### 4.1.2 Determinación del Ácido Cítrico en el medio de fermentación

##### BASE DEL METODO

El método colirimétrico de la pentrabromo acetona tiene algunas modificaciones para la valoración del ácido cítrico existen varias propuestas en este caso usamos la técnica que proponen Pucher, Vickery y asociados; el tiempo requerido para la reducción estos métodos han sido aplicados para determinar ácido cítrico en fermentación media y extractos de tejidos con resultados satisfactorios.

Un método más específico para la determinación de ácido cítrico depende de la conversión de pentrabromo acetona, la cual puede ser estimada gravimétricamente o clorimétricamente, esta conversión se efectúa cuando el ácido cítrico es oxidado con permanganato de potasio en presencia de bromo bajo condiciones controladas el ácido es convertido cuantitativamente a pentrabromo acetona, Deysher y Halen discutieron la dificultad en la determinación gravimétrica de este derivado del ácido cítrico, pero no se llegó a un acuerdo por lo que indistintamente se puede usar el método gravimétrico o el colorimétrico.

En este caso intentamos el método colorimétrico como lo describen Pucher y Vickery y Asociados, es un método basado en la coloración amarilla formada por la adición de una solución de sulfito de sodio a la pentrabromoacetona, este método colirimétrico es un poco complicado pues requiere una extracción cuantitativa de la-

pentrabromoacetona para que se efectuó la ración y obtenga un valor real. Se han hecho varios estudios sobre la modificación de este método pero realmente todos los variantes que han desarrollado no han contribuido con el objetivo que es simplificar la técnica.

### Reactivos.

- a) Acido Sulfúrico al 95 % en volúmenes iguales de ácido y agua.
- b) Bromuro de Potasio 1 M
- c) Agua Bromada (Saturada)
- d) Agua oxigenada al 3 %.
- e) Eter de petróleo
- f) Dioxano - Agua mezcla en volumen igual de dioxano-agua.
- y) Solución de Sulfato de Sodio 4 g. de sulfato de sodio en 100 ml. de agua.
- h) Permanganato de Potasio 1.5 y 10 N.

### Procedimiento.

De las muestras conocidas se toman alicuatas de preferencia que contengan menos de 25 mg. de ácido cítrico se ponen en tubos pyrex de 2.5 x 20 cm. se agre-



ga 2 ml de solución de ácido sulfúrico, se ajusta el volumen total de 20 ml. y se hierve la muestra por unos cuantos minutos, la solución se enfría y se le agrega en torces 305 ml. de agua bromada, después de 10 minutos cualquier precipitado que se forme se separa por centrifugación, los líquidos sobrenadantes son decantados y se mide el volumen para estandarizar o mantener el mismo volumen en todas las muestras, generalmente en las muestras que no contienen cantidades apreciables de material de reducción el volumen que se logra separar es casi despreciable para el tratamiento preliminar.

Se toman alicuotas de esta solución de 1 ml. se ponen en tubos de 18 x 150 m.m., (es conveniente que sean de este tamaño) y se agrega 0.3 ml. de ácido sulfúrico, 0.2 ml. de bromuro de potasio y 1 ml. de solución concentrada de permanganato de potasio el volumen total se ajusta a 5 ml. aproximadamente y se dejan reposar los tubos 5 minutos a temperatura ambiente al final de este período se ponen en hielo, el exceso de permangana se colora con agua oxigenada se debe, tener cuidado en este paso pues se debe tener la mezcla de reacción de bajo de 5°C durante este paso se hay exceso de agua oxigenada se elimina con un poco de permanganato, los volúmenes totales se ajustan a 10 ml. (los tubos de pruebas tienen una calibración más o menos a 10 ml. para este propósito) se agregan 13 ml. de eter de petróleo, los tubos se tapan con tapones para agitar vigorosamente e inmediatamente centrifugar (este paso se efectúa para romper una emulsión que se forma).

Gr 46

### Prueba Colorimétrica.

Se preparan tubos que contengan 5 ml. de la mezcla agua dioxano y 5 ml. de solución de sulfato de so dio y 10 ml. de la porción de eter de petróleo que con- tienen la mezcla se tapan y agitan vigorosamente y cen- trifugados, el color que se produce debe ser un amarillo ligero y se debe desarrollar en 5 minutos esta coloración se estable por algunas horas, la absorción es determina- da en un fotocolorimetro a 450 m.μ para adsorción de la- luz debe mantenerse constante a 400- 450 mm.

Un tubo que no contiene ácido cítrico sola- mente haciendo el mismo procedimiento con los reactivos- se usa como un 100 % de transmisión estandar.

Al final conocemos las muestras que contie- nen ácido cítrico comparando el tipo de coloración con - la de los problemas, el color según la concentración es- de un amarillo pálido hasta una coloración como de cerve- za, para poder hacer las observaciones necesarias se re- quiere de una curva estandar de ácido cítrico para que - de esta forma poder interpolar los resultados obtenidos- con la solución problema y obtener la concentración pre- sente en la muestra.

#### 4.1.3 Determinación de ácido cítrico por método gravimé- trico.

Agregar aproximadamente 100 mg. de ácido tar- tárico y 6 ml. de  $H_2SO_4$  IN a 50 gramos de muestra en un-

matraz de 150 ml. y calentar en un baño de vapor durante 15 minutos, agregar inmediatamente 3 ml. de una solución de ácido fosfotúngstico al 20 %, mezclese bien y colóquese de nuevo en un baño de vapor durante 5 minutos, transferir en un matraz volumétrico de 250 ml. de alcohol, enfriar, diluyanse hasta la marca con alcohol, mezclese y filtrense a través de papel filtro, del filtrado pipetear 20 ml. a un tubo de centrifuga.

### Reactivos.

- a) Solución de acetato de plomo - disolver - 75 g de  $Pb(OAc)_2$  IN en  $H_2O$ , agregar un ml. de ácido acético y diluir hasta un volumen de 250 ml.
- b) Solución de permanganato de potasio, disolver 5 g de permanganato en  $H_2O$  y diluyanse hasta 100 ml.
- c) Solución de sulfato Ferroso.- Disolver -- 40 g. de  $Fe SO_4 \cdot 7H_2O$  en 100 ml. de agua - que contenga 1 ml. de  $H_2SO_4$ .

### Determinación.

A la solución contenida en el tubo de centrifuga, agregense 10 ml. de la solución de acetado de plomo, agítelo vigorosamente durante 2 minutos aproximadamente y centrifugar a una velocidad de 1000 rpm durante 15 minutos. Decántese cuidadosamente el líquido sobrenadante de las sales de plomo precipitadas y analice con-

una cantidad pequeña de una solución de  $\text{Pb}(\text{OAc})_2$  si se forma un precipitado, vuelvase a poner en el tubo de centrifuga, agreguese de nuevo, si el sedimento queda flotando vuélvase a centrifugar aumentando la velocidad y el tiempo y decántese, invertir el tubo y dejese escurrir completamente durante varios minutos, agregar aproximadamente 150 ml. de agua a las salas de plomo que se encuentran en el tubo de centrifuga agítese bien y pase-se en  $\text{H}_2\text{S}$  hasta llegar al punto de saturación, transferir a un matraz volumétrico de 250 ml. y diluir hasta la marca con agua mezclese y filtrar a través de papel doblado.

Evaporar 200 ml. de la solución ácida aislada hasta 20 ml. aproximadamente, enjuaguese en un matraz erlenmeyer de 250 300 ml. con tapa de vidrio y tapado y complete-se con agua hasta un peso neto de 40 g. aproximadamente.

Agregar 2 g. de  $\text{KBr}$  y 5 ml. de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y calentar a  $50^\circ\text{C}$  aproximadamente y dejar en reposo durante 5 minutos, agregar lentamente 20 ml. de la solución de  $\text{KMnO}_4$  (en porciones de 1-2 ml) de la bureta agitando el matraz unos segundos después de cada adición dejese en reposo durante 5 minutos y enfriese a  $15^\circ\text{C}$ . añádase lentamente la solución de  $\text{FeSO}_4$  agitándola constantemente hasta que la mezcla comience a aclararse, agítese durante un minuto y continúe añadiendo la solución de  $\text{FeSO}_4$  hasta que se decolore el  $\text{MnO}_2$  y agrueguense unos cuantos ml. en exceso, agregar 20 g. de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro con agitación para asegurar la disolución (repite-se la determina-

ción si el  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  queda sin disolverse sustancialmente)- enfriar a  $15^\circ\text{C}$  y agítese vigorosamente durante 5 minutos.

Recoganse inmediatamente la pentabromoacetona mientras esté aún fría en un crisol Gooch y lávese el -- precipitado residual del matraz con una porción del filtrado, finalmente lavese el crisol con 50 ml. de agua -- fría y dejese bajo succión durante unos minutos, dejese secar el crisol durante la noche en un desecador con ácido sulfúrico y pesese o bien coloquese el crisol en un -- tren secador y airese hasta que la pérdida de peso no -- exceda de unos cuantos décimos de miligramo haciendo la -- primer pesada después de 20 minutos

Elimínese la pentabromoacetona del crisol -- mediante lavados con alcohol y luego con éter, llenando -- el crisol tres veces con cada solvente, seque el cri -- sol durante 10 minutos a  $100^\circ\text{C}$  dejese enfriar en el dese -- cador y pesese la diferencia entre los dos pasos equiva -- le a 1 peso de la pentabromoacetona, los gramos de ácido cítrico se calculan de la forma siguiente:

$A = 0.424 P$ . donde X = g. de ácido cítrico -- anhidro en partes alicuotas; P = g de pentabromoacetona -- y 0.424 = Factor teórico para convertir la pentabromoace -- tona en ácido cítrico anhidro.

### Métodos Microbiológicos.

#### 4.2.1 Conservación de Cepas.

Los cultivos y microorganismos que se conserva

91-16

van sobre los sustratos usuales se tienen que sembrar por regla general en breves intervalos de tiempo o sustratos frescos debido al rápido crecimiento y el acumulo de productos metabólicos que de aquí se deriva para impedir estas frecuentes recieambros se pueden utilizar sustratos que no favorezcan el crecimiento rápido, los cultivos se pueden conservar también a temperaturas que se encuentren por debajo de su temperatura optima.

La conservación de cultivos de hongos se puede realizar en tierra estéril durante largo tiempo a temperatura ambiente, la tierra estéril se utiliza como sustrato de conservación para los hongos filamentosos para esto se usa buena tierra, se deseca hasta un 20 % de humedad, se lleva a tubos de ensayo colocando 5 gramos en cada uno de ellos y se esteriliza tres veces con intervalos de un día a 120°C durante una hora en autoclave, es muy importante que se mantenga el grado de humedad para evitar alteraciones en la cepa, este método de conservación se usa cuando el uso de la cepa no es frecuente; también con la misma finalidad los cultivos se pueden conservar liofilizados pero esta técnica es más usada para la conservación de bacterias que para hongos. También los cultivos se pueden conservar en forma inclinada sobre agar o Sabouraud ya que en estos sustratos el cultivo ofrece un crecimiento escaso de las partes vegetativas, por lo cual no se intoxica el sustrato, los tubos inclinados deben ir tapados con algodón y para impedir la desecación el tapon de algodón se puede cubrir con celofano papel aluminio.

En el caso nuestro el método de conservación que utilizamos fué el de sembrar periódicamente (cada -- ocho días) este cultivo lo hicimos directamente en el me-  
dio seleccionado para la fermentación, la única variante era que el medio que usamos para la conservación era só-  
lido en tubos inclinados en este medio dejamos crecer el  
Aspergillus niger 24 horas y durante este tiempo se for-  
maba una capa espesa en toda la superficie del medio, --  
una vez teniendo este desarrollo lo manteniamos en refri-  
geración a una temperatura aproximada de 4 a 6°C para --  
evitar que prosiguiera un desarrollo sin control, quan-  
do se trataba de inocular el medio de fermentación lo --  
que hacíamos era de estos tubos inclinados tomar uno --  
(el más reciente o sea la recienbra anterior) y dejarlo-  
esporular para que luego en agua destilada hacer nuestra  
suspensión de esporas y de este método teníamos nuestro  
inóculo preparado momentos antes de inocular nuestro me-  
dio de fermentación.

Independientemente de las resiembras que ha-  
cíamos, mantuvimos durante todo el tiempo nuestra cepa -  
original en unos tubos inclinados con medio de Sabou- -  
raud, estos tubos los mantuvimos perfectamente tapados-  
con algodón y una capa de papel aluminio con objeto de -  
mantener por mucho tiempo en condiciones normales de --  
humedad aunque esto fue imposible, pues conforme estaba-  
en refrigeración esto nos ayudó a inhibir el desarrollo-  
y al final aunque faltó de humedad creemos que nuestra  
cepa se encontraba en buenas condiciones, esto fué posi-  
ble debido a que el Aspergillus niger es un hongo muy re-  
sistente a condiciones adversas.

#### 4.3. Desarrollo de la Cepa y obtención del Acido Cítrico

Para el desarrollo de nuestra cepa utilizamos los diferentes medios de cultivo mencionados anteriormente.

Medio de Sabouraud (3.3.1) Este medio fué utilizado el inicio y durante el desarrollo del trabajo, ya que nuestra cepa originalmente fué cultivada en este que es un medio específico para el desarrollo de hongos, también lo escogimos para hacer varios inóculos con el fin de obtener un máximo de crecimiento en poco tiempo y para obtener la máxima actividad de nuestra cepa y una vez teniendo la máxima actividad medida como tiempo mínimo de desarrollo en el medio se prosiguió a la adaptación en medios con pequeñas cantidades de melaza que es la base de nuestros medios de cultivo empleados para la fermentación.

Medio de Melaza.- Agar. (3.3.2) Este medio fue ideado en base a que la finalidad de nuestro medio del metabolismo del microorganismo llegar a la obtención del ácido cítrico, este medio se inició con una concentración pequeña de melaza y con el fin de adaptar el *Aspergillus niger* a crecer en este medio hasta lograr su total adaptación.

Una vez conseguido nuestro objetivo, es decir hacer crecer a nuestro organismo en un medio diferente al que se encontraba adaptado (Sabouraud), prosegui-



mos a una nueva variación en el medio de cultivo, la variación consistió únicamente en aumentar la concentración de la melaza y conseguir la adaptación de *Aspergillus niger* en el nuevo medio, la adaptación la consideramos lograda cuando después de varias inóculaciones en serie más o menos 5 o 8 recipientes obtuvimos un crecimiento en toda la superficie del tubo inclinado en un tiempo máximo de 24 horas.

Las fórmulas de los medios usados para este primer paso fueron como se describen en 3.3.2.

De acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionó el medio que según nosotros era el más adecuado esto en base al tiempo de crecimiento en cada uno de los ~~medios~~ medios usados pues en los medios anteriores se observó que a menor concentración de melaza el tiempo de crecimiento era mayor por lo que para hacer una nueva variación en el medio tomamos en cuenta el resultado más adecuado en la anterior observación.

La nueva variación en el medio consistió — en agregar agua de cocimiento de maíz, como se describe en 3.3.3. que actúa como factor de crecimiento debido a la gran cantidad de nutrientes que tiene este subproducto.

En esta variación del medio, el agua de cocimiento de maíz se adicionó en una proporción fija ya que posteriormente al hacer el estudio del medio de cultivo final incluyendo todos los componentes se harían las variaciones para determinar la concentración adecuada.

Con este medio se hizo lo mismo que con el anterior, es decir se hicieron varias reciembras (5-8) - con el objeto de adaptar el *Aspergillus niger* al medio - hasta tener un máximo de desarrollo en un tiempo corto - (24 horas). Después de haber obtenido buenos resultados con este medio que sería la base para nuestro medio líquido de fermentación se prosiguió hacer la modificación al medio de acuerdo a los resultados y experiencias que obtuvimos de la literatura, en la cual encontramos diferentes medios de fermentación pero una de las más adecuadas según el organismo empleado en este tipo de fermentación es el que incluye además de las fuentes de C.N.O. H. algunos microcomponentes estos son algunos iones como  $Mg^{++}$   $Cu^{++}$   $Zn^{++}$   $Fe^{+++}$   $Mn^{++}$  que conceden al medio de fermentación ciertas características favorables, como se mencionó en el capítulo anterior.

Según nuestra literatura al incluir estos iones al medio se debe empezar a concentraciones bajas - para así poder observar las variaciones que pueden causar la presencia de ellos, de acuerdo a esto se diseñó - un medio con los componentes anteriores que le podemos llamar medio base más las sales de estas iones en concentraciones bajas como a continuación se describe en la fórmula del medio.

Este medio de cultivo el que posteriormente sería el adecuado de acuerdo a pequeños ajustes durante las determinaciones subsecuentes se hizo primeramente sólido para hacer la adaptación del organismo pues a pesar de que los nuevos componentes se encontraban en concentraciones relativamente bajas causan efectos negativos -

en la primera reciembra y posteriormente conforme al Aspergillus niger se adapta se obtiene un desarrollo uniforme.

Después al observar el comportamiento del microorganismo en el medio 3.3.3 se usó el 3.3.4 este medio en forma sólida en tubos de ensaye inclinados, fue la primera vez que nuestro Aspergillus niger se desarrolló en presencia de varios componentes extraños a los compONENTES a que estaba adaptado a crecer por lo consiguiente la primera vez que se inoculó este nuevo medio - observamos una disminución muy notable en el crecimiento lo cual nos indicaba que el Aspergillus niger debería tener un período de adaptación en este medio, aunque como se puede observar se compone de los mismos nutrientes a excepción de las sales que después de la adaptación serán elementos indispensables para la producción del ácido.

Para adaptar a nuestro organismo a desarrollarse en este medio se hicieron cultivos siguiendo la secuencia acostumbrada es decir; se hicieron reciembras en serie con un intervalo de 36 horas, durante siete reciembras en las que después el cultivo requería de 18 horas aproximadamente para desarrollarse sobre toda la superficie del tubo inclinado, esto nos indicaba que nuestro organismo estaba adaptado al medio, pues en las primeras siembras solo se obtenía un 30 50 % del desarrollo sobre la superficie y ya en esta etapa final se obtiene un 100 % de población sobre la superficie del medio inclinado.

Después de conseguir la adaptación óptima del *Aspergillus niger* en el medio deseado en forma sólida proseguimos a usar el mismo medio solamente que en este caso se utilizó en forma líquida. (3.3.5).

Esto se hizo con el fin de hacer crecer -- nuestro organismo en el medio adecuado para la fermentación que es lo que en realidad tratamos de conseguir al hacer las adaptaciones anteriores, pues en un medio líquido con aeración y agitación provocaríamos una fermentación más completa en el seno del líquido y no solamente superficial, al hacer uso de este medio ya no fue necesario hacer los pasos de adaptación que se hicieron en el medio anterior, pues nuestro *Aspergillus niger* ya se encontraba adaptado a crecer en este medio, la única diferencia es que este nuevo medio de cultivo y como es de suponer las condiciones de desarrollo son diferentes entonces lo que hicimos fue acostumbrar a *Aspergillus niger* a crecer en estas condiciones.

En los cultivos anteriores la temperatura -- de incubación fue de 28°C, esta temperatura es la que se recomienda en la literatura como la más adecuada para el desarrollo de *Aspergillus niger*, y por lo consiguiente -- para este medio líquido se usó la misma temperatura.

Como anteriormente se hizo la adaptación -- a este medio en forma sólida, al hacer crecer el *Aspergillus niger* en el mismo medio en forma líquida se notó -- una ligera disminución del crecimiento, pues hubo desa--

rrollo hasta las 36 horas, pero esto se superó después - de hacer una nueva reciembra a un medio sólido y después nuevamente el medio líquido y se obtuvo buen resultado - ya que hubo desarrollo en menos tiempo. ( 24 horas) para las inoculaciones siguientes se hizo de la misma forma.

En este medio líquido se uso la técnica que marca nuestro objetivo, es decir se usó agitación y aireación, para la agitación se usó una mesa rotatoria con la cual obteníamos agitación y para la aireación únicamente tomamos en consideración el volumen de aire estéril que queda en el seno del Matraz (300 ml.), pues al hacer la inoculación se considera que tenemos aire estéril, además durante la fermentación hay un intercambio de aire y  $CO_2$ , el  $CO_2$  sale al exterior y el aire entra al seno de nuestra fermentación esto a través de un tapón de gasa y algodón estéril, en caso de que el aire entra no fuese estéril nuestra fermentación no corre peligro ya que una forma de controlarla cuando se usa un medio no estéril es por medio de nuestro Ph y como en este caso tenemos un pH bajo, el riesgo de contaminación es mínimo.

Luego que ha hicimos crecer el *Aspergillus niger* en el medio desado, proseguimos a hacer la elección de nuestro medio más adecuado, esto tomando como base el medio líquido anterior, esta elección o formulación de nuestro medio consistió en hacer variaciones en la concentración de los componentes y en base al comportamiento del desarrollo hacer la elección de la concentración adecuada.

Como primera variante elegimos la melaza, -

esto consistió en hacer el medio con todos los componentes y en la concentración indicaba en la fórmula anterior y solamente modificar la concentración de la melaza en las cantidades siguientes, 10 %, 5 %, 2.5 % 1.5 % los resultados de esta variación o estudio de la concentración más adecuada se describen en la tabla No. 1.

De acuerdo a los resultados encontramos que la concentración de melaza en el medio debe ser de 8 a 10 % ya que en menor o mayor concentración hay una notoria disminución de crecimiento del organismo, en esta variación y en las siguientes medimos el crecimiento del organismo estableciendo un tiempo de fermentación o desarrollo de 72 horas, si tomamos en cuenta los tiempos de desarrollo establecidos para las reciembras anteriores vemos que hay una variación, esto se debe a que para hacer la determinación de las concentraciones de los componentes del medio se dejó crecer un poco más con el fin de obtener mayor cantidad de micelio, esto debido a que a menor o mayor concentración de estos componentes del medio vamos a tener mayor o menor crecimiento, por lo tanto establecimos prácticamente que 72 horas son suficientes para poder interpretar y definir cual es la concentración adecuada, esta observación se hizo filtrando el cultivo en un papel filtro de peso conocido y luego secando el micelio en una estufa a 60° durante una hora, por diferencia de peso encontramos la cantidad total de micelio que se desarrollo en 72 horas en el medio que mencionamos anteriormente, este medio incluye la variante de la concentración de melaza antes descrita.

Posteriormente hicimos las siguientes varian

tes:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , este componente se incluyó en el medio—  
 en concentración de 1 %, 0.5 %, 0.25%, 0.1%.

$\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ , se incluyó en la siguiente concen—  
 tración: 0.5 % 0.25%, 0.1%, 0.05%.

Agua de cocimiento de Maíz, en la siguiente—  
 concentración 5 %, 2 %, 1%, 0.5%.

Los resultados que obtuvimos al efectuar es—  
 tas variantes las describimos en la tabla No. 1.

De acuerdo al comportamiento del *Aspergillus*  
*niger* y las observaciones que hicimos definimos el medio  
 más apropiado para efectuar la fermentación y de esta —  
 forma obtener nuestro ácido cítrico como producto de la —  
 fermentación.

Observando los resultados de la tabla No. 1—  
 vemos que para seleccionar la concentración de los compo—  
 nentes antes mencionados, tomamos aquella concentración—  
 de los componentes antes mencionados, tomamos aquella —  
 concentración en la cual el desarrollo fue mayor aún —  
 cuando esta variación fuese mínima, esto se hizo en aten—  
 ción a la literatura consultada ya que para que en esta—  
 se establezca que a mayor crecimiento la conversión de —  
 azúcares en ácido cítrico, será mayor, siempre que en el  
 medio no exista algún compuesto en tal concentración que  
 inhiba al desarrollo del *Aspergillus niger*, estos com—  
 puestos pueden ser: Mg,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$ , por lo tanto —

no se hizo ninguna variación con estos compuestos y por el contrario con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dependiendo de la raza de *Aspergillus niger* puede existir algunas variaciones en la conversión de los azúcares en ácido así como - en el desarrollo del organismo, por lo que para fijar - la concentración de estos compuestos así como la melaza - y el agua de cocimiento de maíz hicimos estas variaciones con el fin de observar el comportamiento del aspergillus niger.



#### 4.4 Fermentación.

La fermentación es un proceso de desasimilación, en este proceso se consumen sobre todo compuestos que contienen carbono, estos hacen el papel de combustible para crear energía en forma de calor.

La fermentación es un proceso metabólico que se caracteriza por la degradación incompleta de los hidratos de carbono, por esta razón la energía que libera durante el proceso fermentativo es mucho menor que la — energía liberada en un proceso respiratorio.

Tomando en cuenta los conceptos de fermentación antes mencionados, nuestra fermentación se llevó a cabo en un medio rico en azúcares este contenía 10 % de Melaza esta a su vez según nuestra determinación con un contenido de 80 % de azúcares, además de este compuesto rico en carbono nuestro medio de fermentación contenía — otros elementos indispensables como  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{PO}_4$ , —  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Zn}^{++}$   $\text{Fe}^{++}$ , en este caso particular nuestro proceso de fermentación lo llevamos a cabo a nivel laboratorio, se le dió mucho énfasis al control de la fermentación en lo que respecta a tiempo, temperatura y concentración del medio de cultivo ya que en nuestro caso estas variables fueron significativas para poder llevar — nuestra fermentación a la producción del ácido cítrico, — ya que si no se tiene un control adecuado a pesar de que se produce una fermentación esta puede desviarse a la obtención de otros productos y como ácido oxálico, ácido — málico, etc.

Nuestra fermentación se realizó bajo las siguientes condiciones: primeramente partimos de un medio adecuado seleccionado cuidadosamente como se menciona en

el capítulo III controlando la concentración de los componentes así como el pH inicialmente este se mantuvo -- aproximadamente a 3-3-5 que es el pH adecuado para que nuestro organismo se desarrolle, los factores también de gran importancia en nuestro trabajo es la temperatura -- y el tiempo de fermentación la temperatura la establecimos siguiendo las instrucciones de nuestra información -- (28°C) pero el tiempo de fermentación lo establecimos -- practicamente como lo indicamos en el capítulo V de -- acuerdo a los resultados.

presentativo ya que entre 36 y 60 horas existe un aumento considerable en el crecimiento y a partir de este -- tiempo el crecimiento se frena y se mantiene constante -- ya que a partir de este momento empieza la fermentación -- realmente pues en el tiempo anterior se efectúa el creci -- miento ya que en este tipo de fermentación se pueden con -- siderar dos fases, la de crecimiento y la de fermenta -- ción del ácido cítrico, por lo que se tomó como tiempo -- suficiente para establecer estos resultados un tiempo de 72 horas.

Este tipo de crecimiento o fermentación lo hi -- cimos en matraces bafleados de 300 ml. estos después de -- inocular el medio con una suspensión de esporas en agua -- destilada se tapan con gasa-algodón-gasa, sujetando el -- cuello del matraz con una liga estéril.

La suspensión de las esporas se hace en un tu -- bo de ensaye con 20 ml. de agua estéril agitando vigoros -- amente para obtener una distribución homogénea y de -- aquí tomar un ml. para cada matraz.

Después del tiempo establecido el contenido -- del matraz se filtra a través de papel filtro, el papel -- filtro se tapa, para que después por diferencia de peso -- conocer el peso real del micelio, después de hacer el -- filtrado se lava con agua. destilada con el fin de arras -- trar residuos del t medio, si después del lavado con -- agua la masa del micelio no se seca lo suficiente, se -- puede hacer un nuevo lavado con alcohol, inmediatamente -- se pone a secar a la estufa a 50°C durante una hora, se -- pesa y de acuerdo al este resultado se hace la elección -- de la concentración más favorable de estos componentes --

del medio, este proceso se repitió durante las variaciones que se efectuaron para que de esta forma se establecieran la concentración más adecuada para cada componente.

### *Conclusiones*

Después de haber establecido las variantes — anteriores lo que restaba determinar era el tiempo adecuado de fermentación esto lo determinamos tomando en cuenta las experiencias obtenidas por los investigadores que menciona la literatura consultada, la mayoría de estas personas concluyen en que la mayor producción del ácido se efectúa entre 7 y 10 días de fermentación, después de este tiempo la producción del ácido cítrico disminuye considerablemente, por lo que establecimos que a partir del séptimo día de fermentación se haría la determinación de % de ácido cítrico producido y así para el octavo noveno hasta el décimo día y de acuerdo con los resultados establecer el final y el tiempo de fermentación, esto se define observando los resultados de las valoraciones hasta obtener un valor constante, si después de este tiempo al cuantificar el ácido cítrico obtenemos variaciones considerables, esto nos indica que el tiempo no es suficiente y en cambio si los resultados se mantienen constantes quiere decir que la fermentación ha terminado y por más que se le de más tiempo ya no habrá más incremento en la producción del ácido.

Los resultados que obtuvimos son los siguientes:



Tabla No. 2

Matraz	Peso del Micelio	PH	Rendimiento en % de Acido Citrico
1	5.051 <u>5</u>	2.61	36.4 <u>3</u>
2	4.9786	2.59	35.86
3	5.0238	2.6 <u>2</u>	3 <u>6</u> .13
4	5.0857	2.67	36.25
<u>5</u>	4.9 <u>8</u> 15	2.58	35.3 <u>9</u>
6	4.864 <u>2</u>	2.61	34.9 <u>8</u>
7	5.1056	2.6 <u>6</u>	3 <u>5</u> .86
8	4.9385	2.67	3 <u>6</u> .01

Después de ocho días de Fermentación:

Tabla No. 3

Matraz	Peso del	pH	Rendimiento en % de Acido Cítrico
1	6.9351	2.61	50.83
2	4.6805	2.59	49.75
3	<u>5.6475</u>	2.57	48.9 <u>0</u>
4	<u>6.5872</u>	2.62	49.6 <u>6</u>
<u>5</u>	6.6232	2.6 <u>3</u>	50.26
6	5.75 <u>43</u>	2.6 <u>6</u>	50.18
7	4.9568	2.6 <u>0</u>	49.38
8	5.9742	2.63	50.12

Después de nueve días de fermentación.

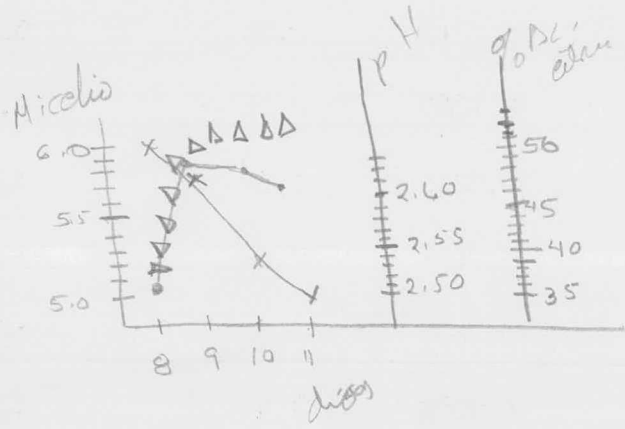
Tabla No. 4

Matraz	Peso del micelio	pH	Rendimiento en % de Acido Cítrico
1	<u>4.5891</u>	2.61	52.18
2	<u>6.7124</u>	2.54	51.9 <u>5</u>
3	<u>6.3215</u>	2.58	51.86
4	6.1257	2.55	52.25
<u>5</u>	5.8246	2.59	52.32
6	5.3894	2.52	52.38
7	6.7530	2.50	52.29
8	4.9870	2.54	52.15

Después de 10 días de fermentación

dia	micelas	pH	% Ac. Cit.
8	$5,0037 \pm ,08$	$2,63 \pm ,04$	$35,86 \pm ,47$
9	$5,89 \pm ,80$	$2,61 \pm ,03$	$49,89 \pm ,59$
10	$5,84 \pm ,79$	$2,55 \pm ,04$	$52,17 \pm ,18$
2(11)	$5,79 \pm ,63$	$2,50 \pm ,01$	$52,33 \pm ,08$

efecto de oxalico  $\Delta$



○ — ○ micelas  
 x — x pH  
 Δ Δ Δ Δ ac. citrico



Tabla No. 5

Matraz	Peso del micelio	Ph	Rendimiento en % de Acido Citrico
1	<u>4.9437</u>	2.51	52.4 <u>1</u>
2	<u>4.7296</u>	2.49	52.36
3	<u>6.4586</u>	2.50	52.28
4	6.1238	2.52	52.19
<u>5</u>	<u>6.0227</u>	2.51	52.25
6	6.3426	2.50	52.38
7	5.78 <u>38</u>	2.48	52.40
8	5.9476	2.50	52.34

### 5.3 Resultados y cálculos de la valoración del Acido Citrico y Obtención de rendimientos

#### Cálculos:

Para hacer los cálculos del % de ácido cítrico que obtenemos en la fermentación seguimos el método - establecido en la técnica que usamos (4.3) mencionamos - un ejemplo de como se efectuaron los cálculos.

Datos:

Peso del crisol gooch

Peso del crisol con muestra.

0.424 factor de conversión

$X = 424 P$

$X = \text{g de ácido cítrico en alicuota}$

$P = \text{g de pentabromocetona}$

$X = 0.424 \times 0.5985$

22.1788

22.7773

0.5985

$X = 50.75$

#### 5.4 Determinación de acidez como ácido cítrico.

Valoración de la muestra con NaOH 0.1 N.

Alicuota = 10 ml.

ml. gastados de NaOH = 0.85 ml.

$$\% \text{ de acidez} = \frac{\text{ml} \times N \times \text{Eq.}}{\text{p. a.}}$$

$$\% \text{ de acidez} = 0.408$$

## C A P I T U L O 6

## DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Para poder desarrollar nuestro trabajo tuvimos que estudiar diferentes técnicas para las determinaciones que efectuamos, en este capítulo trataremos de descubrir algunos puntos de vista de las técnicas que utilizamos.

### 6.1 Determinación de azúcares reductores en melaza por el método de L.A. UNDERKKOFLER, J.F.

Existen algunas otras técnicas para hacer la determinación de azúcares reductores pero en nuestro caso este método es el más adecuado por el material que usamos (Melaza) ya que otros métodos (Feling) se basan en una titulación y en este caso por la coloración del problema se hace imposible hacer una determinación con precisión, en cambio el método que utilizamos aunque también es una titulación es más fácil de observar y por lo tanto utilizamos este método para la determinación de azúcares reductores.

### 6.2 Determinación del ácido cítrico en el medio de Fermentación.

Para la determinación del ácido encontramos algunos problemas ya que la mayor parte de técnicas que consultamos se basan en los mismos principios, es decir en formar por medio de los distintos reactivos que se utilizan un compuesto intermedio que es la pentabroaceto na y en fusión de este compuesto que se forma esta la

cantidad y el % de ácido cítrico que tenemos presente, - pero la mayoría de las técnicas no contienen información específica o técnicas bien definidas ya que los reactivos en uno y otro autor aunque se trate de la misma técnica difieren en concentración o modo de efectuar la reacción por lo que en los métodos que encontramos en la revista analítica de Ingeniería Química no pudimos utilizar ninguno de estos y por lo tanto utilizamos el método oficial que se encuentra en el A.O.A.C. este método consiste en una valoración gravimétrica, este método fue el que finalmente utilizamos como se describe en (4.3) para la determinación y valoración del ácido cítrico presente en nuestro medio de cultivo.

6.3 Con respecto a los resultados obtenidos en general - de todo el proceso que desarrollamos, el punto final es donde realmente se puede valorar el resultado, y encontramos que la cantidad de ácido cítrico que se formó era relativamente baja en comparación con los resultados - que marca la literatura pero si tomamos en cuenta las - condiciones que utilizamos y pensamos que son buenas ya que obtuvimos un 52%; en la literatura reportan hasta un 80% esto es debido a que seguramente utilizan unas cepas, muy bien seleccionados en condiciones más favorables y - posiblemente con ciertas mutaciones que favorecen la formación del ácido cítrico,

Bajo esta secuela de trabajo, se podrían obtener cepas que den rendimientos cercanos al 100 %.

Durante nuestro trabajo utilizamos solamente-

un tipo de melaza, ya que no se pudo conseguir de otro - ingenio azucarero pero creemos que dependiendo del ori- gen de la melaza tendrá diferentes impurezas y esto en - este tipo de fermentación será un factor determinante ya que si las sustancias extrañas como algunos iones en ma- yor o menor cantidad o impurezas no determinadas podrán - favorecer o no a nuestra fermentación para trabajar con- una melaza desconocida se requiere de experimentar con - ella o definitivamente hacer la determinación de las im- purezas y de esta forma establecer un método de purifica- ción si lo requiere.

Después de haber observado los diferentes me- dios que utilizamos decidimos que el mejor o el más - - adecuado para la fermentación era el que enunciamos en - 3.3.5.

El pH que finalmente usamos para nuestro me- dio de cultivo fue 3 ya que a este pH obtuvimos buenos - resultados.

Las condiciones que se deben mantener con ma- yor cuidado son el Nitrogeno y Fosfatos en nuestro caso, la fuente de nitrogeno  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  la mantuvimos a una con centración de 0.5 g/lit. y los fosfatos en 0.1g/lit. ya - que ni estos factores no se controlan se puede provocar - un crecimiento muy abundante y disminución en la conver- sión del ácido cítrico.

En el desarrollo de nuestro trabajo debido a-

la falta del equipo adecuado se desarrollo a nivel de -- laboratorio, lo efectuamos en matraces de 300 ml. manteniendolos en agitación.

Posiblemente si el trabajo se desarrolla en -- fermentadores de mayor volumen. Se obtengan mejores -- resultados, para un experimento con fermentadores se pueden utilizar volúmenes de 10, 20, 50, 100 lts. con estos volúmenes de trabajo los resultados que se obtienen serán de mayor confiabilidad.

La finalidad de nuestro trabajo es que es un tema bastante conocido, es buscar condiciones ~~para~~ aceptables para que se produzca ácido cítrico por este método en México, utilizando melazas como materia prima, y -- una cepa de *Aspergillus niger* debidamente adaptada.

## C A P I T U L O 7

### 1.1 CONCLUSIONES.

En la aplicación completa del método descrito de la fermentación se obtuvieron buenos resultados ya que se produjo un por ciento no muy bajo de ácido cítrico en un corto tiempo de fermentación, el inóculo con esporas jóvenes favorece el crecimiento en el medio de fermentación ya que si se usan esporas de cultivos hechos con algunos días de anticipación el crecimiento del hongo disminuye considerablemente durante las primeras horas lo contrario sucede si se usan esporas recién cultivadas, es decir el tiempo de crecimiento es más corto.

Una cantidad de hongos relativamente pequeños es capaz de producir ácido cítrico bajo condiciones de cultivo sumergido; la producción del ácido cítrico bajo estas condiciones se puede dividir en dos fases, la de crecimiento y la de fermentación, en la cual esta última es la más importante ya que de esta depende la formación del ácido cítrico, a grandes rasgos los factores más importantes en esta fermentación son: la clase de microorganismo empleado, la composición del medio de cultivo -- el abastecimiento de oxígeno, el pH y la temperatura.

Los elementos nutrientes deben presentarse en tales cantidades que sean suficientes tanto en cantidad de nitrógeno como de minerales para el buen desarrollo del hongo, el abastecimiento de nitrógeno y fosfato pare



ce estar formado por una concentración bastante definida ya que en cantidades menores o mayores de los adecuados el hongo sufre graves trastornos, en cuanto a su desarrollo por lo que estas sales se deben usar en cantidades limitadas, en cuanto a las sales de Zinc y Magnesio son igualmente necesarias para la producción del ácido cítrico pero su uso no es tan estricto como son las anteriores.

La producción del ácido cítrico es un proceso de fermentación altamente aerobio y para que se efectúe de una forma adecuada requiere de un abastecimiento adecuado y suficiente de oxígeno, en nuestro caso tomamos en cuenta este factor y llegamos a la conclusión de que la agitación de los matraces y el oxígeno que se encontraba presente en el matraz así como cierta cantidad que se filtra del exterior por el tapón del matraz, era suficiente para nuestra fermentación.

La producción del ácido cítrico a partir de melazas se puede efectuar satisfactoriamente cuando se eliminan muchas impurezas orgánicas del medio.

Existen diferentes tipos de melaza dependiendo del cuidado que se tenga en el proceso de su obtención, por lo que es de importancia la procedencia de esta ya que cada ingenio azucarero puede tener variación en obtención de este subproducto y como consecuencia —

los compuestos que puedan estar presentes en los diferentes tipos de melaza, juegan un papel muy importante y esto hace que la melaza sea apropiada o no para la fermentación cítrica ya que altas concentraciones de nitrógeno y fosfato puede limitar la producción del ácido cítrico— es posible que melazas con bajo contenido de estos compuestos se pueden utilizar sin necesidad de hacer una purificación, pero generalmente se requiere de hacerla ya— algunos compuestos están en cantidades excesivas en la melaza, o para esto se ha optado ultimamente usar resinas cambiadoras de iones para la purificación de las melazas y esto ofrece un proceso relativamente simple para este propósito.

Tomo IV pag. 388 1923  
Ed. Labor Soc.

8.7.- WARINGTON R.J. CHEMISTRY SOC.  
Volumen 28, pag. 934, 1878  
Editorial A. MoGEAN-HILL PUBLICATION EVERY OTHER  
MONDAY.