

Producción de ácido cítrico por fermentación usando *Torula candida*

Giraud Miguel, Vicente Fausto, Scollo Daniel, Caruso Susana

El ácido cítrico es un aditivo muy utilizado en la Industria Alimenticia y que se puede producir a nivel laboratorio y luego a escala industrial a partir de hidrolizado de maíz



Resumen:

El ácido cítrico es un aditivo muy utilizado en la Industria Alimenticia que debe ser importado en Argentina de Europa, China y Brasil. Se propone un proceso de producción a escala laboratorio con el objetivo de llevarlo a nivel industrial, aprovechando un sustrato de fácil obtención en el mercado local (hidrolizado de maíz), suplementado con urea, glucosa y diversas sales. Dicho proceso involucra un estudio de factibilidad acerca de la obtención de la cepa de levadura de mayor rendimiento, preparación del sustrato y condiciones óptimas fermentativas. El rendimiento de la producción fue de 0.56-0.63 gramos de ácido cítrico/ gramo de glucosa

Palabras Claves:

Ácido cítrico, levadura mutada, melaza, fermentación

Summary:

Corn hydrolysate is used as the constituent of a medium for the formation of citric acid by mutated *candida* sp. The fermentation medium

Universidad Nacional de Lanús, Carrera Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Av. 29 de Septiembre 3901, 1826 Lanús, Provincia de Buenos Aires, Argentina, E-mail: mgiraud@unla.edu.ar

was supplemented with urea, as nitrogen source, glucose and different salts. The mutated strain produced significantly more citric acid than other non-mutated strains. Based in previous experiments the citric acid production was issued in a 5 liters batch fermenter. Citric acid yields ranged from 0.56-0.63 grams of citric acid / gram glucose.

Key Words:

Citric acid, mutated yeast, molasse, fermentation

Introducción:

El ácido cítrico (AC) es uno de los aditivos (commodity) más usados en la industria alimenticia como acidulante, conservante y antioxidante. Sus usos se detallan en la TABLA I, pág 30 (SAGPyA 2004). Además en Argentina, tiene importantes usos en la industria farmacéutica y química, ya sea como agente de limpieza y de formación de complejos, siendo su consumo:

- ▣ Alimentos y bebidas: 7954Ttn
- ▣ Ind. Farmacéutica y Cosmética 1152tn
- ▣ Detergentes 1268tn
- ▣ Otros 6626tn

En la actualidad, más de 800.000tn/año se producen en el

mundo, con una tendencia al incremento del 5-8% anual, siendo los grandes productores la Unión Europea, China y los Estados Unidos.

En Sudamérica hay plantas en Brasil y Colombia, que lo están produciendo a partir de melazas diversas, mientras que Argentina solo lo importa (17.000tn en 2004), fundamentalmente de Brasil a un precio aproximado de 0,62U\$/Kg (FOB) y 0,74U\$/Kg (CIF) (INDEC, 2004).

Con respecto a su obtención, la primera referencia la encontramos en 1917 usando diferentes hongos. Desde 1966 a partir de levaduras. Ver TABLA II, pág. 30.

Desde hace 40 años se ha estudiado mucho el proceso de producción de AC por las levaduras: se sabe que éste se forma cuando cesa el crecimiento reproductivo, lo que es causado en general cuando disminuye el nitrógeno en el medio de fermentación (Behrens,1987), siendo glucosa el mejor sustrato a usar (Stottmeister 1992), (Anastassiadis 1993, 1994).

Con respecto al efecto de las vitaminas, se ha estudiado la acción de la B₁ (Lozinov 1982)

También se sabe que el exceso de nitrógeno produce ácido propiónico y alfa-cetoglutárico en vez de AC (Li 2000).

Objetivos:

- ▣ Desarrollar un trabajo experimental con levaduras, para finalmente efectuar un escalamiento.
- ▣ Determinar las condiciones fermentativas (minerales, vitaminas, nitrógeno, etc) en un proceso por lotes.
- ▣ Elegir maíz como materia prima por su costo y por su efecto sobre el color del hidrolizado.
- ▣ Estudiar otros parámetros que son fundamentales tales como: pH, temperatura, caudal de aire a incorporar, velocidad y tipo de agitación.
- ▣ Desarrollar un proceso de recuperación que no use yeso / ácido sulfúrico o solventes.

Materiales y métodos:

1. Microorganismo y condiciones del cultivo:

La levadura mutada de *Torula candida* (Producción Nacional 1970) debe producir más cantidad de ácido cítrico, para que acumule una concentración del ácido aproximadamente 7 veces mayor que otras cepas no mutadas (Gutiérrez 1993, Avchieva 1993).

Partiendo de cepas liofilizadas, se hacen las diluciones correspondientes en agua estéril, para obtener una concentración final de aproximadamente $10^7 - 10^8$ UFC/ml y se siembra en placas de Petri con agar-papa de modo de obtener las colonias aisladas. De la placa de Petri se selecciona una colonia de tamaño intermedio porque morfológicamente son las más estables. Se levanta la misma y se lleva a tubo con agar papa en pico de flauta. Una vez desarrollada convenientemente, es transportada con agua estéril a un Erlenmeyer con el medio preparado para el crecimiento celular. Finalmente

dicho cultivo va al fermentador piloto de 5 L (ensayos por duplicado).

El AC producido es identificado y valorado por electroforesis capilar. Se usó un equipo Hewlett Packard y el método fue indirecto por desorción del analito en un buffer coloreado, siendo las condiciones operativas: 20Kv, el buffer fue ácido piridindicarboxílico conteniendo bromuro de cetiltrimetilamonio, el capilar de 75 mm de diámetro interno con una largo de 50 cm (41.5 cm hasta el detector), pH de corrida 5.6, longitud de onda del trabajo de 350 nm y longitud de onda de referencia 215 nm (método desarrollado en UNLa).

2. Germinación de la levadura

Para llevar a cabo este proceso se partió de un germinador de 2.4 Litros conteniendo

Glucosa	168 gr.
Macerado de maíz comercial	36 gr.
Carbonato de Calcio	4,8 gr.
Urea	6 gr.
Fosfato disódico	0,0625 % p/v
Sulfato de Magnesio	0,042% p/v
Heptahidratado	
Agua c.s.p.	2,4 litros
pH	5,25

Hacemos notar que el macerado de maíz comercial es el producto obtenido de la molienda húmeda del grano. El pH fue ajustado a dicho valor con carbonato de calcio en polvo fino. Una vez preparado el medio, se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente se procedió a la inoculación de la levadura y se colocó el germinador a 26°C con agitación continua y en condiciones de aerobiosis mediante la inyección de aire. Cuando hay agitación mecánica se recomienda 0,25L de aire/litro de caldo-minuto. Durante el periodo de germinación se controló la cantidad de glucosa (usando en método de Fehling Causse Bonnans) y el pH, los que al cabo de 48 hs. alcanzaron valores de

0,5 % de glucosa (pasó de 7 % a 0,5 %), un pH de 3,0 y una concentración de 10^{10} UFC/ ml. (Por dilución y recuento en placa)

3. Sustrato a fermentar: Obtención de hidrolizado de harina de maíz:

El proceso de hidrólisis consiste en un empaste de la harina con agua con el agregado de la enzima α -amilasa termo resistente de origen bacteriano producida ya sea por *Bacillus licheniformis* o por *Bacillus amyloliquefaciens* (*Genencor Spezyme*)

Se ajustó el pH a 5,8 y se llevó el empaste a una temperatura de 100-105 °C durante 15 minutos. Concluido este paso se enfrió llevando a una temperatura de unos 40°C, ajustando nuevamente el pH a un valor de 4,5 con ácido clorhídrico diluido. Se agregó la enzima amiloglucosidasa de origen fúngico (producida por *Aspergillus niger* *Genencor Optidex*) y se llevó la temperatura hasta 58°C durante 72 horas.

Material utilizado

Harina de maíz	2,170 kg.
Agua c.s.p	6,750 L
α -amilasa (0,04 a 0,08 % p/p) (<i>Genencor 2002</i>)	1,25 g.
Amiloglucosidasa (0,29 a 0,88 L/ Ton.) (<i>Genencor 2002</i>)	1,00 ml.

Pasadas las 72 horas se procedió a filtrar el producto usando malla de poliéster de aproximadamente 10 micrones de diámetro de partícula. Se obtuvo un volumen de 3,1 L de solución de glucosa con una concentración de 24% p/v. Las enzimas agregadas se eliminaron durante la esterilización de los destiladores usados (121°C, 15min, 1 atm)

4. Producción de ácido cítrico

Para ello se preparó un fermentador con las mismas características del

germinador descrito anteriormente, modificando solo el contenido de glucosa (se trabajó al 16 %) y un flujo de aire 5 veces mayor al del germinador para obtener una buena aerobiosis.

El periodo de fermentación se prolongó por 72 horas durante el cual se controló el consumo de glucosa.

Pasado este tiempo se encontró un remanente de glucosa de 0.5 % y un pH de 2.1. Allí se dio por terminada la fermentación. Hacemos notar que siempre es conveniente interrumpir la misma con un remanente de glucosa para poder evitar la lisis de la levadura. Si esto ocurriera, se dificultaría el filtra-

do del caldo de fermentación y la cristalización del AC por las impurezas liberadas en la lisis.

5. Recuperación del AC:

Se siguió el siguiente procedimiento:

Pasteurización (80°C durante 15 minutos) del medio de cultivo para coagular las proteínas y así facilitar el proceso de filtrado,

Filtrado por Kitasato al vacío con papel de filtro SS Banda Negra,

Refrigerado a 4°C y decantado de las proteínas solubles en caliente,

Filtrado,

Neutralización, con Hidróxido de calcio, hasta pH de 6 y a 50°C para obtener citrato de calcio dihidratado insoluble,

Filtrado y lavado de los cristales con agua a 70°C.

Se realizó el trabajo de investigación hasta este punto y el producto obtenido fue analizado adecuadamente.

El próximo proyecto de investigación será desarrollar un proceso de recuperación sin ácido sulfúrico/yeso y sin solvente, con columnas de intercambio de iones y/o ultrafiltraciones.

Resultados y Discusión:

A partir de 1,2 Kg de glucosa se obtuvo 0,95 – 1.05 Kg de Citrato de Calcio dihidratado (n=10), lo que equivale a 0,56-0,63 g. de ácido cítrico por g. de glucosa. Los valores de la bibliografía internacional (Rane 1995, 2003, Crolla 2004) para *Candida sp* están entre 0,28-0,82 g. de ácido cítrico por g. de glucosa y, usando un reactor *batch*, entre 0,45-0,59 g. de ácido cítrico por g. de glucosa. Mediante Electroforesis Capilar de Zona se determinó la pureza de dicha sal (datos no mostrados) encontrándose un pico puro de citrato en el electroferograma a 2.3 minutos (correspondió a un 65% de citrato). Por absorción atómica se determinó el calcio presente cuyo valor fue 22.5%. El contenido de agua de la sal obtenida fue de 7,6 %, todo ello coincidente con el FCC 2004 y que nos llevó a decidir que la sal cristalizada es citrato de calcio con 2 moléculas de agua, con un rinde promedio del 92,2%.

CONCLUSIONES:

- ▣ En el ensayo realizado en laboratorio se obtuvo citrato de calcio dihidratado de una alta pureza (el

TABLA I

Sector	Uso
Bebidas	Saborizante y regulador del pH; incrementa la efectividad de los conservantes antimicrobianos.
Dulces y Conservas	Acidulante y regulador del pH para lograr una óptima gelificación.
Caramelos	Acidulante y regulador del pH con el objetivo de alcanzar la máxima dureza de los geles.
Verduras Procesadas	En combinación con ácido ascórbico, previene la oxidación.
Alimentos Congelados	Ayuda a la acción de los antioxidantes; inactiva enzimas previniendo pardeamientos indeseables; inhibe el deterioro del flavor y el color.
Frutas y Hortalizas Enlatadas	Disminuye el pH; al actuar como quelante, previene la oxidación enzimática y la degradación del color; resalta el sabor.
Aceites y Grasas	Previene la oxidación
Confitería y Repostería	Se utiliza como Acidulante, resaltador de sabores y para optimizar las características de los geles
Quesos Pasteurizados y Procesados	Emulsionante y texturizante, en su forma sódica
Lácteos	Estabilizante en cremas batidas
Productos de la Pesca	Usado para disminuir el pH en presencia de otros conservantes o antioxidantes
Carnes	Se utiliza como auxiliar del procesado y modificador de textura

TABLA II

Microorganismo	Materia Prima	Recuperación	Ventajas	Desventajas	Ref
<i>Aspergillus niger</i>	Melaza	Cal y ácido sulfúrico	Primer fermentación sumergida	Horas de fermentación. Recuperación de la solución.	Vicente (1970)
<i>Aspergillus niger</i>	Jugo de caña concentrado	Solvente	Mejor rendimiento de recuperación	Grandes volúmenes de solvente. Diseño de planta especial	Crolla 2004 (a)
<i>Candida lipolytica</i>	Parafina	Cal y ácido sulfúrico	Velocidad de fermentación 60/70 hs, mejor rendimiento	Costos de las parafinas. Temperaturas de fermentación. Yeso y levaduras	Crolla 2004 (b)
<i>Candida lipolytica</i>	Parafina	Solvente + ácido sulfúrico	Velocidad de fermentación 60/70 hs, mejor rendimiento	Costos de las parafinas. Temperaturas de fermentación. Yeso y levaduras. Planta antiexplosiva	Crolla 2001 (c)
<i>Candida lipolytica</i>	Grasas y aceites	Cal y ácido sulfúrico	Velocidad de fermentación 90 hs	Costos de aceites. Fermentaciones con dificultad por formación de espumas (jabones). Yeso y levadura.	Kamzolo va 2005
<i>Candida guilliermondii</i>	Melaza	Cal y ácido sulfúrico	Velocidad de fermentación 80 hs, no tratamiento de melaza	Yeso y efluentes	Tisnadja ja 1996
<i>Candida guilliermondii</i>	Hidrolizado de maíz	Solvente	Velocidad de fermentación 80 hs, no yeso	Tratamiento de hidrolizado de maíz y planta antiexplosiva	Krasikov a 1996
<i>Torulla candida</i>	Melaza	Cal y ácido sulfúrico	Velocidad de fermentación 80 hs	Yeso y efluentes	UNLa 2005
<i>Candida guilliermondii</i>	Melaza	Cal y ácido sulfúrico	Velocidad de fermentación 80hs	Yeso y efluentes	Producción Nacional (1970)

65% comparado con el teórico del 70,7% para el citrato). Este hecho confirma que la materia prima elegida (hidrolizado de almidón de maíz como fuente de hidratos de carbono) y el microorganismo utilizado son los adecuados. De todos modos buscaremos mejorar el rendimiento de glucosa a ácido cítrico estudiando mas a fondo el balance de nitrógeno / azúcar.

- ▣ Los microorganismos utilizados son factibles de reproducir fácilmente y de conservarlos liofilizados.
- ▣ El rendimiento obtenido fue óptimo con relación a la bibliografía internacional consultada.
- ▣ Las condiciones experimentales de la fermentación son fáciles de reproducir, de modo que es muy fácil encarar en el futuro un escalamiento.

Agradecemos la colaboración de Vanina Reneé Mora y Juan Menéndez, personal de la Universidad Nacional de Lanús, Carrera de Alimentos.

Bibliografía:

(1). Anastassiadis S., «Determination of organic acids, especially citric acid and isocitric acid, in fermentation solutions and fruit juices». In: *HPLC Applications (1993)*, Applications N°8. Macherey-Nagel, Düren, Alemania, p4

(2). Anastassiadis S., «Kontinuierliche Fermentation von Glucon und Citronensäure mit hefeähnlichen Pilzen und Hefen». PhD Thesis, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, and Research Center Jülich GmbH (KFA), Alemania (1994)

(3). Avchieva P., Vinarov A., «Obtaining citric acid producing mutants of the yeast *Candida lipolytica*, Microbiology AIBS, 62, 161-165 (1993)

(4). Behrens U., Thiersch A., Weissbrodt E., «Particularities in the kinetics of growth and citric acid accumulation by *Saccharomycopsis lipolytica*», *Acta Biotechnol.*, 7, 179-183 (1987)

(5). Crolla A., Kennedy K.,: (a) «In line mixing for production of citric and by *Candida lipolytica* grown on n-paraffins», *J. Chem Technol. and Biotechnol.* 79, 720-728 (2004)

(6). Crolla A., Kennedy K.,: (b) «Feed batch production of citric acid by *Candida lipolytica* grown on n-paraffins» *J. Biotechnol* , 110, 73-84 (2004)

(7). Crolla A., Kennedy K.,: (c) «Optimization of citric acid production from *Candida lipolytica* Y-1095 using n-paraffin» *J. Biotechnol*, 89, 27-40 (2001)

(8). FCC (Food Chemicals Codex), 5ª ed, 2004

(9). Genencor International, «Spezyme Fred» Rev 0301 (2002)

(10). Genencor International, «Optidex L-400» Rev 0901 (2002)

(11). Gutierrez N., Maddox I., «Evidence that impaired citrate transport into the cell is a contributory factor to extracellular citrate accumulation by strain of *Candida guilliermondii*». *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39, 604-608 (1993)

(12). INDEC, Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, «Índice Nacional de Estadística y Censos», (2004), Min. Economía R.A.

(13). Kamzolova S., Morgunov I., Aurich A., «Lipase secretion and citric acid production in *Yarrowia lipolytica*», *Food Technol and Biotechnol*, 43, 113-122 (2005)

(14). Krasikova N., L'vova E., Galkin A., «Rapid microbiological control of citric acid production in yeast infection», *App. Biochem. Microbiol*, 32, 291-295 (1996)

(15). Li Y., Chen J., Liang D., «Effect of nitrogen source and nitrogen concentration on the production of pyruvate by *Turulopsis glabrata*. *J Biotechnol* 81:27-34 (2000)

(16). Lozinov A., Finogenova T., «Einfluß der Limitation des Wachstums von Hefen auf den oxidativen Stoffwechsel und die produktsynthese. *Acta Biotechnol* 2:317-324 (1982)

(17). Rane K., Simsk, «Enzyme and microbial technol.», 15, pp. 646-651 (1993).

(18). Rane K., «Disertation abstracts int.», Thesis publ., 55, 3657 (1995).

(19). Stottmeister U., Hoppe K., «Organische Genußsäuren». In: Ruttloff H (ed) *Lebensmittelbiotechnologie, Entwicklungen und Aspekte*, 1ª edn. Akademie Verlag, Berlin, pp 516-547 Wedy M (1991)

(20). SAGPyA, Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, Ministerio de Economía y Producción, Dirección de Industria Alimentaria, Ministerio de Economía, República Argentina. (2004)

(21). Tisnadajaja D., Gutierrez N., Maddox I., «Citric and production in a bubble-column reactor using cells of the yeast *Candida guilliermondii* immobilized by adsorption onto jawdust». *Enzyme and Microbial Technol.*, 19, 343-347 (1996)

(22). Vicente F., «Comunicación personal. Desarrollado en la industria en 1970 y trabajada actualmente en la cátedra de fermentaciones industriales de la UNLa» (1970)

(23). Vicente F., «Experiencia desarrollada en la industria nacional (1976)

(24). UNLa, Universidad Nacional de Lanús. «Producción Experimental. Trabajo no publicado. (2005)

Miguel Ángel Giraudo: Es Especialista en Tecnología de Alimentos (Universidad Tecnológica Nacional 2002) Bioquímico (Universidad Católica de Córdoba 1967). Profesor Asociado Concursado de Química Analítica (Universidad Nacional de Lanús desde 1999). Director de la Carrera de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (Universidad Nacional de Lanús desde 1997). Su principal línea de trabajo es la ciencia de los alimentos.