



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA

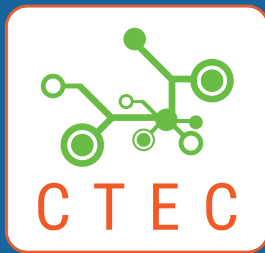
VICERRECTORADO ACADÉMICO

DIRECCIÓN DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES

MEMORIA DE ARTÍCULOS

DOMINIO 1

PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS



**I Congreso Internacional de Ciencia
y Tecnología UTMACH 2015**





I CONGRESO INTERNACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA UTMACH 2015

Memoria de Artículos

centro_de_investigaciones@utmachala.edu.ec



OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE PULPA DE BANANO MADURO, UTILIZANDO EL HONGO ASPERGILLUS NIGER

Carmen Silverio Calderón¹; *Humberto Ayala Armijos².

Universidad Técnica de Machala ¹

Instituto Alberto Castro Pereira de Machala ²

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue la obtención de ácido cítrico a partir de pulpa de banano maduro, utilizando el hongo *Aspergillus niger* para la bioconversión de los azúcares reductores (glucosa y fructosa) en ácido cítrico. La fermentación ácida se la realizó inoculando el hongo en dos concentraciones diferentes (2 y 3 g/L) en el sustrato formado por pulpa de banano maduro (40 % y 50 %). La concentración de ácido cítrico se la determinó utilizando el método de Polivinil polipinolidona (PVPP) mediante espectrofotometría UV-Visible, alcanzando en el tratamiento D (3 g/L de inóculo y 50 % de pulpa de banano) el valor de 21,12 g/L al utilizar 150 g/L de azúcar reductores (50 %) provenientes de la pulpa de banano maduro, a 168 horas de cumplir el proceso fermentativo. La disminución del pH (4,5 – 3,2) es un factor que indica la transformación de la glucosa en ácido cítrico.

Palabras clave: Ácido cítrico, *aspergillus niger*, azúcares reductores, hidrólisis, inóculo.

ABSTRACT

The aim of this research was to obtain citric acid from ripe banana pulp, using the fungus *Aspergillus Niger* for bioconversion of reducing sugars (glucose and fructose) in citric acid. The acid fermentation is performed by inoculating the fungus in two different concentrations (2 and 3 g / L), in the substrate formed of ripe banana pulp in two concentrations (40% and 50%). The citric acid concentration is determined using the method Polyvinyl polipinolidona (PVPP) by UV-Visible spectrophotometry, reaching in treatment D (3 g / L and 50% inoculum banana pulp) value of 21.12 g / L, using 150 g / L of reducing sugar (50%) from the pulp of ripe banana, at 168 hours of fermentation. Decreasing pH (4,5 to 3,2) is a factor indicating the transformation of glucose citric acid.

Keywords: Citric acid, *aspergillus niger*, reducing sugars, hydrolysis, inoculum.

INTRODUCCIÓN

El ácido cítrico es un compuesto orgánico conocido como una sustancia natural de las plantas desde finales del siglo XIX, y desde 1893 los científicos descubrieron que es producido por hongos filamentosos. En 1923 se inició la primera fermentación práctica para la producción de este ácido orgánico utilizando microorganismos que crecían sobre la superficie de los cultivos de frutas cítricas.

En la actualidad el uso de hongos para la obtención de importantes metabolitos de interés industrial ha aumentado considerablemente, instaurando un marco en el cual el ácido cítrico se ha posicionado como el mayor ácido orgánico producido por fermentación con el hongo *Aspergillus niger*, el cual es ampliamente usado en la industria de alimentos, bebidas, farmacéutica, química, entre otras.

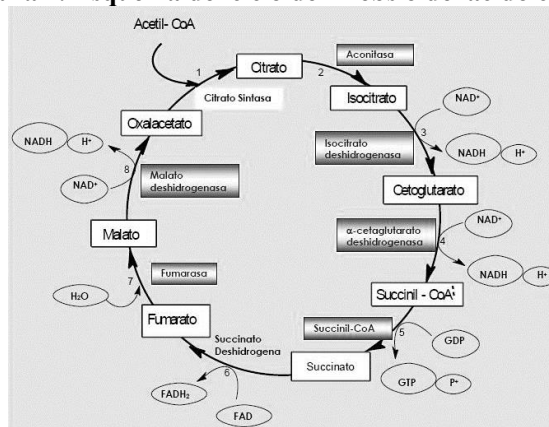
Los microorganismos capaces de producir y acumular ácido cítrico son las especies de los géneros *Aspergillus*, *Citromyces*, *Penicillium*, *Monilia*, *Candida* y *Pichia*, aunque para la producción comercial sólo se utilizan mutantes de *Aspergillus niger*. Comparados con las cepas de *Penicillium*, los *Aspergillus* producen más ácido por unidad de tiempo, debido a que presentan baja actividad de las enzimas isocitrato deshidrogenasa y aconitasa hidratasa, y una alta actividad de citrato sintetasa. Las anteriores constituyen ventajas importantes si se toma en cuenta que además la formación de productos laterales no deseados como ácido oxálico, ácido isocítrico y ácido glucónico puede ser fácilmente suprimida en estos mutantes.

El Ciclo de Krebs o del ácido Cítrico (ácidos tricarbónicos) es la vía central de metabolismo aeróbico presente en todas las células aerobias, es decir, las que utilizan oxígeno como aceptor final de electrones en la respiración celular, en esta vía se oxidan los compuestos de carbono que proviene de la degradación de todos los principios inmediatos y también se forman moléculas precursoras para la síntesis de muchos de ellos.

En la Figura 1, se presenta el esquema completo del ciclo en su forma actual, que es esencialmente igual a la propuesta por Krebs, y a continuación se discuten las reacciones individuales.

En cuanto a la producción de ácido cítrico, el pH inicial requerido depende de la fuente de carbono utilizada, ya que los hongos filamentosos *Aspergillus niger* acumulan altas concentraciones de ácido cítrico a partir de hexosas o disacáridos cuando es cultivado bajo condiciones particulares. Cabe mencionar que el banano en estado maduro es un fruto rico en carbohidratos.

Figura 1. Esquema del ciclo de Krebs o del ácido cítrico



Fuente: (Mathews & Van-Holde, 1999)

En la presente investigación se empleó como sustrato la pulpa de banano maduro para el proceso de fermentación tipo "Bach", utilizando como agente fermentador el hongo *Aspergillus niger*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población

El objeto de estudio fueron 10 kilogramos de bananos maduros que no cumplieron con los estándares de calidad para la exportación, conocidos en nuestro medio como banano rechazo.

Diseño Experimental para la obtención del Ácido Cítrico

El diseño de la investigación será de carácter descriptivo (describe situaciones porque observamos y definimos el tratamiento que resulte estadísticamente significativo en la producción del ácido cítrico y experimental (Se realizará cuatro crecimientos, correspondientes a un diseño experimental completamente al azar, resultantes de considerar dos factores [Concentración de sustrato y concentración del inóculo]).

El modelo estadístico será un experimento factorial

Tabla 1. Diseño factorial para la obtención del ácido cítrico

Factor A (Sustrato)	Factor B (Inóculo)	
	B ₁ (2 gr/L)	B ₂ (3 gr/L)
A ₁ (40 %)	A ₁ *B ₁	A ₁ *B ₂
A ₂ (50 %)	A ₂ *B ₁	A ₂ *B ₂

Elaboración propia: Silverio y col (2014)

2 x 2 completamente al azar en condiciones de concentración de sustrato y concentración del inóculo, en donde por cada factor se multiplica los dos niveles a evaluar dando así un total de 4 tratamientos.

Obtención del Inóculo

Con la ayuda de la tasa bacteriológica, se siembra el hongo *Aspergillus niger*, obtenido de naranjas en descomposición en un caja Petri que contenga agar sabouraud con cloranfenicol 20 µg/ml, previamente esterilizado con calor húmero (15 psi/ 121 °C/ 15 minutos), y se deja crecer durante aproximadamente 5 días a temperatura ambiente (30 °C). Paralelamente y esterilizado bajo las mismas condiciones se prepara un medio de cultivo líquido que por su composición permita el crecimiento miceliar. Para lograr la adaptación del hongo se utiliza un Erlenmeyer de 500 mililitros en el que se prepara un volumen final de 100 mililitros (pH: 2) que incluye: sacarosa: 19 gramos, nitrato de amonio: 230 mg.

Procedimiento para la Obtención del Ácido Cítrico por Medio de *Aspergillus niger*

Preparación del sustrato (banano maduro)

El objetivo de esta primera etapa del proceso es la purificación del jarabe. Se inicia mezclando el jarabe con agua para diluirlo; una vez diluido se pasa por un filtro de vacío para eliminar los sólidos suspendidos y las impurezas del banano maduro. El jarabe fue sometido a un proceso de pasteurización que consiste en elevar la temperatura a 105°C durante tres minutos y bajarla nuevamente hasta 37°C, mediante la utilización de agua helada hasta que el medio llegue a temperatura ambiente (Austin, 1983).

Fermentación

Una vez pasteurizado el jarabe, es colocado en el fermentador de 2 litros de capacidad, en donde se

lleva a cabo la transformación de los azúcares reductores en ácido cítrico por medio del hongo *Aspergillus niger* (Carvajall, 1993).

El aire estéril se burbujea dentro del fermentador para ayudar al proceso de bioconversión de hacer burbujear aire estéril. Luego de la fermentación, el flujo es pasado por un filtro para separar el micelio. La masa conformada por el micelio y el microorganismo muerto se denomina biomasa o torta y constituye un subproducto o un efluente del proceso. (Austin, 1983).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Evaluación del pH de la solución de banano maduro utilizado como sustrato para el crecimiento del hongo *Aspergillus niger*

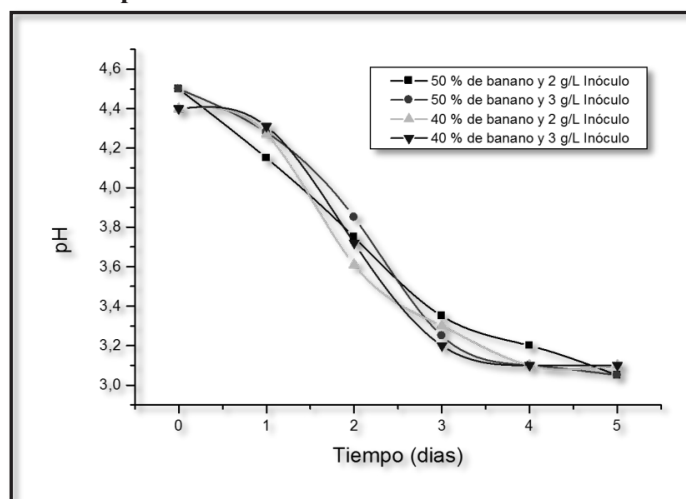
A continuación en la figura 2 se muestran los resultados del comportamiento del pH durante los 6 días de fermentación.

Como podemos apreciar, en la figura 2 la disminución del valor de pH ocurre en los cuatro (4) experimentos estudiados. En los tratamientos A y B (50 % de banano y 2 g/L de Inóculo; 50 % de banano y 3 g/L de Inóculo) el valor decae desde 4,45 hasta 3 y en los tratamientos C y D (40 % de banano y 2 g/L de Inóculo; 40 % de banano y 3 g/L de Inóculo) desciende de 4,4 hasta 3,2, evidenciándose la producción de ácido cítrico en las soluciones.

Evaluación del Oxígeno Disuelto

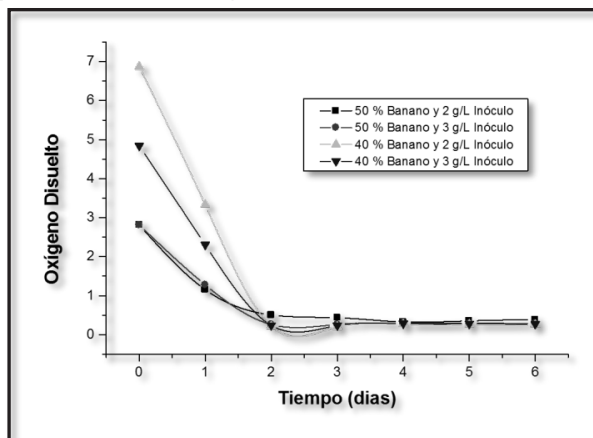
Para el crecimiento del hongo *Aspergillus niger* es necesario la incorporación de oxígeno mediante agitación para asegurar el suministro de aire, el mismo que favorece la excreción de las enzimas glucosa oxidasa (GOD) y catalasa (CAT); a temperaturas entre 25 y 35°C; y los valores de pH entre 5 y 7.

Figura 2. Comportamiento del PH durante los 6 días de fermentación



Elaboración propia: Silverio y col (2014)

Figura 3. Comportamiento del oxígeno disuelto durante los 6 días de fermentación



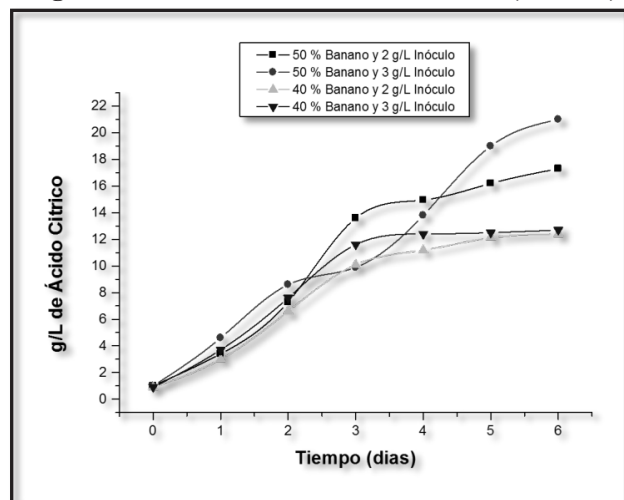
Elaboración propia: Silverio y col (2014)

Como podemos apreciar en la figura 3, la concentración de oxígeno disuelto disminuye a partir de la inoculación del hongo *Aspergillus niger*, evidenciándose el crecimiento del hongo desde el primer día de fermentación aerobia de la solución de banano maduro a 50 y 40 % y una concentración de inóculo de 2 y 3 g/L, por lo cual fue necesaria la incorporación de oxígeno mediante agitación mecánica (1 min/hora a 120 rpm). La formación de ácido cítrico es un fenómeno de oxidación y por lo tanto nunca debe faltar el oxígeno; se debe lograr una incorporación de 100 mg de O₂ por litro y por minuto.

Evaluación del ácido cítrico obtenido en los cuatro experimentos estudiados

La producción de ácido cítrico se consigue utilizando *Aspergillus niger*, en soluciones con altas concentraciones de azúcares reductores (glucosa y fructosa).

A continuación en la figura 4 se muestran los resultados de las concentraciones de ácido cítrico obtenidos en los cuatro experimentos.

Figura 4. Concentración de ácido cítrico (C₆H₈O₇)

Elaboración propia: Silverio y col (2014)

Los valores obtenidos en la presente investigación (21,12 g/L de ácido cítrico) en el experimento B (50 % de banano y 3 g/L de Inóculo) se los considera altos en relación a los reportados, en el cual obtuvieron 13,5 g/L de ácido cítrico utilizando banano.

Sin embargo, una mayor cantidad de ácido podría llegar a degradar sustancias que mejoran la producción de ácido cítrico en la etapa fermentativa, como es el caso de la riboflavina y la tiamina (Yigitoglu, 1992).

Evaluación de la Concentración de Azúcares Reductores (Glucosa y Fructosa)

Se utilizaron concentraciones en el sustrato de banano maduro de 150 y 120 g/L de azúcares reductores, con el fin de evaluar la influencia de este factor sobre la producción de ácido cítrico y el crecimiento del hongo *Aspergillus niger*. A continuación en la figura 5 se muestran los resultados de la disminución de los azúcares reductores presentes en sustrato.

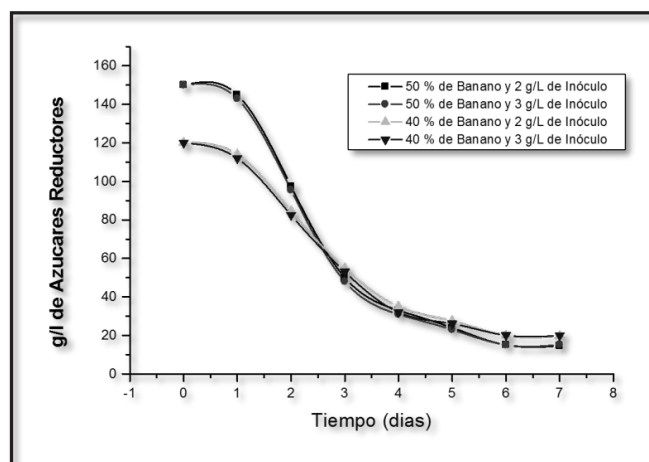
La concentración de azúcares reductores al inicio de la fermentación tiene un mínimo descenso, debido a la compensación de estos por la hidrólisis de polisacáridos que realiza el *Aspergillus niger*, obteniéndose glucosa y fructosa que son la fuente de carbono consumidos por el hongo.

A partir del día cero (0) hasta el final del proceso de fermentación, la concentración de azúcares reductores comienza a disminuir, evidenciando que el hongo comienza a consumir los azúcares reductores para producir ácido cítrico.

Análisis estadístico de la formación total de ácido cítrico

El análisis estadístico del experimento nos permitió optimizar el proceso de obtención de ácido cítrico, mediante la variación de la concentración de pulpa de banano maduro en el medio de cultivo utilizado

Figura 5: Reducción de los azúcares reductores durante la fermentación ácida



Elaboración propia: Silverio y col (2014)

Tabla 2. Análisis de varianza del experimento

Fuente	Media	Varianza	N
T A= 50 % banano y 2g/L de Inóculo	14,12	0,06	3
T B= 50 % banano y 3g/L de Inóculo	21,12	0,08	3
T C= 40 % banano y 2g/L de Inóculo	12,53	0,21	3
T D= 40 % banano y 3g/L de Inóculo	13,12	0,14	3
F = 379,56022			
p = 5,814E ⁻⁹			

Elaboración propia: Silverio y col (2014)

para inocular dos concentraciones diferentes de inóculo (*Aspergillus niger*). A continuación en la tabla 2 se muestra el análisis de varianza del experimento.

Como podemos apreciar en la tabla 2 como era de esperarse si existen diferencias significativas ($p < 0,05$) en el proceso de obtención de ácido.

Con un nivel de confianza del 95 %, el tratamiento B (50 % banano y 3 g/L de inóculo) fue el que alcanzó la mayor concentración de ácido (21,12 g/L), evidenciándose que existe interacción entre la concentración de pulpa de banano e inóculo. A mayor concentración de pulpa e inóculo, mayor concentración de ácido obtenido.

CONCLUSIONES

1. Se ha determinado que la disminución de pH es indicador del desarrollo de la transformación de glucosa en ácido cítrico el cual disminuye en los cuatro (4) experimentos estudiados, en los tratamientos A y B (50 % de banano y 2 g/L de Inóculo; 50 % de banano y 3 g/L de Inóculo) el valor decae desde 4,45 hasta 3 y en los tratamientos C y D (40 % de banano y 2 g/L de Inóculo; 40 % de banano y 3 g/L de Inóculo) desciende de 4,4 hasta 3,2, evidenciándose la producción de ácido cítrico en las soluciones.

2. La concentración de oxígeno disuelto (mg/L OD) en el medio de cultivo disminuye a partir de la inoculación del hongo *Aspergillus niger*, evidenciándose el crecimiento del hongo desde el primer día de fermentación aerobia de la solución de banano maduro a 50 y 40 % y una concentración de inóculo de 2 y 3 g/L, por lo cual fue necesaria la incorporación de oxígeno mediante agitación mecánica (1min/hora a 120 rpm).
3. Mediante la utilización del espectrofotómetro UV-Visible se determinó que la máxima concentración de ácido cítrico fue de 21,12 g/L, utilizando 150 g/L de azúcar reductores (50 % de pulpa de banano maduro) provenientes de la pulpa de banano maduro, a las 168 horas del proceso fermentativo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ates, S., Dingil, N. & Mehmetoglu, U. (2002). "Enhancement of citric acid production by immobilized and freely suspended *Aspergillus niger* using silicone oil. *Process Biochemistry*, 433-436.
- Austin, G. (1983). *Shreve'S Chemical Process Industries*. NEW YORK: MC-

GRAW-HILL.

- Carvajall. (1993). Diseño de un proceso de filtrado de citrato tricalcico. Cali, Colombia.
- López, C. A., Zuluaga, A., Herrera, S., Ruiz, A. y Medina, V. (2006). Producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger* NRRL 2270 a partir de suero de leche, 39-57.
- Mathews & Van-Holde (1999). Bioquímica. Editorial McGraw Hill- Interamericana
- Yigitoglu, M. 1992. Production of acid citric by fungi. Journal of Islamic Academy of Science. Vol. 5, No 2, 100-106.