

300627
6

2er



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE LOS MÉTODOS DE OBTENCIÓN
DE ÁCIDO MÁLICO

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

ROSA MARÍA BELLO CASTRO

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

1988



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.

INDICE

	PAGINA
CAPITULO I.-	<u>INTRODUCCION</u> 1
CAPITULO II.-	<u>GENERALIDADES</u> 4
	1) HISTORIA..... 5
	2) ABUNDANCIA..... 6
	3) PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS..... 7
	3.1) Propiedades Fisicas..... 9
	3.2) Propiedades Quimicas..... 10
	3.3) Reactividad del Acido Malico.... 12
	3.4) Reacciones de Obtencion..... 23
	4) PROPIEDADES ALIMENTICIAS..... 24
	5) BIOSINTESIS Y TOXICOLOGIA..... 26
	6) METODOS DE ANALISIS
	6.1) Cualitativo..... 28
	6.2) Cuantitativo..... 29
	6.3) Biologico..... 37
	6.4) Gravimétrico..... 37
CAPITULO III.-	<u>METODOS DE OBTENCION</u> 39
	OBTENCION:
	1) NATURAL DE FRUTOS..... 41

2) QUIMICA A NIVEL LABORATORIO.....	42
3) INDUSTRIAL (Quimica-Sintetica).....	44
4) POR BIOSINTESIS MICROBIANA.....	48
4.1) Enzimática por Inmovilización de Células.....	50
4.2) Fermentativa.....	67

CAPITULO IV.-

USOS

1) ALIMENTOS	
1.1) Condimentos.....	71
1.2) Dulces.....	72
1.3) Frutas y Vegetales.....	74
1.4) Aceites y Grasas.....	75
1.5) Estabilidad del Color.....	75
1.6) Bebidas.....	76
2) QUIMICA.....	78
3) METALURGIA.....	79
4) FARMACEUTICA.....	79

CAPITULO V.-

COMPARACION CON OTROS ACIDOS

1) COMPARACION CON OTROS ACIDOS.....	83
1.1) Sustitución de un ácido por otro	86
2) COMPARACION CON ACIDO CITRICO.....	90

CAPITULO VI.-	<u>CONCLUSIONES</u>	94
AFENDICE.-	<u>EXTRACTOS SOBRE METODOS DE OBTENCION</u> .	99
CAPITULO VII.-	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	100

CAPITULO I

INTRODUCCION

Debido al creciente uso de ácido málico en la industria de países como son Japón, Inglaterra, Canadá, Estados Unidos y México se hace necesario un estudio que permita analizar los procesos más utilizados en la elaboración de este producto.

Cabe señalar, también, la importancia que tienen otros ácidos tales como son el fumárico, adípico, succínico, cítrico, acético, tartárico, fosfórico y láctico dentro del sector industrial, cuyo uso es de vital importancia en alimentos.

En el presente trabajo se presentan los procesos físicos (R. Hangen 1974), químicos (K. Saito 1950) y biológico (Mc. Abee 1974) para la obtención de ácido málico siendo los más eficientes y productivos los dos últimos. Estos métodos proporcionan dos alternativas importantes para su fabricación.

Se proporcionan también propiedades y características del ácido málico.

En base a lo expuesto se realizó este trabajo teniendo como objetivos:

- a) Aportar la mayor información sobre el ácido málico con el fin de establecer criterios para el mejor uso el mismo.
- b) Proporcionar las bases para la producción a nivel industrial en nuestro país, ya que actualmente, en México, se carece de esta investigación y una planta productiva.

El ácido málico interviene en el ciclo de Krebs, en la síntesis del ácido glioxílico, mismo que juega un papel esencial en el metabolismo celular; siendo importante en los sistemas de oxidación, donde se obtiene energía para formar aminoácidos, proteínas y sus derivados. (14).

Es un ácido dicarboxílico que está presente en forma levógira, (L), en los sistemas biológicos. Es un ácido predominante en productos naturales, en frutas y vegetales, junto con otros ácidos como el tartárico, oxálico, succínico y cítrico.

Se encuentra libre o combinado en forma de sales de potasio, calcio, magnesio y sales orgánicas; en las raíces, los tallos, las hojas, las flores y los frutos de numerosas plantas. (22) (35).

CAPITULO II

GENERALIDADES

1) HISTORIA

El nombre del ácido málico proviene del latín malum (manzana) adjetivo que significa perteneciente a la manzana.

El ácido málico fue estudiado por primera vez por los siguientes investigadores:

SCHÉELE lo obtuvo por primera vez en 1785 de la manzana verde (no pudiendo prepararlo puro).

VON T. LIEBIG, en 1833, lo estudió detenidamente y lo analizó averiguando su composición.

PAUSTEUR, en 1852 obtuvo el ácido málico inactivo a partir de ácido aspártico.

KEMULE, lo obtuvo en 1861 del ácido bromosuccínico.

BREMER, preparó la forma dextrógira, por reducción de ácido dextrotartárico.

KREBS, en 1930 observó la actividad de los ácidos dicarboxílicos en tejidos animales. (4) (15) (49) (69)

2) ABUNDANCIA

Tabla II-1.- ABUNDANCIA DE LOS ACIDOS MALICO Y CITRICO

ALIMENTO	% ACIDO MALICO	% ACIDO CITRICO
Arándano	0.10	1.56
Apio	0.17	0.01
Brocoli	0.12	0.21
Col	0.10	0.14
Col rizada	0.05	0.35
Coliflor	0.39	0.21
Cereza	0.56	- 1.99
Cebolla	0.12	0.02
Ciruela	0.92	0.03
Calabaza	0.15	--
Espinaca	0.09	0.08
Frijol	0.17	0.65
Frambuesa	--	1.06
Fresa	0.16	1.08
Grosella	0.05	2.30
Chicharo	0.08	0.11
Higo	Trazas	0.34
Hongos	0.14	--
Limón	Trazas	3.84
Jugo de Limón	0.29	6.08
Lechuga	0.17	0.34
Mantana dif. tipos	0.10	- 1.02
Melocotón	0.37	0.03
Naranja	Trazas	0.78
Nabo	0.25	--
Plátano	0.37	0.32
Pepino	0.24	0.01
Pera	0.42	0.24
Piña	0.12	0.84
Papa	--	0.51
Remolacha	--	0.11
Ruibarbo	1.77	0.41
Sandía	0.20	--
Tomate	0.05	- 0.20
Toronja	0.08	1.33
Uva	0.65	--
Zanahoria	0.24	0.09
Zarzamora	0.16	Trazas

3) PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS

3.1) Propiedades Fisicas. (22) (39)

El acido málico forma cristales blancos, translucidos. El isomero levogiro y dextrógiro son las formas en que se encuentra. El acido se descompone al calentarlo a 180°C; es bastante estable y en condiciones de alta humedad es higroscópico; es un Acido orgánico fuerte, teniendo bajo PH en soluciones acuosas. A bajas concentraciones se tienen los siguientes valores de PH;

% ACIDO MALICO	PH
0.001	3.8
0.1	2.80
1.0	2.35

Las propiedades físicas se muestran en la tabla II-2.

Tabla II-2

PROPIEDADES FÍSICAS DEL ACIDO MALICO

Constante de ionización K ₁		4×10^{-4}
K ₂		9×10^{-6}
Solubilidad:		
Agua	5 °C	48 gramos/100 ml de solución
	25 °C	58 gramos/100 ml de solución
	75 °C	80 gramos/100 ml de solución
Etanol	25 °C	39.16 gramos/100 ml de solvente
Eter etílico	25 °C	1.41 gramos/100 ml de solvente
Cloroformo	25 °C	0.04 gramos/100 ml de solvente
Calor de combustión ΔH a 20 °C		- 320.1 kcal/mol
Calor de la solución		- 4.0 Kcal/mol soluto
Energía libre de formación estándar de la unión (ΔF grados), 25 °C		- 201.98 Kcal para sol. acuosa
Viscosidad (solución acuosa, 50% a 25 °C)		6.5 cpg
Índice de Amortiguación		3.26
Valores de pK pK ₁		3.4
pK ₂		5.0

Tabla II-3.- Densidad de Soluciones Acuosas

Concentración g/l	15	0
	d 15	8e
30	1.115	14.9
34	1.129	16.6
38	1.146	18.3
42	1.158	19.5
46	1.169	21.0
50	1.186	22.7
54	1.199	24.1
60	1.220	26.1

3.2) Propiedades Químicas.

El ácido málico pertenece a la familia química de los ácidos dicarboxílicos alifáticos. Se clasifica, también como un derivado hidroxilado del ácido succínico, como ácido dicarboxílico y ácido hidroxidicarboxílico.

Los nombres comunes que se asignan son:

Málico

Hidroxisuccínico

Hidroxiutanodioico

Hidroxí-1,2- etanodicarboxílico

Se encuentra en muchas plantas y zumos, en vegetales formando sales de potasio y calcio. (52).

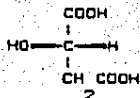
Por tener un átomo de carbono asimétrico (centro quiral) es ópticamente activo y se presenta en tres modificaciones isómeras;

dextrógira, levógira y racémica. La manera en que se designan simbólicamente es:

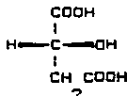
S (-), L = Forma levógira
 R (+), D = Forma dextrógira
 RS , DL = Forma racémica

Las formas L y D son enantiómeros ópticamente activos y la forma DL es inactiva

El enantiómero levorotatorio tiene la siguiente configuración espacial. (35) (52).



S (-) Ac. Máfico



R (+) Ac. Máfico

En estado natural el ácido levomáfico en soluciones acuosas demuestra un comportamiento peculiar con respecto a la acción sobre la luz polarizada; una solución al 34% a 20°C es ópticamente inactiva; las de mayor concentración son dextrógiras y las más diluidas levógiras. (52).

Tabla II-4.- Acción sobre la luz polarizada.

Concentración de ac. L-málico en 100 ml de solución		[α] _D ²⁰
70.1		+ 3.84
45.4	Dextrogira	+ 1.0
34.0	-----	0
15.5	Levogira	- 1.5
8.4		- 2.30

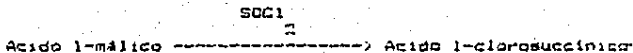
3.3) Reactividad del Ácido Málico

1).- Los ácidos D y L - málico pueden interconvertirse mediante la formación del ácido clorosuccínico (Inversión de Walden).

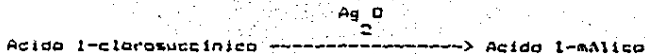
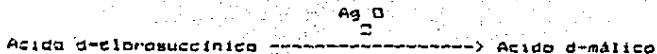
Al tratar el ácido málico con pentacloruro de fósforo se produce una inversión en la configuración espacial del átomo de carbono asimétrico y se forma el ácido d-clorosuccínico:



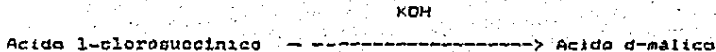
Si el reactivo es el cloruro de tionilo la inversión no tiene lugar y el ácido formado es el l-clorosuccínico:



Por acción de óxido de plata en suspensión acuosa el ácido d-clorosuccínico se convierte en ácido d-málico.



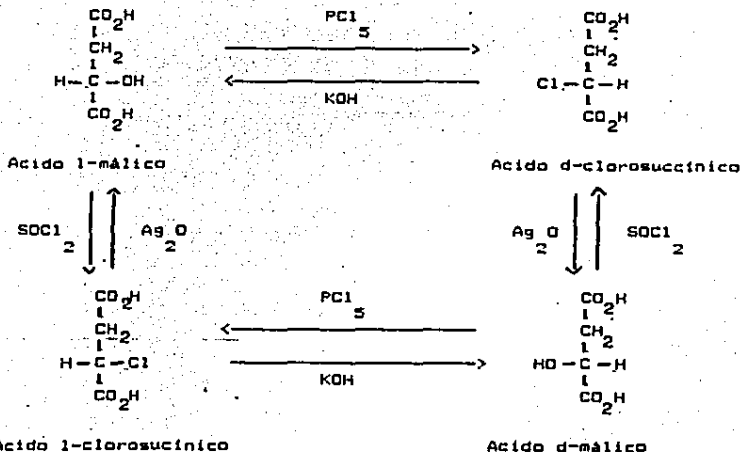
Si se utiliza hidróxido los ácidos que se obtienen son l-málico y d-málico, respectivamente.



El pentacloruro de fósforo y el hidróxido de potasio provocan inversión en la configuración mientras que el óxido de plata y cloruro de tionilo no.

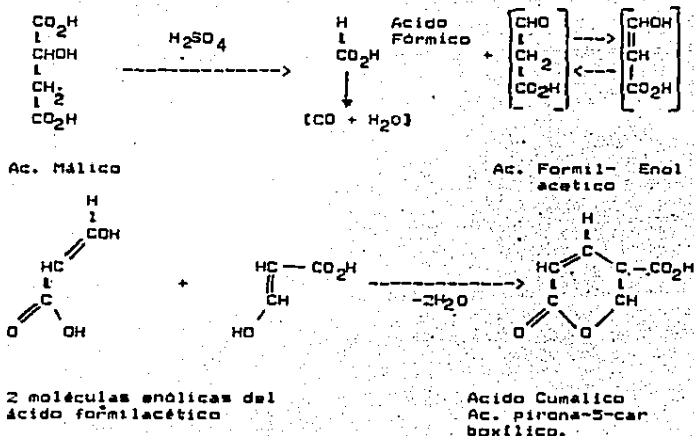
Los cambios de la configuración resultantes se revelan por su acción sobre la luz polarizada. La inversión de Walden indica que dos grupos unidos a un átomo de carbono asimétrico han cambiado de posición.

Las modificaciones producidas se representan por las siguientes fórmulas proyectadas en papel:

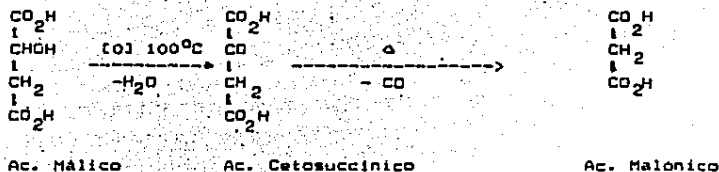


El ácido málico tiene muchas de las características de reactividad de los ácidos dicarboxílicos y alcoholes monohidroxílicos o monohidroxilados, como ácidos α -hidroxicarboxílicos.

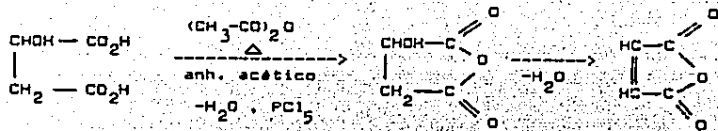
2).- Al calentar con ácido sulfúrico fumante con anhídrido sulfúrico al 10% se separa una molécula de ácido fórmico (reacción de los α -hidroxiaácidos) y dos moléculas del hemialdehído del ácido malónico (ácido formil acético), las que reaccionan entre sí bajo la forma enélica para dar ácido cumálico o cumalínico. (52) (35) (47).



3).- Calentando el ácido málico a 100°C durante 24 horas se convierte en ácido malónico. (52) (55)



4).- El ácido málico se prepara hidratando el anhídrido málico: Este se origina cuando se calienta el ácido málico con anhídrido acético, cloruro de acetilo o pentacloruro de fósforo: en presencia de estos deshidratantes no se produce ácido fúmarico y se favorece la formación del anhídrido del ácido málico el cual se convierte a su vez, en anhídrido maléico. (50) (60) (71).



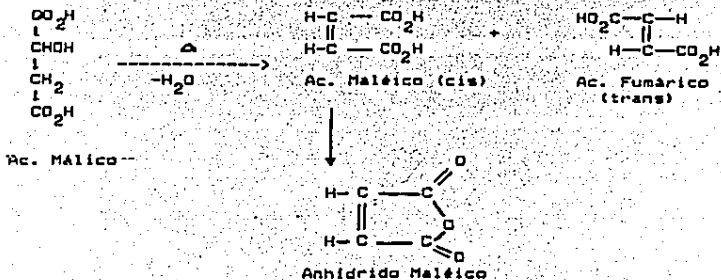
Ac. Mállico

Anhídrido Mállico

Anhídrido
Mállico

51.- Calentando el ácido mállico a 140°C se forma el ácido fumárico y anhídrido mállico (el isómero trans se produce en mayor cantidad).

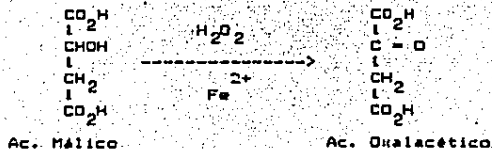
(71).



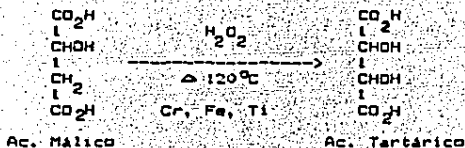
Ac. Mállico

Anhídrido Mállico

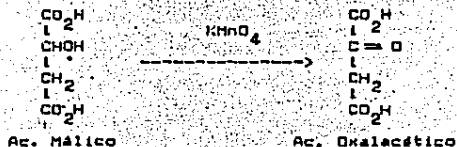
6) La oxidación con peróxido de hidrógeno produce, en presencia de una sal ferrosa, ácido oxalacético. (51) (52)



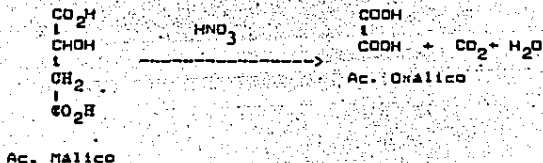
7) Con peróxido de hidrógeno, en un tubo cerrado a 120°C se produce ácido tartárico y la oxidación se cataliza en presencia de cromo, fierro o iones de titanio, o de su mezcla. (69)



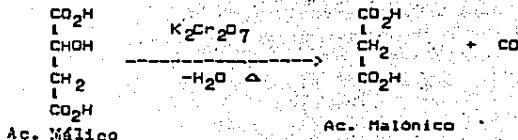
8) Con permanganato de potasio se produce ácido oxalacético. (51)



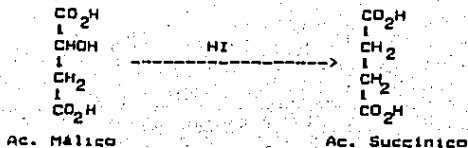
9) Con ácido nítrico produce ácido oxálico. (37)



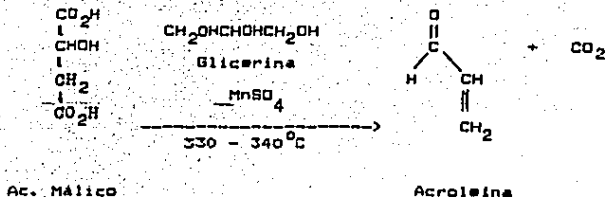
10) Con dicromato de potasio produce ácido malónico. (47)



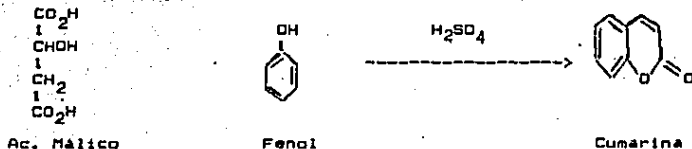
11) Por reducción con ácido yodhídrico nos produce ácido succínico. (52)



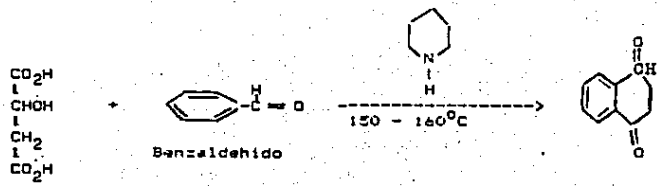
12) Calentando con glicerina se forma anhídrido carbónico y acroleína. (52)



13) Calentando el ácido mállico con fenoles y ácido sulfúrico se produce cumarina. (47) (51)



14) El ácido mállico y el benzaldehído reaccionan en presencia de piperidina, a 150°C, para formar ácido β -benzoylpropiónico. (51) (47)

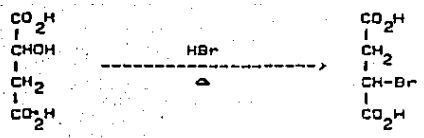


Ac. Mállico

Ac. 1,4-nephtalenodiona.
Ac. β-benzoilpropionico.

15) Calentando con ácido bromhídrico forma Acido bromosuccinico.

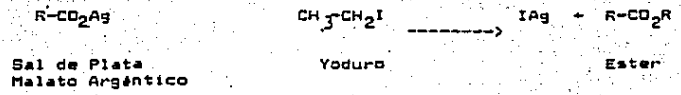
(S1).



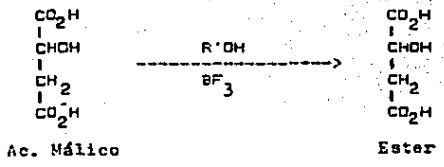
Ac. Mállico

Ac. Bromosuccinico

16) Se prepara ésteres añadiendo malato argéntico en pequeñas porciones y un exceso de yoduro alquílico y completando la reaccion por calentamiento, en baño de agua. (S1)



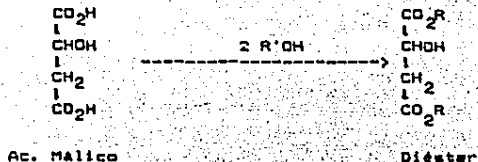
17) El monoéster se prepara por reflujo de ácido mállico en alcohol y trifloruro de boro como catalizador.



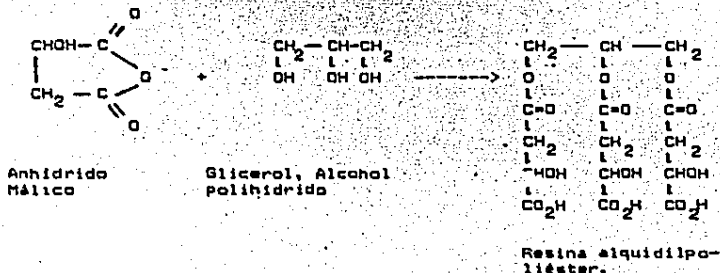
Ac. Mállico

Ester

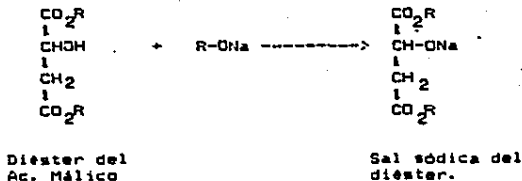
18) Se produce el diéster correspondiente con un alcohol.



19) Con alcoholes polihídricos el anhídrido del ácido málico produce resinas alquidilpoliéster. (35) (31)

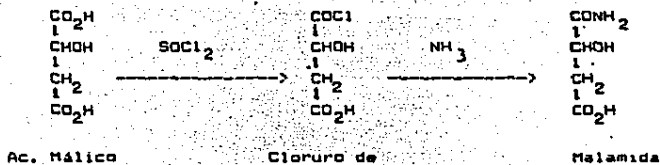


20) Reacción del diéster málico y alcóxido de sodio.

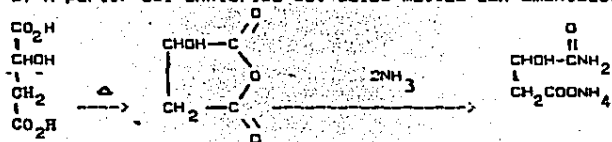


21) Obtención de amidas.

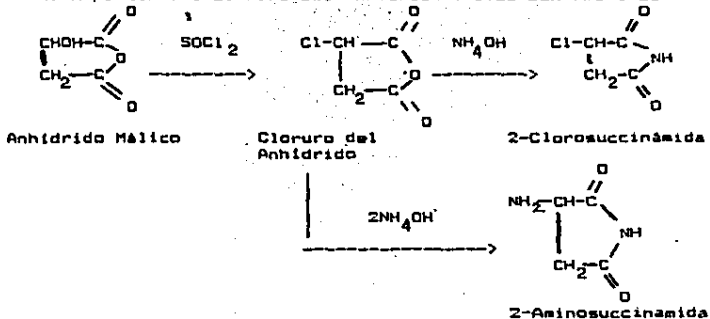
a) A partir del cloruro del ácido málico con amoníaco.



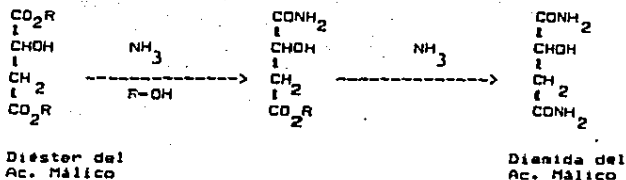
b) A partir del anhídrido del ácido málico con amoníaco.



c) A partir del cloruro del anhídrido málico con amoníaco.



d) A partir del diéster del ácido málico.

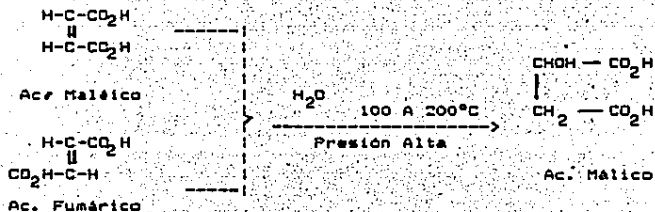


22) El ácido málico forma complejos de quelatos con iones metálicos dependiendo del pH de sistemas acuosos. Las reacciones de quelatos se usan en procesos industriales requiriéndose la eliminación o control catalítico de iones metálicos, para inhibir la corrosión en los productos de galvanoplastia.

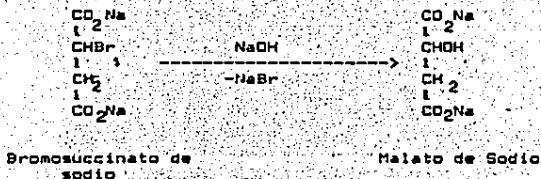
Como se observa en las reacciones expuestas, el ácido málico reacciona como los ácidos carboxílicos formando derivados funcionales de los mismos, como son: Cloruros de ácido, anhídridos, ésteres y amidas. Estos derivados son compuestos en los que el OH de un grupo carboxílico ha sido remplazado por: -Cl, -OOCR, -NH₂, -OR. (35) (51)

3.4) Reacciones de Obtención.

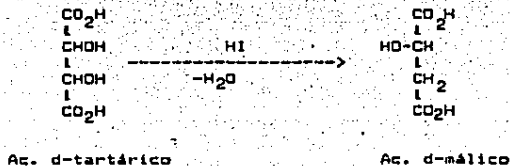
1. El ácido málico se prepara por hidratación de ácido maléico o fumárico mediante calentamiento a altas temperaturas (100 a 200°C) y presión alta. (52)



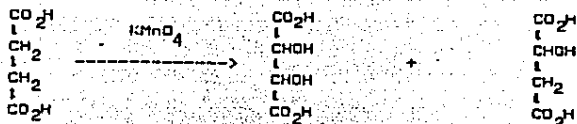
2. Puede obtenerse tratando el ácido bromosuccínico con hidróxido de sodio diluido.



3. El ácido D-málico se forma por reducción del ácido D-tartárico con ácido yodhídrico. (52)



4. Oxidación del ácido succínico con permanganato de potasio, produce una mezcla de ácido málico y ácido tartárico. (52) (28)



Ac. Succínico

Ac. Tartárico

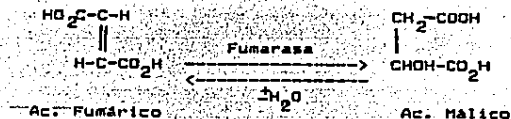
Ac. Málico

5. Reacción Biosintética.

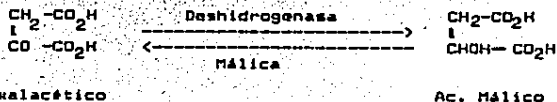
(No se reporta gran rendimiento)

a) A partir de ácido fumárico por medio de la enzima fumarasa.

(4) (37)



b) A partir de ácido oxalacético por medio de la deshidrogenasa málica. (4) (37)



4) PROPIEDADES ALIMENTICIAS

El ácido málico es uno de los aditivos generales propuestos por la FDA (Food and Drug Administration). Se encuentra en la lista de sustancias GRAS (Sustancias que son generalmente reconocidas como seguras), en la lista de agentes Neutralizantes y Amortiguadores. (28)

El ácido málico es reconocido y usado en Norte América desde 1965 y en muchas otras partes del mundo como son: Japón, Inglaterra,

Canadá, Estados Unidos y México. (59) (22)

Tomando el ácido málico como un aditivo alimenticio este puede definirse como aquella sustancia que no es un producto alimenticio básico y que está presente en alimentos como resultado de su incorporación en la producción de los mismos (en forma natural se encuentra en frutas y vegetales). Su importancia estriba en ser un aditivo que puede contribuir a la conservación de las características del alimento. Tomando el ácido málico como aditivo alimenticio debe ajustarse a las siguientes propiedades:

- a) Mantener la calidad nutritiva del alimento sin afectar sus propiedades.
- b) Aumentar estabilidad del alimento.
- c) Coadyuvar al procesamiento del alimento.

El ácido málico se considera un agente saborizante, que incrementa o extingue el sabor y como sustancia química para controlar el pH. (14)

CARACTERÍSTICAS GENERALES.

El ácido málico es un acidulante general de sabor agrio suave, que desaparece gradualmente sin dejar sensación de sabor fuerte, acentuando o reteniendo el sabor del alimento. Por su alta solubilidad en agua y su baja higroscopicidad es muy útil en productos líquidos y en productos en polvo. Se usa en pequeñas cantidades dando la sensación de un sabor natural, enmascara sabores indeseables, no afecta los colores naturales o artificiales y no causa sedimento del color como sucede con

algunos ácidos fuertes. Tiene la propiedad de inhibir el desarrollo de rancidez en aceites y grasas y, por lo tanto sirve como antioxidante en algunos alimentos. (22) (35).

5) BIOSÍNTESIS Y TOXICOLOGÍA

5.1) BIOSÍNTESIS .

El ácido málico interviene de manera muy importante en el metabolismo humano y vegetal, el ión malato es formado en el ciclo de Krebs y en el ciclo de glioxilato. Funciona como un intermediario metabólico en varios tipos de reacciones las cuales son catalizadas enzimáticamente y son responsables de mantener la viabilidad del organismo, es un precursor de determinadas reacciones biosintéticas que se forman a partir de reacciones degradativas de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (reacciones de síntesis y degradación). (4) (25)

En el ciclo de Krebs funciona como intermediario, efectúa una de las reacciones que son responsables de la degradación oxidativa productora de energía y de la producción de piruvato a bióxido de carbono en la glucólisis. Junto con la fosforilación oxidativa sirve como fuente principal de energía metabólica en forma de ATP.

El ácido málico junto con otros ácidos dicarboxílicos (succínico, fumárico, oxalacético y α -cetoglutarico), estimula la respiración, aumentando el consumo de oxígeno y la producción de bióxido de carbono a partir de la degradación de piruvato. (25)

El ácido málico en la síntesis de aminoácidos funciona como un intermediario precursor de la formación de oxalacetato fuera de la membrana celular para ser transformado en aspartato (transaminación) dando origen a la formación de aminoácidos. (41)

Por el ciclo del glioxilato las plantas y bacterias tienen la capacidad de formar carbohidratos a partir de ácidos grasos, donde una de las reacciones claves de este es la formación de malato partiendo de una unidad de acetil-SCoA y glioxilato por medio de la enzima malato sintetasa, el malato formado puede ser convertido en oxalacetato y este puede ser utilizado en la biosíntesis de carbohidratos y aminoácidos. (27)

En el metabolismo vegetal los precursores de ácidos orgánicos son generalmente otros ácidos orgánicos y azúcares, algunos aparecen inicialmente en la fotosíntesis de aminoácidos durante la transaminación. El principal camino del metabolismo de los ácidos orgánicos producidos es la respiración celular en carboxilaciones y descarboxilaciones, también el ácido málico es oxidado en la mitocondria conforme se establece en el ciclo de Krebs para la formación de ATP. (29)

Tomando el ácido málico desde otro punto de vista, éste forma parte del equilibrio ácido-base en el organismo humano (se encuentra en sangre en la cantidad de 0.19 mg/100 ml.). Como el ácido málico es parte de la dieta humana (en frutas y verduras) se efectúan ciertas funciones metabólicas por la absorción del mismo por el organismo donde el ácido málico se oxida fácilmente. (31) (56)

5.3) TOXICOLOGIA

Es un ácido relativamente fuerte que puede producir alguna irritación en la piel y membranas mucosas, en los ojos causa lagrimation cuando se usa concentrado. No se conocen efectos acumulativos y no se han reportado daños en su manejo industrial.

La dosis oral, LD-50, en ratones y ratas es de 1 600 a 3 200 mg/Kg en solución acuosa al 1%. Los síntomas son: debilidad, retracción del abdomen, cianosis, dolor al respirar, irritación en la piel de cueros. (No hay diferencias notorias entre los ácidos málico D o L).
(54)

6) METODOS DE ANALISIS DE ACIDO MALICO

6.3) Cualitativo

IDENTIFICACION DE ACIDO MALICO

Reaccion de Pirours. Se emplea como reactivo una solución que contiene 0.02g de β -naftol por cada mililitro de ácido sulfúrico concentrado.

Procedimiento:

Se añaden en una cápsula de porcelana 0.05 gramos de la sustancia por analizar y 15 gotas de reactivo. Si hay ácido málico aparece una

coloración verde amarillenta que pasa a amarillo pálido al calentar y a anaranjado al diluirse con agua. (69).

Cromatografía de Papel (Salwin and Bond)

Se usa cromatografía ascendente en papel para la separación de ácido málico y otros ácidos orgánicos (oxálico, cítrico, tartárico, fumarico, succínico, láctico, adipico) con una mezcla de 80:16:4 de etanol 96%: agua: hidróxido de amonio concentrado usado como solvente. La visualización se realiza rociando el papel con una mezcla de rojo de metilo (0.02%) y una solución de azul de metileno al 0.1% en etanol (19) (29).

Cromatografía de Capa Fina

Schwiger reportó la separación de ácido como láctico, málico, cítrico, fumarico. Se usa polvo fino de celulosa con 20:20:1 de pentanol: ácido fórmico: agua como solvente. La identificación se lleva a cabo por el rociado con β -hidroxiquinoleína, etanólica. (19) (74).

6.2) Cuantitativo

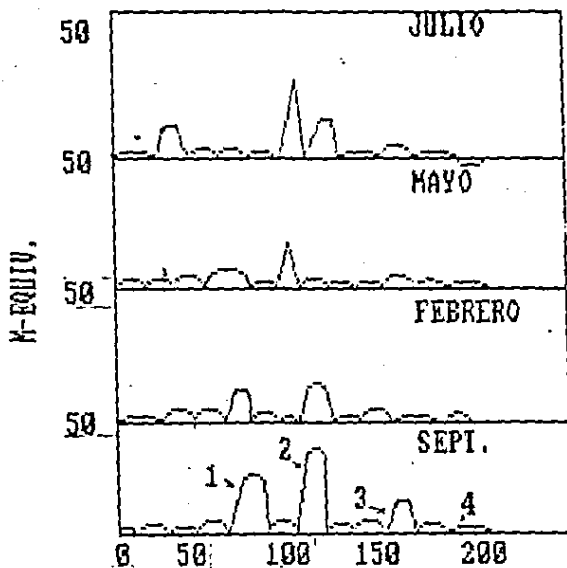
Cromatografía de Columna Líquida.- Silica gel.

Una mezcla de ácido de C2 a C4 (cítrico, succínico, málico, fumarico, pirúvico) pueden separarse en una columna que contiene ácido sulfúrico 0.05 N sobre un gel, el solvente usado es benceno-éter. Las fracciones de ácido se localizan con una solución de rojo de metilo y posterior titulación con solución de hidróxido de sodio 0.001-N hasta

alcanzar el punto rojo fenol. (19)

Por ejemplo Clements en 1964 separó los ácidos orgánicos de extractos de naranja por cromatografía de sílica gel obteniendo la siguiente gráfica-II-I. (29)

GRAFICA II-I



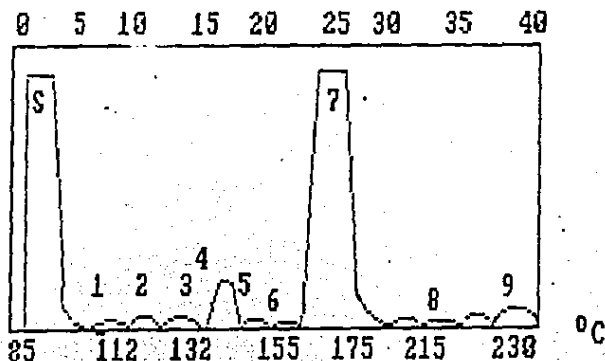
Gráfica II-I

1 = Acido Malónico ; 2 = Acido Oxálico; 3 = Acido Málico
4 = Acido Cítrico.

Cromatografía de Gases

Algunos investigadores como Mazliak y Salsac (1955), Brunelle .
(1967) probaron la cromatografía de gas para estimación de ácidos
orgánicos tras posterior esterificación de los mismos.
Mazliak y Salsac obtuvieron la siguiente gráfica de los metil .
esteres de pulpa de manzana, (gráfica II-2). (16)(29).

GRAFICA II-2



Cromatografía de Gas. 1 = Piruvato; 2 = Glicolato; 3 = Oxalato; 4 = Fumarato; 5 = Succinato; 6 = Adipato; 7 = Malato; 8 = Citrato; 9 = Isocitrato.

El método para la determinación de ácido málico en vinos y bebidas de frutas descrito por Brunelle y Schoeneman (1967) es el siguiente: (16).

Método

- a) Cromatografo de gases con detector ionizante de llama.
- b) Columna de 1.85 ms. x 64 mm de diámetro externo, de vidrio, empaquetada con SE-30 al 3.8% sobre Diatroport S operada isotérmicamente a 130oC. con bloque de inyección y el detector a 180oC.
- c) Jeringa, microjeringa Hamilton número 705.

Reactivos.

- a) Disolución de acetato de plomo. Dilúyase 75 grs. de acetato de plomo y 1 ml de ácido hasta 250 ml con agua.
- b) Disolución Patrón de ácido málico.
- c) Acido Sulfúrico 1 N. Dilúyase 28.4 ml de H_2SO_4 hasta un litro de agua.
- d) Hexametildisilazano y trimetilclorosilano.

Determinación.

Se transfiere 15 ml de la muestra por analizar en un frasco de centrifuga de 250 ml se agrega ácido sulfúrico 1 N y 20 ml de disolución de acetato de plomo, 0.2 gramos de celita 545; agitar vigorosamente dos minutos y centrifugar. Descartar el líquido sobrenadante por decantación. Lavar dos veces la sal de plomo con 100 ml de alcohol al 80% agitando, centrifugando y decantando. Calientese el residuo a 100°C hasta sequedad (por 2 horas). Suspender la sal de plomo desecando en 5 ml de la disolución patrón (b) disgregar el precipitado con una varilla de vidrio. Añadir a esta suspensión en el siguiente orden, unas cuentas piezas de drierita, 1 ml de trimetilclorosilano y 1 ml de hexametildisilazano, agitar durante dos minutos para completar la reacción, descartar la mezcla a un vial de 5 ml con tapón de poliestireno y centrifugar. Cromatografiar 20 μ lit del sobrenadante en corriente de helio a 50 ml/min. Se repite este procedimiento con 5, 10, 15, 20 mgs de ácido málico y se representa los cocientes de altura de los picos de la trimetil-silano derivados por altura de el pico de el patrón interno, en función de la concentración de ácido málico fijo. Se

Cromatografía dos veces cada muestra por comparación con los tiempos de retención de los ácidos conocidos.

Cromatografía de Intercambio Iónico. (Goodban y Stark 1957)

Método desarrollado por USDA Weestern Regional Resarcn Laboratorios. Se basa en la eliminación de los cationes en una columna cambiadora de cationes, y la posterior absorción de los ácidos en una columna de resinas cambiadoras de aniones. Los ácidos débiles retenidos se eluyen con una disolución de carbonato de amonio y el ácido málico se extrae con carbonato de amonio a una molaridad más alta. (16) (29) (62)

Reactivos

- a) Amberlita IRA-400, forma carbonato, de 60 a 80 mallas homogenizar y pasar por un tamiz la resina húmeda en forma de cloruro; regenerar con una disolución al 5% de hidróxido de sodio, lavar luego con carbonato de amonio 1 N y finalmente con agua destilada.
- b) Dowex 50, forma hidrogenada de malla 60-100; 12% de enlace cruzado.
- c) Carbonato de amonio 0.25 N (14.25 g/l)
- d) Carbonato de amonio 1 N (57.0 g/l).
- e) Ácido sulfúrico al 96% grado analítico.
- f) 2.7 de Naftalenodiol, 1 gr/100 ml de ácido sulfúrico al 96%
- g) p-Hidroxifenilo, disolución al 1% en hidroxido de sodio 0.1 N.
- h) Carbonato de sodio, 1 N.
- i) Sulfato cúprico, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, al 4%.

Determinación

Preparar la columna número 1, insertando un tapon del número 00 provisto de un orificio en el que se introduce un trozo de tubo de vidrio en una columna cromatográfica, constituida por un tubo de vidrio de 25 cm. de longitud y 14 mm de diámetro externo. Se coloca un pequeño círculo de tela de nylon en el fondo del tubo para retener. Asegurarse que no se proyecten fibras de nylon por debajo del extremo de la columna. (cargar la columna con una pasta acuosa de resina IRA-400 (reactivo a) hasta que el sedimento alcance una altura de 10 cm.

Cargar la columna número 2 (un tubo de 14 mm de diámetro externo y 20 cm de longitud equipado de modo similar) con una papilla de Sowers 50 (reactivo b) en cantidad suficiente para que la resina alcance una altura de 10 cm. Coloque la columna número 2 encima de la número 1, de manera que sus eluatos caigan directamente sobre la columna anionica. Añadir cuidadosamente a la columna superior una alícuota de la disolución por analizar que contenga no más de 3 miliequivalentes de ácidos totales y no menos de 0.008 miliequivalentes (0.54 mgrs.) de ácido málico y dejar que pase libremente a través de ambas columnas. Retirar la columna inferior; lavar la superior con tres porciones de 10 ml., de agua destilada y esperar a que una porción haya penetrado totalmente en el lecho de resinas antes de añadir la próxima. Lavar la columna inferior con tres porciones de 10 ml. de agua destilada. Eluir la columna inferior con cinco porciones sucesivas de 10 ml. de carbonato de amonio 0.25 N (reactivo c) recogiendo el eluato en un matraz aforado de 100 ml. (determinación otros ácidos orgánicos).

Cambiar el matraz aforado por otro de 50 ml y lavarse sucesivamente

la columna con 10, 10, 10, 10, y 9 ml de carbonato de amonio 1N (reactivo d). Este segundo eluato contiene el acido málico.

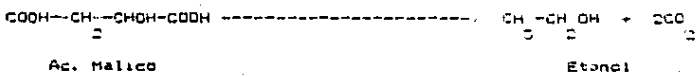
La determinación de acido málico se hace tomando 1 ml. de eluato que contiene el acido málico y que debe contener de 5 a 80 mgrs. de acido málico, a un tubo de ensayo de 25 x 200 mm. Añadir con cuidado exactamente 6.0 ml. de acido sulfúrico al 96% gota a gota, con una bureta dejando que el reactivo se deslice por la pared del tubo y agitando el líquido del tubo de ensayo durante la adición. Mezclar y añadir 0.1 ml. de la disolución de 2, 7-naftalenodiol (reactivo f) y calentar en baño de agua hirviendo durante 20 minutos. Enfriar y transferir una alícuota a la cubeta del espectrofotómetro. Leer el porcentaje de absorbencia a 590 milimicrones (mm). la grafica patron se obtiene al representar las lecturas en el espectrofotómetro en función de la concentración de acido málico, es una línea recta en el rango de 5 - 60 microgramos. El blanco se prepara con 0.1 ml de reactivo de color, 1.0 ml. de agua y 6.0 ml. de acido sulfurico. Este blanco debe permanecer incoloro, tras el calentamiento.

Expresar los resultados en porcentaje de acido málico o en gramos por 100 ml. (16) (21)

6.3) Biologico

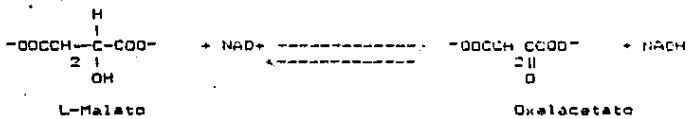
Los procedimientos enzimaticos son rapidos y sujetos a minimos errores de manipulacion. (30) (21)

Hay dos procedimientos en el primero se usa el microorganismo Schizosaccharomyces se determina cuantitativamente el acido malico por fermentacion produciendo etanol y dióxido de carbono (B).



La cantidad de acido malico se obtiene por la determinacion de acido total antes y despues de la fermentacion de Schizosaccharomyces.

El segundo procedimiento se utiliza la enzima deshidrogenasa malica que cataliza la reaccion entre acido malico (malato y NAD+) formando oxalacetato y se reduce la forma de el dinucleotido a NADH.



Se determina el acido oxalacetico con hidrazina en solucion alcalina. El avance de la reaccion se mide espectrofotometricamente por el cambio de el coeficiente de extension a 344mm. (debido a la reaccion de NAD- a NADH el resultado puede ser un poco inespecifico).

6.4) Gravimetrico (Cowles 1908).

Se describen dos métodos; el primero con la utilización de cloruro de calcio y el segundo con acetato de calcio.

Los dos métodos dependen de la precipitación de ácido málico como malato de calcio, con mínima solubilidad en alcohol. Cuando estas se calcinan producen carbonato de calcio, acetato de calcio, que se titula con hidróxido de sodio, usando como indicador anaranjado de metilo.

Los otros ácidos orgánicos presentes en la muestra se precipitan con alcohol.

Esta determinación se realiza en productos que contienen azúcar o carbohidratos. (10) (43) (50) (73).

CAPITULO III

METODOS DE OBTENCION

MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE ÁCIDO MÁLICO

La obtención de ácido málico se realiza por diferentes procesos o manufacturas, tanto a nivel laboratorio como industrial. Los métodos de obtención que se presentan en este trabajo muestran un amplio panorama desde sus principios en que fue descubierto y se obtuvo de frutas naturales realizado por Scheele en 1785 y por Von-Liebig en 1835, hasta nuestra época, donde el ácido se obtiene por métodos químicos o sintéticos, enzimáticos o fermentativos.

Estos procesos se basan en las propiedades químicas y bioquímicas del ácido málico.

A partir del descubrimiento del ácido málico empezó a surgir la inquietud por obtener el ácido en forma pura. De este interés surgieron varios investigadores posteriores a la época de Von Liebig como fueron J.M.Weiss (1922), Fleisch (1838), A.Pictet (1881), Skaup (1891), S.Tanator (1893-1894), aportaron diversos métodos de obtención a nivel laboratorio utilizando productos naturales y químicos. (59)

Estos métodos se exponen a continuación:

1) OBTENCION NATURAL DE FRUTOS (R. Hagen 1841)

El ácido málico puede prepararse partiendo de frutos verdes como son bayas verdes silvestres (Serbus acupario, rosáceas árbol de desarrollo ramoso de 5 a 6 metros de altura, florece en primavera, dando lugar a frutos carnosos del tamaño de un garbanzo, es astringente y contiene pectina, ácido cítrico ácido málico, se encuentra en climas templados), en la Vid y el manzano, el procedimiento de obtención es el siguiente:

- 1.- Se trituran y exprimen las frutas y el residuo de la expresión se lixivia con un poco de agua.
 - 2.- El zumo obtenido se calienta a ebullición se filtra y se vuelve a calentar.
 - 3.- Se adiciona lechada de cal para neutralizar
 - 4.- Se forma el malato de calcio polvo granuloso que se decanta, centrifuga y deseca.
 - 5.- Se vierte el precipitado en una mezcla hirviente de ácido nítrico 1 : 10.
 - 6.- Al enfriar la solución precipita el malato ácido de calcio; $\text{Ca}(\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_5)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, en forma de octaedros rómbicos, este malato ácido se purifica por recristalización en agua.
 - 7.- Para obtener el ácido málico se precipita la solución con acetato de plomo y se descompone la sal plúmbica adicionando ácido sulfúrico.
 - 8.- Se filtra y se conserva el líquido hasta la cristalización.
- (15) (49) (52)

Otra fuente de obtención es de el zumo de arce azucarado o maple (arce saccharinum).

W. Warren en 1911 informo que de 1000 arboles se obtiene de 7 a 11 kg de sal calcica la que puede convertirse en ácido málico.

2) OBTENCION QUIMICA A NIVEL LABORATORIO (Historia).

1.- A partir del acido málico, se produce fácilmente por oxidacion de benceno. (30). Calentando el acido málico con agua en un recipiente cerrado a 170 °C se obtiene el ácido málico y como producto secundario el ácido fumárico, método reportado por Skraup en 1891, S. Tanaton 1893, J.M.Weiss y Downs en 1922. (49)

2.- A partir de acido fumárico se puede obtener el ácido málico con vapor de agua a presión a 150-200 °C, reportado por J.Fleisch 1838, A.Pictet en 1881, Skraup en 1891 y S.Tanator en 1841. (52)

3.- A partir de calentamiento de ácido málico o fumárico a 100°C con NaOH diluida, reportado por H.I Von't Hoff 1885, Skaup 1891 (49).

La fabricación actual del ácido málico se lleva a cabo en Estados Unidos, Canada, Inglaterra, los cuales la producen en forma sintetica o química con lo que se obtiene el acido DL- málico, en Europa se produce la forma L-málico por utilizacion de microorganismos, en Japon se producen las dos formas del ácido málico, el método químico a nivel laboratorio y el método enzimatico a nivel industrial. Los métodos de producción del ácido málico se registran en diferentes patentes desde 1950 por K. Saito, 1968 por Y.Ono y M.A.Cullen, 1976 por C.R.Aigen, 1974 por Kozo Yamamoto. (34) (35)

En el presente trabajo se exponen los métodos químicos, enzimáticos y fermentativos por los cuales se produce el ácido málico. Se presenta a nivel industrial el proceso químico y a nivel laboratorio los procesos enzimáticos y fermentativo cuyo estudio en laboratorio fundamenta las condiciones de producción industrial.

3) OBTENCION INDUSTRIAL (Química-Sintética)

La síntesis química del ácido DL-málico involucra hidratación de ácido maleico o fumarico a temperatura y presiones elevadas. (35) (72).

El ácido maleico en solución acuosa requiere hidratación directa a 180°C y 150 a 200 psi, por un espacio de tiempo entre 3 y 5 horas, el producto de esta reacción es una mezcla de ácido málico en equilibrio con ácido fumarico y un pequeño porcentaje de ácido maleico, conteniendo usualmente cantidades pequeñas de compuestos coloridos de composición desconocida con cationes provenientes de la corrosión del reactor, (por ácido málico caliente) y agua. La purificación del ácido málico se realiza por doble etapa de cristalización donde se siguen los siguientes pasos:

- 1.- Ajustar la solución acuosa de ácido málico a una concentración de 40% en peso a 40°C.
- 2.- Enfriar la solución a 15°C para alcanzar el equilibrio.
- 3.- Separar el ácido fumarico sólido, de la lechada por filtración.
- 4.- Concentrar el licor madre a un mínimo del 62% a una temperatura de 40°C, efectuar la cristalización del ácido málico.
- 5.- Separación de ácido málico a 40°C.
- 6.- Lavar el ácido málico con una solución acuosa que esté sustancialmente libre de ácido maleico y fumarico.
- 7.- Redisolver los cristales de ácido málico en agua.
- 8.- Eliminación de residuos insolubles por filtración.
- 9.- Pasar esta solución directamente a una columna de carbon

activado para eliminar contaminantes coloridos.

10.- Ajustar la solución resultante de ácido málico a una concentración de 62% en peso; mantener a una temperatura de 40°C hasta efectuar la cristalización.

11.- Separación de ácido málico por filtración

12.- Llevar los sólidos de ácido málico con una solución acuosa que este libre de ácido maléico y fumarico.

El ácido málico que se obtiene y purifica en esta forma contiene 0.05% de ácido maléico y menos de 1% de ácido fumarico (Diagrama III-1).

Purificaciones adicionales pueden llevarse a cabo por el uso de resinas catiónicas y resinas aniónicas en columnas intercambiadoras, este paso puede realizarse después de el tratamiento con carbón o anterior a la segunda etapa de cristalización (Diagrama III-2). Las resinas aniónicas eliminan el ácido fumarico y maléico (ácidos orgánicos insaturados); las resinas cationicas eliminan cationes metálicos y el carbón absorbente o activado remueve impurezas coloridas. Los diagramas de purificación de ácido málico se describe como sigue:

(Diagrama III-1 y III-2)

Diagrama III-1
Purificación de Acido Malico

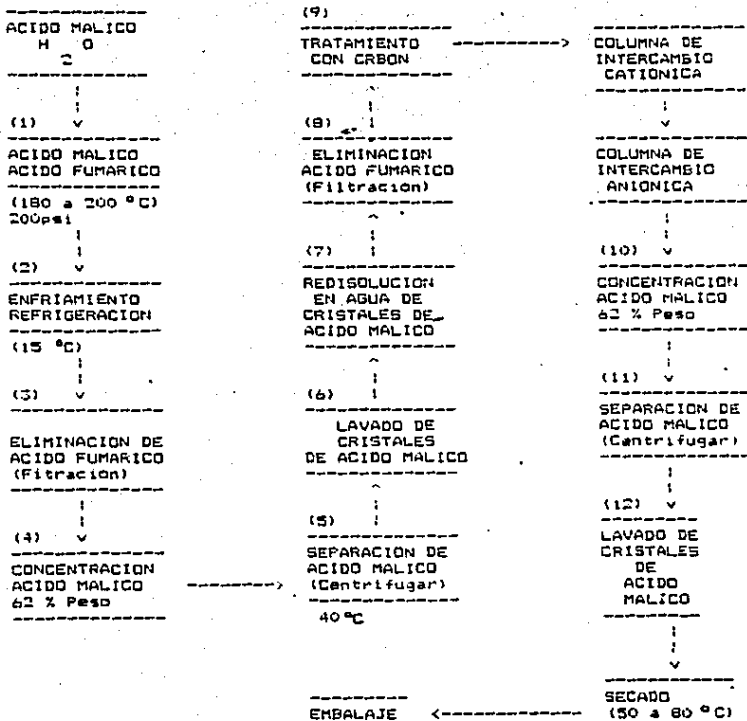
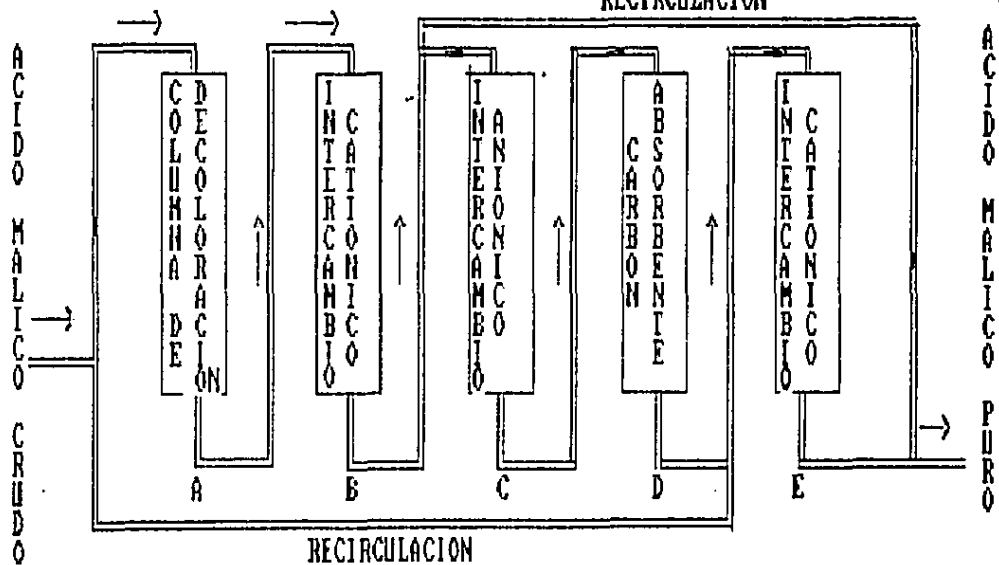


DIAGRAMA III-2 PURIFICACION DE ACIDO MALICO
RECIRCULACION



Las especificaciones que debe cumplir el ácido málico que se obtiene por este proceso son las siguientes:

ESPECIFICACIONES (Food Chemicals Codex)

Apariencia	Polvo Cristalino Blanco
Olor	Inodoro
Punto de Fusión	130-132 °C
pH en solución al 1%	2.35
Pureza	99.0% Min.
Cenizas	0.1% Max.
Material Insoluble en agua	0.1% Max.
Humedad	0.03 % Max.

LIMITES DE IMPUREZA

Arsénico	0.0003 % Max.
Metales Pesados, como Pb.	0.002 % Max.
Plomo	0.001 % Max.
Acido Fumárico	1.0 % Max. por peso
Acido Maleico	0.05 % Max. por peso

4) OBTENCION POR BIOSINTESIS MICROBIANA

La manufactura de ácido L-málico por procesos enzimáticos y fermentativos no es comparable a la producción por hidrólisis catalítica a altas temperaturas y presiones.

El ácido málico que se obtiene por biosíntesis microbiana se realiza partiendo de el ácido fumárico el cual es transformado enzimáticamente con o sin el aislamiento de la enzima fumarasa. Para este tipo de bioconversiones se han utilizado varios microorganismos como son:

a) Leucosporium brevis, Candida utilis, Pichia membranifaciens que transforman el fumarato a L-malato. (Furukawa 1970)

b) Pullularia pullulans, Brevibacterium que transforma el fumarato a L-malato (Ozawa y Watanabe 1968)

c) Candida Hydrocarbofumarica; el ácido L-málico se obtiene partiendo de un medio que contiene n-parafinas como fuente de carbono, se obtiene un rendimiento de 72% en peso de producto. (Furukawa 1970).

d) Rhizopus oryzae; el caldo de cultivo contiene una solución de arsenito de sodio 0.01 M, pH= 8.6 y ácido fumárico éste es casi completamente transformado a ácido L-málico. (Furukawa 1970).

El proceso comercial enzimático de producción continua de ácido L-málico se efectúa en Japon partiendo de la transformación de ácido fumarico, este método se basa en la utilización de células inmovilizadas de Brevibacterium ammoniasenes y Brevibacterium flavum.

Este proceso ha sido utilizado para la producción industrial desde 1974 utilizando el B. ammoniasenes, obteniéndose rendimientos de 15.4 toneladas por mes y con el B. flavum desde 1977 obteniéndose rendimientos de 24.1 toneladas por mes. (55) (66) (76).

El proceso de inmovilización se lleva a cabo en un gel de poliacrilamida; primeramente se prepara una suspensión de células en solución salina, se mezcla con acrilamida y un agente ligante promotor de la polimerización dando como resultado un gel formado por partículas de 3 mm de diámetro a las que se les añade 0.2% de extracto de bilis (aumenta la actividad de la fumarasa y debilita la formación de ácido succínico). Con estas células se empaca una columna de 1000 litros a la cual se pasa directamente un flujo de 100 a 200 litros de fumarato de sodio a 37°C. El periodo de actividad de la fumarasa de las células inmovilizadas en la columna es de aproximadamente dos meses. (55) (76) (24).

Este método de producción con células inmovilizadas de Brevibacterium ammoniasenes se describe a continuación detalladamente y posteriormente se dan las condiciones de producción de ácido L-málico en forma comparativa de los dos microorganismos señalados para la producción industrial.

4.1) Obtención Enzimática por Inmovilización de Células

Producción continua de ácido láctico por inmovilización de *Brevibacterium ammoniagenes* en gel de poliacrilamida, (61) (76).

Los resultados de la investigación así como las condiciones en las que se desarrolló la misma se muestran a continuación:

Materiales

Monomero de acrilamida, ácido deoxicólico, persulfato de potasio, bilis ácida, extracto de bilis, ácido fumárico.

Cultivo de microorganismos

Contiene las siguientes sustancias:

2% de glucosa

0.5% de ácido fumárico

1.0% de licor de maíz

10.2% de urea

0.2% de KH_2PO_4

0.05% de MgSO_4

pH = 7.0

Se inocula una muestra de microorganismos en 100 ml de medio se distribuye en frascos de 500 ml, se incuba por 24 horas con agitación

(140 rpm, 8 cm de golpe). Las células se colecciona por centrifugación.

Inmovilización de células

La inmovilización de células se lleva a cabo en un gel de poliacrilamida utilizando el siguiente procedimiento (Chibata 1974). Se suspende 1g (peso húmedo) de células en 4 ml de solución salina al 0.9% y 750 mg de monómero de acrilamida que se adiciona para formar la suspensión, se agregan 0.5 ml de β -dimetilaminopropionitrilo al 5%, como acelerador de la polimerización y 0.5 ml de persulfato de potasio al 1% como iniciador de la misma la suspensión se mantiene a 25°C por 15 min para acompletar la polimerización. El gel se prepara con partículas de 3 mm de diámetro (mall 9) y se lavan a fondo con solución salina al 9%.

Comprobación de la actividad de la fumarasa

Purificación parcial de fumarasa.

Se suspenden 10 g de células inmovilizadas en 100 ml de solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.01 M (pH=7.0) se zonifica a 9kc por 10 min. Las partículas celulares se removieron por centrifugación y el sobrenadante fue fraccionado con sulfato de amonio. El precipitado con el 40 a 70% de saturación se centrifuga y dializa contra una solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.01 M (pH=7.0).

Esta preparación alcanza una actividad de 8 Mmoles de ácido L-málico/min/mg de proteína.

Prueba de estandarización de la actividad de la fumarasa

La actividad de la fumarasa de las células inmovilizadas se determina como sigue:

Para 7.5 g de células inmovilizadas se agregan 30ml de fumarato de sodio 1M (ph=7.5) y se incuba a 37°C por una hora con agitación. La reacción se detiene por remoción del gel por filtración y el ácido L-málico formado se determina colorimétricamente. El remanente de ácido fumárico se remueve como precipitado al adicionar un volumen igual de HCL 2N a la mezcla reaccionante.

Determinación de ácido succínico

Después de remover el ácido fumárico el precipitado resultante de la centrifugación se determina del sobrenadante el ácido succínico por medio de una cromatografía de papel utilizando los siguientes solventes; n-butanol; ácido acético; agua (4:1:1), usando como indicador azul de bromofenol en metanol al 0.1%.

Determinación de ácido fumárico

La concentración de ácido fumárico se determina espectrofotométricamente a 280 nm. (metodo de Back y Alberty 1953)

A) Condiciones óptimas para la inmovilización de células y tratamiento con extracto de bilis para la producción de ácido L-málico.

1.-Elección de microorganismos.

Se prepararon diversos microorganismos con alta actividad de la enzima fumarasa, fueron inmovilizados en un gel de poliácridamida, dando como resultado que el Brevibacterium ammoniagenes IAM-1645 tiene mayor actividad enzimática en comparación con los otros microorganismos usados (Tabla III-1).

2.-Supresión de la formación de ácido succínico.

Se investigaron diversos métodos y sustancias para evitar la formación de ácido succínico, teniéndose como resultado que con el extracto de bilis se reduce a una mínima cantidad su producción y se incrementa la formación de ácido L-málico (Tabla III-2,3,4).

3.-Condiciones para el tratamiento con extracto de bilis.

a) Concentración del extracto de bilis

Para uso industrial el tratamiento con extracto de bilis es más adecuado a una concentración de 0. 3% suprime a un mínimo el ácido succínico (Tabla III-5).

b) Efecto de la temperatura

La temperatura óptima para el tratamiento con extracto de bilis es de 37°C produciéndose una menor cantidad de ácido succínico (Tabla III-6).

c) Efecto de el pH.

El óptimo pH para el tratamiento, está dentro de un rango de pH de 5 a 9, tomándose como el más adecuado el de 7.5 (Tabla III-7).

Los resultados expuestos están fundamentados en la investigación realizada con diversas variantes como son: microorganismos, efectos físicos y químicos. Estas variantes se exponen a continuación en forma de tablas de resultados.

1.- Elección de microorganismo.

Tabla III-1

Microorganismos	Formación de ácido L-Málico (mMoles/h/g de célula)	
	Sin CFC	Con CFC
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> IAM-1542*	0.49	3.37
<i>Corynebacterium equi</i> IAM-1028	0.09	0.42
<i>Escherichia coli</i> ATCC-11303	0.27	0.32
<i>Microbacterium flavum</i> IAM 1642	0.20	0.48
<i>Proteus vulgaris</i> LFD - 3045	0.16	0.26

CFC = Cloruro de centipiridinio al 2%, adicionado a la mezcla reaccionante, acelera la permeabilidad del sustrato o de el producto en la membrana celular.

2.-Supresión de la formación de ácido succínico

a) Autólisis, Congelamiento y descongelamiento, calentamiento, tratamiento con acetona y tratamiento con detergente.

Tabla III-2.- Autólisis, Congelamiento, Calentamiento de Células Inmovilizadas

Tratamiento	Formación de ac. L-málico (mmoles/h/g de célula)		Formación de ac. L-succínico (mol-% ac.L-málico)
	(a)	(b)	
Control sin tratamiento	0.49	4.57	2.5 - 5.0
Autólisis de células a 37°C por 20 horas	3.85	4.45	2.5 - 5.0
Congelamiento y Descongelamiento			
2.5 hrs	2.57	4.91	2.5 - 5.0
24 hrs	2.96	5.82	2.5 - 5.0
Tratamiento de células con calor 55°C, 1 hora	3.50	7.04	2.5 - 5.0
Tratamiento de células inmovilizadas con calor 55°C 1 hora.	1.55	4.06	2.5 - 5.0

a) Células inmovilizadas tratadas con CPC al 0.02%.

b) Células inmovilizadas tratadas con CPC e incubadas a 37°C por 20 horas.

TABLA III-3. TRATAMIENTO CON ACETONA

Tratamiento con acetona			Formación de ácido málico (nmoles/h/g de células)	Formación de ácido succínico (mol % ac. L-málico)
Concentración de Acetona (%)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)		
Control	(sin tratamiento)		4.57	2.5 - 5.0
0	25	60	5.23	2.5 - 5.0
50	"	"	7.71	>5.0
58	"	"	7.25	>5.0
45	"	"	7.45	1.0 - 2.5
50	"	"	7.43	< 0.2
67	"	"	6.02	< 0.2
50	10	60	6.41	> 5.0
50	10	120	6.72	> 5.0
50	20	60	7.57	1.0 - 2.5
50	20	120	7.51	0.2 - 1.0
50	30	30	5.25	0.2 - 1.0
50	50	30	1.17	< 0.2

TABLA III-4. TRATAMIENTO CON DETERGENTES

Detergente	Concentración (%)	Formación de ácido L-málico (mmol/h/g de células)	Formación de ácido succínico (mol % de ácido L-málico)
Control (inmediatamente después de la inmovilización.)		0.49	---
Sin adicionar detergente		0.99	2.5 - 5.0
CPC	0.02	4.57	2.5 - 5.0
CPC	0.16	3.07	1.0 - 2.5
SLS	0.02	6.05	1.0 - 2.5
SL-10	0.02	1.22	2.5 - 5.0
Triton X-10	0.20	5.56	15.0
Extrato ácido de bilis	0.20	6.57	<0.2
Extrato de bilis	0.20	7.48	<0.2
Ácido gálico	0.20	7.38	<0.2

CPC = Cloruro de centipiridinio.

SLS = Lauril sulfato de sodio.

SL-10 Sorbitan monolaurato.

C.-Condiciones para el tratamiento con extracto de bilis.

a) Efecto de la concentración de extracto de bilis.

Tabla III-5

Concentración de extracto de bilis (%)	Formación de ácido L-málico (mmoles/h/ g de células)	Formación de ácido succínico (mol % d ácido L-málico)
0	0.72	2.5 - 5.0
0.05	0.77	2.5 - 5.0
0.10	4.18	1.0 - 2.5
0.20	7.48	< 0.2
0.30	7.71	< 0.2
0.40	7.29	< 0.2

b) Efecto de la temperatura en el tratamiento con extracto de bilis.

Tabla III-6

Temperatura (°C)	Formación de ácido L-málico (mmoles/h/ g de células)	Formación de ácido succínico (mol % d ácido L-málico)
5	6.46	1.0 - 2.5
	6.64	0.2 - 1.0
30	6.95	< 0.2
37	7.38	< 0.2
45	6.91	< 0.2

c) Efecto de el pH usado en el tratamiento con extracto de bilis.

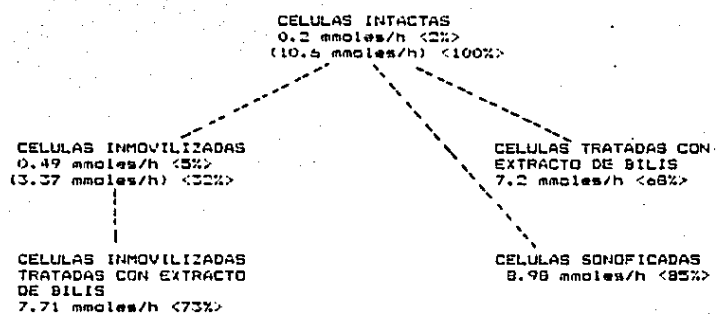
Tabla III-7

pH	Formación de ácido L-málico (mmoles/h/g de células)	Formación de ácido succínico (mol % ácido L-málico)
5.0	7.90	< 0.2
6.0	7.87	< 0.2
6.5	7.41	< 0.2
7.0	7.83	< 0.2
7.5	7.63	< 0.2
8.0	7.23	< 0.2
9.0	5.63	< 0.2

De los experimentos expuestos las condiciones óptimas se obtuvieron utilizando 7.6 gramos de células inmovilizadas suspendidas en 30 ml de fumarato de sodio pH = 7.0 a 35°C por 20 horas. Después de efectuado el experimento se determina la actividad enzimática midiendo la formación de ácido L-málico (mmoles/h/g de células) y la formación de ácido succínico (mol % de ácido L-málico).

La actividad de la fumarasa de células después del tratamiento con extracto de bilis se muestra en el siguiente diagrama:

DIAGRAMA III-1
Actividad de la fumarasa



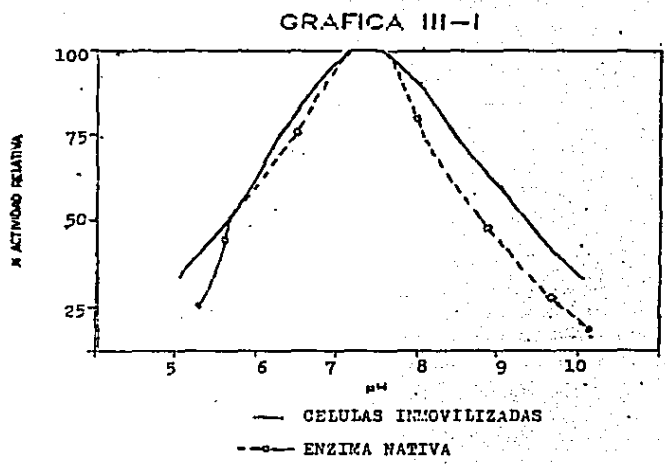
< >% de actividad se indica en mmol de Acido L-MALICO formado por hora por gramo de célula.
() Actividad en presencia de 0.02% de CPC= cloruro de centilpiridinio.

B) Factores que afectan la actividad enzimática de las células inmovilizadas.

Esta investigación se realizó para establecer las condiciones más adecuadas para la producción de Acido L-MALICO por inmovilización de Brevibacterium ammoniagenes y determinar las propiedades enzimáticas las células inmovilizadas tratadas con extracto de bilis y compararlas con la fumarasa pura o nativa. (50).

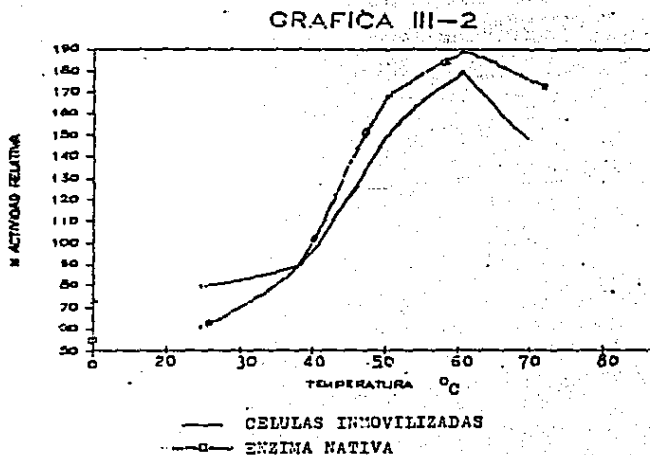
1.- Efecto del pH.

El óptimo pH para la formación de Ácido L-málico fue de 7.0 a 7.5 para la enzima nativa y para las células inmovilizadas. El efecto de el pH sobre la actividad de la enzima se muestra en la gráfica III-1.



2.- Efecto de la temperatura.

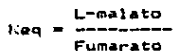
La temperatura optima para la formacion de acido L-malico es de 60°C para la enzima nativa y para las celulas inmovilizadas. El efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima se muestra en la grafica III-2.



De los datos se obtuvo la energia aparente de activacion usando el modelo de Arrhenius el valor para la enzima nativa fue de 8,800 cal/mol y para celulas inmovilizadas fue de 5,801 cal/mol.

D.-Efecto de la temperatura en la constante de equilibrio.

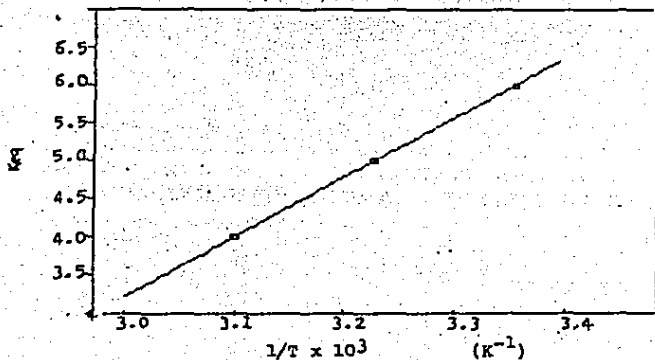
Hay un equilibrio en la reacción de la fumarasa expresado por:



Se calculó para las temperaturas indicadas en la gráfica III-2, usando fumarato de sodio IM como sustrato.

La constante de equilibrio valorada a 37°C fue de 4.73 (Gráfica III-3). El calor de reacción es de -2,600 cal/mol, después que la reacción alcanza el equilibrio se determinó la concentración de ácido L-malico y ácido fumárico.

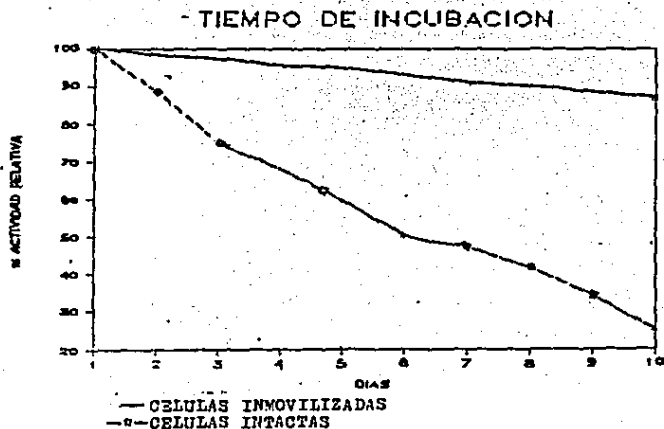
GRAFICA III-3



4.- Comparación de la actividad y estabilidad de la fumarasa de células intactas y células inmovilizadas.

Esta comparación se realiza con el fin de aclarar las ventajas de las células inmovilizadas sobre las células intactas en condiciones de reacción continua, mostrando la estabilidad de la actividad de la enzima fumarasa.

Los resultados se muestran en la grafica III-4.



La actividad de la enzima fumarasa de las células inmovilizadas es mucho más estable que la enzima de las células intactas cuya actividad decrece conforme pasa el tiempo.

DIAGRAMA III-3
PURIFICACION DEL ACIDO LACTICO

EFLENTE DE LA COLUMNA
LACTICO

AGREGAR 20 ml DE AGUA AL 10 ml

FILTRAR

RECONCENTRAR
AL LACTICO

RECUPERAR
AL LACTICO

AGREGAR 70 ml DE AGUA

CRISTALIZAR RECONCENTRO
A 4°C DURANTE DE 12 HORAS

SUSPENDER LOS CRISTALES EN 1 LITRO
DE AGUA Y PASAR AL 20 ml DE AGUA

FILTRAR

RECONCENTRAR
AL LACTICO

RECUPERAR
AL LACTICO

PARAR POR UNA COLUMNA DE INTERCAMBIO
IONICO AMPLIAMENTE LAVADO

CONCENTRACION DE ACIDO
LACTICO AL 20% AL V/V

ADICIONAR 700 ml DE ALCOHOL ISOPROPILICO
Y CONCENTRAR AL VACIO

FILTRAR

RECONCENTRAR
AL LACTICO
DEBEN SER

RECUPERAR
ALCOHOL
ISOPROPILICO

4.2) Obtención Fermentativa.

Producción de ácido L-málico a partir de n-parafinas con Candida brumptii, (60) (7).

Materiales.

Microorganismo; Candida brumptii IFO-P731.

Fuente de carbono; n-parafinas superpesada (pureza 95.7 y gravedad específica de 0.775 a 15°C).

Medio de Cultivo

40ml de n-parafinas

0.05g de KH_2PO_4

0.08g de $\text{NaSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.1g de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

50g de CaCO_3

10mg de Tiamina-HCl

1ml de licor de maíz

960ml de agua deionizada

extracto de levadura

El pH se ajusta a 6.2 con solución de NaOH 2N, el precultivo se hace en extracto de malta incubándose por 36 horas.

Determinación de volumen de células

Se determina por densidad óptica a 660 nm con espectrofotómetro.

Determinación de la concentración residual de n-parafinas

Se lleva a cabo por cromatografía líquido-gas en un cromatógrafo equipado con detector de flama ionizante de hidrógeno.

Identificación de ácido L-málico.

La identificación se hace después de siete días de cultivo en un caldo ya decantado con Amelita IR-120 (forma H⁺). Los ácidos orgánicos contenidos en el medio se absorben en una columna de Dawex 1 x 8. Se eluye selectivamente con solución de ácido fórmico al 0.5, 12.0, 2.0, 4.0 N.

El eluato que contiene ácido málico es recristalizado con una solución de acetona-cloroformo. Las propiedades fisicoquímicas del producto obtenido se comparan con las de el ácido málico puro y se muestra en la Tabla III-9.

TABLA III-9

	Producto	Ac. L-Malico
Rf Valores en papel cromatogramas		
Solvente (1)	0.42	0.42
Solvente (2)	0.38	0.38
Punto de fusion (oC)	104 - 105	104
Análisis Elemental(%peso)		
C	36.0	35.83
H	4.4	4.51
O	59.5	59.66
[α] _D ²⁵	-2.2°	-1.8°

Solvente (1) n-butanol: ácido fólico: agua: 4:1, 5:1
 Solvente (2) fenol: agua: 72:28

Se han encontrado que el ácido malico inicia su aparición al final del crecimiento de la fase exponencial y el máximo producto se obtiene después de 6 a 7 días de cultivo, encontrándose un comportamiento similar con los otros ácidos orgánicos.

Las condiciones del cultivo se muestran en la Tabla III-10.

Tabla III-10

CONDICIONES DE CULTIVO INVESTIGADAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO L-MÁLICO (60)	
EFECCIÓN DE DIFERENTES VARIABLES EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO L-MÁLICO	RESULTADOS MÁS FAVORABLES PARA EL CULTIVO
Fuentes inorgánicas de Nitrógeno	Los resultados más favorables se encuentran con urea a una concentración de 300 mg/litro
Concentración de urea.	Se incrementa el ácido L-málico con una concentración de 2 g/litro, disminuyendo los otros ácidos orgánicos.
Temperatura	El cultivo a 30 °C es el más adecuado.
Aeración	El proceso requiere grandes cantidades de oxígeno
Concentración de CaCO ₃	La máxima producción de ácido L-málico se obtuvo con 50 g/litro de CaCO ₃
Concentración y longitud de la cadena de n-parafinas.	La máxima producción se encontró con una concentración de n-parafinas de 0.2%. Teniéndose un máximo crecimiento con n-parafinas de: C ₁₆ , C ₁₇ , C ₁₈
Utilización de otras fuentes de carbono	3.9 gr de glucosa y 4 g de sorbitol en 30 ml de medio corresponden a 0.2% de n-parafinas, incrementa la producción de ácido L-málico.
Concentración de licor de melfz	La adición de 0.2 ml/litro da una mayor productividad de ácido L-málico.
Presencia de vitaminas	Una mezcla de vitaminas fue esencial para el desarrollo cuantitativo de ácido L-málico, nicotínico, piridoxina-HCl, pantoténico de calcio y ácido p-aminobenzóico (4 mg), Timina (1 mg), biotina y cianocobalamina (0.04 mg).
Productividad	24.4 a 25.4 g por litro de ácido L-málico

CAPITULO IV

.USOS

USOS DEL ACIDO MÁLICO

Actualmente el ácido málico se usa en diversas manufacturas como son las siguientes:

1) ALIMENTOS

1.1) Condimentos

El ácido málico acentúa el sabor proporcionando un efecto ácido suave, dando la sensación de sabor natural y enmascarando sabores indeseables. (1) (35)

a) Combinado con Conservadores Alimenticios

La inhibición de microorganismos por los diversos conservadores (benzoato, sorbato, etc.) se efectúa por las moléculas no disociadas cuya cantidad depende del pH del sistema al aumentar la acidez el número de moléculas no disociadas se incrementa y la actividad del conservador es acrecentada. (35) (57)

b) Productos de Carne

Un método para conservar la carne, es el curado o encurtido. Los ingredientes que se utilizan son los siguientes: nitrato de sodio, cloruro de sodio, azúcar, ácido málico (ácido cítrico, ácido acético). El ácido se agrega en pequeñas cantidades para acelerar la reacción del nitrito a ácido nitroso, el cual se combina con la mioglobina, formando

el color rojo estable de las carnes curadas (se forma nitrosohemocromo rosa). El ácido málico ayuda a evitar cambios de color en la carne y ayuda a la preservación de la misma al combinarse con el ácido acético. (10) (14)

c) En Jamón

Provee el ion hidrógeno requerido para que actúe la pectina dándole consistencia y sabor ácido requerido. (58)

d) Sustitución de Vinagre

El ácido málico ha sido aprovechado en Estados Unidos como un sustituto de vinagre (especificaciones Militares No MILV-35017E). (13)

1.2) Dulces

a) En Inversión de Azúcares

El proceso de ebullición de soluciones de sacarosa se puede hacer en presencia de ácido málico. Se lleva a cabo una hidrólisis en la cual se forman azúcares en reducción (dextrosa y levulosa) que se conocen como azúcares invertidos. La velocidad de la inversión está influenciada por la temperatura, el tiempo de calentamiento y el valor del pH de la solución

b) En Dulces y Gomas de Mascar

Acrecenta el sabor, se incorpora fácilmente por su bajo punto de

fusión y su gran solubilidad en agua, balancea el sabor dulce (excesiva azúcar) sin dejar una sensación persistente. Las sales de calcio que se formen con el uso del ácido málico tienen mayor solubilidad que las que se forman con otros ácidos y por esto la claridad del producto no se enmascará por el precipitado de las sales de calcio. (3) (10) (35) (13)

c) Manufactura de Chocolate

En cobertura de chocolate las invertasas se añaden para descomponer los disacáridos, monosacáridos. Como la invertasa es sensible al pH el uso de ácido málico da más amplitud a la formulación y evita el desarrollo de microorganismos en la superficie, evita también la rancidez de el chocolate.

En jarabe de chocolate proporciona la acidez requerida para que actúen los conservadores, sin dar un sabor ácido fuerte.

d) Gelatinas, Mermeladas y Conservas

En gelatinas el ácido málico ajusta el pH, suministra el balance de sabor, da buena textura y una adecuada característica del gel. En mermeladas y conservas acrecenta el sabor de la fruta y ajusta el pH en el rango de uso de las pectinas. (14) (13)

e) Agar y Pectinas

Ambos productos son sensibles al pH siendo su óptimo 3.2 y valores menores (para formación del gel) el ácido málico proporciona el pH deseado, funciona como amortiguador y mejora la calidad del gel. (14)

En Jalsas. Por ser un producto semisólido de jugo de frutas se adiciona pectina y ácido málico para suplir las diferencias de los cambios de la fruta (contenido de ácido).

La formación del gel depende principalmente de la combinación de pectina, azúcar y ácido. (14)

1.3) Frutas y Vegetales.

a) Vegetales y Frutas enlatados.

El ácido málico se adiciona para optimizar y fijar el sabor de las frutas y vegetales, éstos se encuentran en diferentes condiciones las cuales dependen de la región que provienen del grado de madurez y el tiempo que llevan almacenados (factores que afectan el contenido de ácidos naturales). Se ajusta el pH durante el proceso de esterilización, teniendo la propiedad de inhibir el desarrollo de bacterias con lo cual se puede minimizar los tiempos y temperaturas de esterilización, mejorándose con esto la apariencia, sabor, textura, aumentando también la vida de anaquel de los alimentos procesados. (13)

(29)

b) Prevención del Manchado y Putrefacción en Frutas y Vegetales frescos.

El oscurecimiento enzimático que se produce en tejidos de frutas y vegetales que han sido rotos por cortes, tajadas, molidos y mondados, puede controlarse con el uso de ácido málico combinado con el ácido ascórbico.

La preservación de frutas puede llevarse a cabo por fumigación de las mismas con una solución de ácido málico al 0.025%, benzoato de sodio al 0.020%, ácido ascórbico al 0.002%, en agua. Esta solución puede agregarse también en forma de hielo triturado. La putrefacción de frutas se reduce con una solución de ácido málico al 0.03% de ácido acético al 0.2 a 0.5%. (10) (57) (13)

c) Helados y Sorbetes de Frutas.

El ácido málico provee un sabor y olor más natural, fijando el sabor de las frutas. (22)

1.4) Aceites y Grasas

a) Inhibición de rancidez en Aceites y Grasas.

El ácido málico tiene una función sinérgica con los antioxidantes, funciona como un agente secuestrante de metales, protege a los aceites vegetales durante el proceso de fabricación. Se agrega en pequeñas cantidades como ayuda para eliminar metales pesados como hierro, cobre (actuando como agente quelante), de no eliminarse estos metales servirán como catalizadores de la oxidación de la grasa, haciéndola incomedible o desagradable al paladar. (13) (2)

1.5) Estabilidad del Color

a) Estabilidad del Color e Inhibición de la Descoloración.

El ácido málico tiene la propiedad de fijar el color en

productos alimenticios a los cuales fue necesario agregar colores artificiales, estabiliza tambien el color de los productos naturales no permitiendo grandes cambios en su color natural. (57)

1.6) Bebidas

a) Bebidas Carbonatadas.

El dióxido de carbono presente en las bebidas carbonatadas se forma en presencia de ácido málico, dando un sabor especial, ejerce una acción preservativa en bebidas que no se han sometido a tratamiento térmico. (22) (33) (58)

b) Bebidas no Alcohólicas o Dulces.

El ácido funciona como agente amortiguador controlando el grado de acidez en la bebida. (6)

c) Bebidas con Endulzantes Artificiales.

El ácido málico en este tipo de bebidas tiene la propiedad de enmascarar o suprimir el sabor amargo posterior que dejan los azúcares artificiales como son la sacarina y el aspartamo. El ácido tiene la propiedad de actuar sinérgicamente con el endulzante y por esta propiedad los niveles de azúcares artificiales pueden ser reducidos en un 10 a 20%. (13)

d) Bebidas y Polvos deshidratados.

Suministra acidez y bajo pH, estabiliza el color del polvo y preserva el sabor. (20) (22)

e) Jarabe y Esencias de Frutas.

Ayuda a la preservación del sabor. (3)

f) Para Néctar de Jugos y Frutas.

Imparte un sabor fuerte pero grato, secuestra iones de metales pesados, suministra acidez y pH y estabiliza el color del néctar de fruta, armoniza el sabor de combinaciones de frutas. (3)

g) En Vinos.

Uno de los principales ácidos presentes en uvas y vinos es el ácido málico, su presencia es muy importante para que se lleve a cabo la fermentación malo-láctica, donde se degrada el ácido málico a etanol y CO_2 . La escasez o falta del ácido puede producir una fermentación inadecuada por lo que es necesario adicionar ácido málico al mosto. (6)

(7) (21)

COMPOSICION DEL MOSTO Y VINO

	% MOSTO	% VINO
AC. MALICO	0.1 A 0.8	0.0 A 0.6
ALCOHOLES	TRAZAS	8.0 A 15.0

h) Control de pH

La mayoría de bebidas, jugos de frutas naturales, concentrados de frutas, requieren de control de pH. El ácido málico por alto índice de amortiguación lleva a cabo este efecto, no permitiendo cambios bruscos de pH que puedan afectar las características de las bebidas.

(3) (56)

2) QUIMICA

2.1) Como Intermediario en Síntesis Químicas.

Mostando en reactividad del ácido málico.

2.2) Para Eliminar Contaminantes en Gomas.

Por su propiedad de agente quelante elimina iones metálicos en la purificación de gomas. (22)

2.3) En Pinturas y Lacas.

Inhibe la aglomeración o gelación que se pueda producir en las pinturas, control de pH. (3)

2.4) Como Amortiguador.

El ácido málico establece un equilibrio entre el ácido y la sal, con lo cual el pH es estable y resiste cambios en el pH cuando otros ingredientes se agregan al sistema. (14)

2.5) En Fumigación.

Para la fumigación de frutas y vegetales rojos (tiene alto contenido de sorbato), se usa el ácido málico como agente auxiliar combinado con el agente fumigante (metabisulfito). (6)

2.6) En Fotografía.

Para ajustar el pH de las soluciones que se utilizan y como un componente de la impresión con la emulsión de plata y estabilizar el color en el papel copia sensible. (3)

2.7) Para Lavado de Textiles.

Afirma, retiene y estabiliza el color de las fibras textiles, como amortiguador durante la dispersión del tinte. (35) (32)

3) METALURGIA

3.1) Como Agente Quelante.

El ácido málico tiene la habilidad de quelar que es la pérdida de iones metálicos como son hierro y cobre, estos iones pueden retardar o inhibir ciertas reacciones químicas y se encuentran como impurezas de determinados metales. (3) (35)

3.2) Limpieza de Metal.

El ácido málico en una solución de 1 a 10% limpia metales ferrosos y no ferrosos sin causar corrosión fuerte, combinado con amoníaco funciona como pulidor químico de aluminio y cobre. (11) (13)

3.3) Enchapado y Galvanizado.

La galvanización que es el proceso de recubrimiento de metales ferrosos. Antes del recubrimiento se debe de limpiar el metal, el ácido málico funciona como un desengrasante y quitaóxido del metal. En enchapado funciona de igual manera limpiando la parte donde se va a soldar el metal. (3) (68)

4) FARMACEUTICA

4.1) En Pastillas y Tabletas Efervescentes.

El ácido málico genera dióxido de carbono al combinarse con carbonato o bicarbonato o algún químico similar. Se prefiere el ácido málico por su baja higroscopicidad que evita cambios de color, desprendimientos de gas, prematura efervescencia. (3) (10) (35)

4.2) En Suspensiones, Jarabes, Elixir.

Funciona como amortiguador, controla el pH, resalta el sabor de la fruta y enmascara el sabor del medicamento. (35)

4.3) En Dentríficos.

Se usa en tabletas dentrificas para remover carbohidratos. Los ingredientes de la tableta son los siguientes: ácido málico 4%, sorbitol 92%, cloruro de sodio 2%, fosfato tricálcico 2%. Estos ingredientes no son fermentados por bacterias. (45)

4.4) Cosméticos.

Ajusta el pH, como agente antioxidante de los aceites esenciales, como conservador evitando desarrollo de bacterias y para aumentar la acción de los metil parabenos. (44)

CAPITULO V

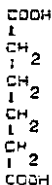
COMPARACION CON OTROS ACIDOS

1) COMPARACION CON OTROS ACIDOS

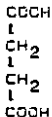
En diversas areas se involucra el uso de acidos organicos como son acetico, adipico, citrico, fosforico, fumarico, láctico, málico, succinico, tartárico. (27)

Fórmulas Químicas

Ac. Acético



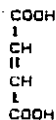
Ac. adipico



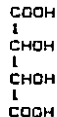
Ac. succinico



Ac. Láctico



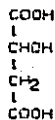
Ac. fumarico



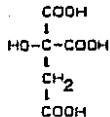
Ac. tartárico



Ac. Fosforico



Ac. málico



Ac. citrico

INELA COMPOSITION DE LAS PROPIEDADES DE METODOS DIFERENTES A 25°C

	INCLIDO INCLUIDO	INCLIDO INCLUIDO	INCLIDO INCLUIDO	INCLIDO INCLUIDO	INCLIDO INCLUIDO	INCLIDO INCLUIDO	INCLIDO INCLUIDO	INCLIDO INCLUIDO	INCLIDO INCLUIDO
	INCLUIDO INCLUIDO	INCLUIDO INCLUIDO	INCLUIDO INCLUIDO	INCLUIDO INCLUIDO	INCLUIDO INCLUIDO	INCLUIDO INCLUIDO	INCLUIDO INCLUIDO	INCLUIDO INCLUIDO	INCLUIDO INCLUIDO
Experiencia	Italiano Italiano	Italiano Italiano	Italiano Italiano	Italiano Italiano	Italiano Italiano	Italiano Italiano	Italiano Italiano	Italiano Italiano	Italiano Italiano
Sistema Coexistente	Italiano Italiano	Italiano Italiano	Italiano Italiano	Italiano Italiano	Italiano Italiano	Italiano Italiano	Italiano Italiano	Italiano Italiano	Italiano Italiano
Peso Molecular	154.05	116.7	146.14	119.07	125.12	150.09	124.05	124.05	124.05
Salvo	Na	H	H	H	H	H	H	H	H
Formula Empírica	C ₄ H ₆	C ₄ H ₄	C ₄ H ₄	C ₄ H ₄	C ₄ H ₄	C ₄ H ₄	C ₄ H ₄	C ₄ H ₄	C ₄ H ₄
Punto de fusión °C	130.0 - 132.0	84.0 - 107.0	153.0	108.0	153.0	175.0	175.0	175.0	175.0
Viscosidad específica	1.601	1.455	1.700	1.574	1.542	1.750	1.709	1.709	1.709
Densidad 15°C	87.3	32.6	49.5	53.0	56.2	50.2	50.2	50.2	50.2
Subilidad en etil al 25°C	39.16	4.3	16.10	9.0	56.9	19.0	19.0	19.0	19.0
Subilidad en cloro- formo al 25°C	0.04	0.02	<0.01	0.02	<0.01	0.04	0.04	0.04	0.04
Constante de ionización K ₁ K ₂ K ₃	4 x 10 ⁻⁴	8 x 10 ⁻³	3.7 x 10 ⁻¹	6.5 x 10 ⁻¹	4.2 x 10 ⁻⁶	1.04 x 10 ⁻³	1.04 x 10 ⁻³	1.04 x 10 ⁻³	1.04 x 10 ⁻³
Color de combustión	-320.1	-320.0	-488.0	-357.1	-474.5	-267.1	-267.1	-267.1	-267.1
Color de Solución	-4.3	-	-	-	-	3.9	3.9	3.9	3.9
Viscosidad 50°C	6.5	Idem	Idem	Idem	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
Energía libre de formación para la unión, M.F. (cal)	-201.90	-144.41	-	-144.37	-278.81	-	-	-	-
Viscosidad específica de 5 vol una solución 25°C	1.210	1.000	1.002	1.012	1.241	1.24	1.24	1.24	1.24
Viscosidad específica de 5 vol una solución 75°C	1.310	0.789	1.032	1.076	1.331	1.33	1.33	1.33	1.33
Calor de fusión	2.6	-	-	4.2	3.1	3.0	14.75	14.75	14.75
H ₂ PK + PK	5.0	-	-	5.2	4.8	4.3	4.3	4.3	4.3
Índice de amortiguación	3.26	3.46	-	2.90	2.41	3.13	3.13	3.13	3.13

Estos ácidos son usados principalmente en la tecnología de alimentos y su uso se ha incrementado debido a que los alimentos (frutas y verduras) presentan variaciones en el contenido de sus ácidos naturales y al ser procesado es necesario adicionar acidulantes, para optimizar el proceso con un rango de seguridad y de esta manera mantener un sabor uniforme (estandarización del producto). La elección de cada uno de ellos depende del gusto o sabor que se quiere proporcionar al alimento. (10) (17)

Cada acidulante presenta variaciones en su gusto y sabor y estas se describen como sigue en la Tabla V-2.

TABLA V-2

ACIDO	Gusto o Sabor
CITRICO	Limpio, Puro
MALICO	Grato, Suave
FUMARICO	Metálico
ADIPICO	Calcarso
ACETICO	Astringente, Severo
TARTARICO	Fuerte o Amargo
LACTICO	Amargo
FOSFORICO (INORGANICO)	Amargo, Acidez uniforme

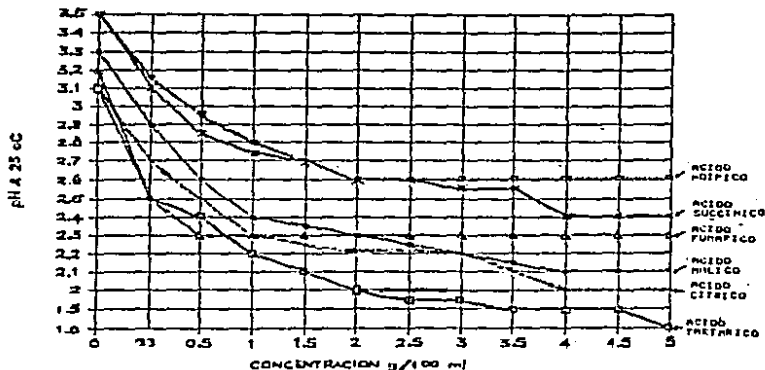
La selección del ácido o ácidos adecuados nos incrementa o afirma el espectro total de sabor requerido, nos minimiza o enmascara sabores indeseables como el de los azúcares artificiales y medicamentosos.

1.1) Sustitución de un ácido por otro.

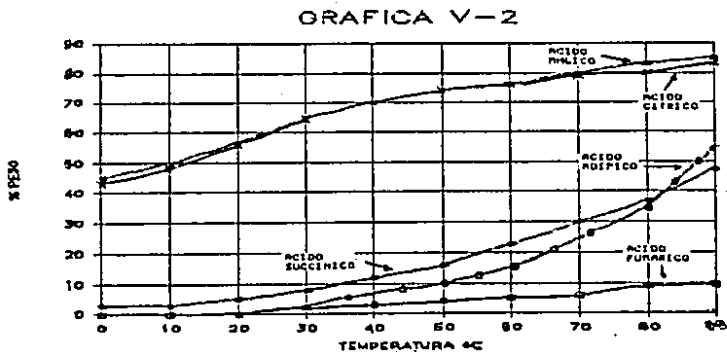
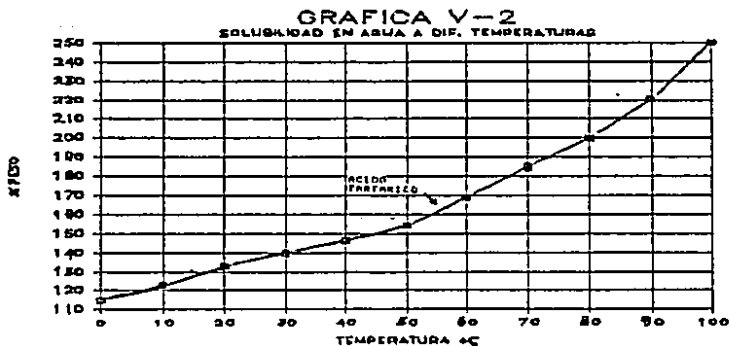
En vista de las diferencias de sabor que producen los diferentes acidulantes, siendo unos más complementarios para determinados sabores y tomando en cuenta la presencia de los ácidos en los alimentos crudos, su uso debe proporcionar un sabor superior lo más similar posible al natural ya sea usando el acidulante individual o combinado entre sí o con sabores químicos, extractos, esencias y sabores aromáticos.

Para seleccionar o sustituir un ácido por otro se deben de tomar en cuenta las propiedades de cada uno de los acidulantes (Tabla V-1), ya que en igualdad de concentraciones varía la habilidad o propiedad que tienen para reducir el pH, dando diferentes niveles de acidez, grado o intensidad del sabor ácido. Esta propiedad se muestra en la Gráfica V-1. (10) (22)

GRAFICA V-1



solubilidad en agua a diferentes temperaturas, el comportamiento de los diferentes acidos se muestra en la Gráfica V-2.



Por estas propiedades un ácido no puede ser sustituido por otro en una relación de concentración con peso base.

También para la sustitución de un ácido puede tomarse en cuenta la siguiente tabla como un punto de partida, ya que los valores de porcentaje que se dan están basados únicamente en experiencias, donde se le asigna al ácido cítrico el 100% de acidez. (Tabla V-3)

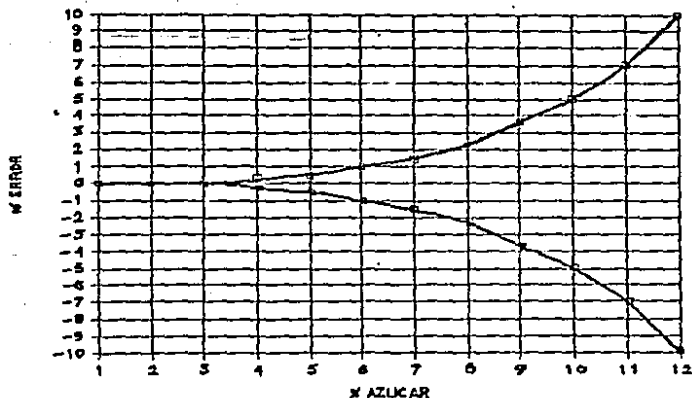
TABLA V-3.- PORCENTAJE DE ACIDEZ. (10)

ACIDO	% ACIDEZ
CITRICO	100
FOSFORICO	55 - 60
FUMARICO	67 - 72
MALICO (FRUTAS)	78 - 83
TARTARICO	80 - 85
MALICO (CITRICOS)	89 - 94
ADIPICO	100 - 115

Un factor más que debe ser tomado en cuenta para la sustitución o elección de un ácido es el juicio humano, ya que algunas personas tienen la capacidad de diferenciar los niveles de acidez; como por ejemplo en las encuestas realizadas por Allied Chemical's Buffalo Research Center (1974), con 142 personas, determinaron la habilidad de la gente para detectar los niveles de concentración de ácido en agua: se usaron las siguientes concentraciones de ácido málico 0.00 %, 0.015 %, 0.030 %, 0.040 %; obteniéndose como resultado que el 17 % (24 personas) distinguieron los diferentes niveles de acidez. En otra encuesta realizada con 42 personas usando ácido málico en solución de azúcar de 8 y 12 Grados Brix respectivamente.

La concentración de ácido málico fue de 0.079 %, 0.106%, se observó que las personas tienen más habilidad para detectar pequeñas diferencias en los niveles de ácido y esta habilidad decrece proporcionalmente con el incremento en la concentración de azúcar, encontrándose que con el 12% de azúcar hay un error de $\pm 10\%$ y con 8% de azúcar hay un error de $\pm 2.5\%$, estos resultados se muestran en la Gráfica V-3. (10)

GRAFICA V-3.

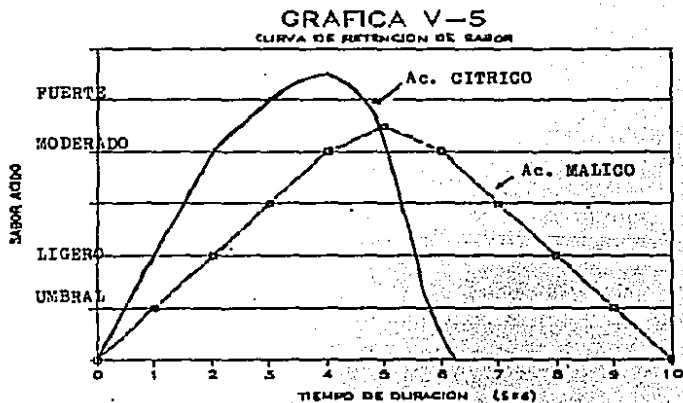


2) COMPARACION CON ACIDO CITRICO

Raramente en la naturaleza se encuentran en frutas y vegetales un solo ácido, normalmente unos son más predominantes y se encuentran reforzados por otros ácidos en menor proporción. Siendo el ácido málico y el cítrico dos ácidos predominantes que se encuentran asociados en la naturaleza y teniendo actualmente el ácido cítrico más uso comercial se dan los siguientes puntos de comparación de las propiedades de cada uno:

a) Retención del Sabor.

El perfil de sabor de ácido cítrico y málico se muestra en la Gráfica V-5.



La tendencia que tiene el ácido cítrico es la de un sabor inmediato con corta duración y la del ácido málico es la de un

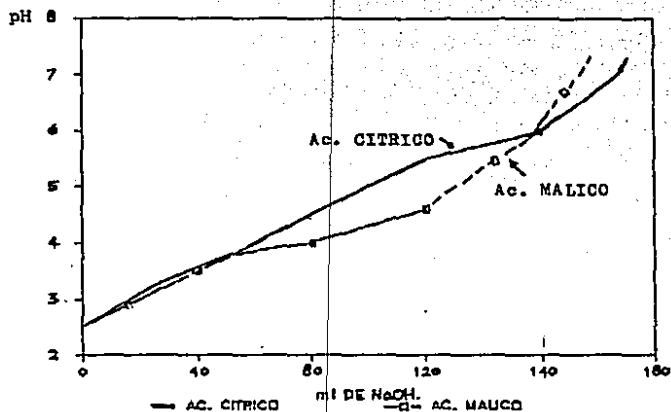
sabor que permanezca por más tiempo y va disminuyendo gradualmente sin dejar una sensación de sabor fuerte. (13)

b) Curva de Titulación de ácido málico y ácido cítrico.

Las características de retención del sabor que tiene el ácido málico es debido a que tiene mayor acidez que el ácido cítrico, ésta es estimada y demostrada con una curva de titulación de acidez (pH contra la acidez titulable con NaOH) (Gráfica V-6).

(2)

GRAFICA V-6.



Se observa en la gráfica que con la misma cantidad de NaOH hay mayor acidez con el ácido málico y por lo tanto para obtener la acidez deseada se necesitan cantidades más bajas con respecto a las del ácido cítrico para obtener la misma acidez.

c) Solubilidad.

La solubilidad del ácido málico y del ácido cítrico es muy parecida, teniéndose ligeras diferencias que se demuestran con los siguientes porcentajes de solubilidad (Tabla V-4).

TABLA V-4.- SOLUBILIDAD DE ACIDO MALICO Y CITRICO

TEMPERATURA (°C)	SOLUBILIDAD AC. MALICO % EN PESO	SOLUBILIDAD AC. CITRICO % EN PESO
0	47%	45%
10	51	50
25	58	56
75	80	78-79

Esta característica favorece que los ácidos se puedan mezclar tanto en formulaciones líquidas como en polvo. (3) (22)

d) Solubilidad de sales de calcio.

La solubilidad de cada uno de los ácidos se demuestra de la siguiente manera en la Tabla V-5. (13)

TABLA V-5.- SOLUBILIDAD DE SALES DE CALCIO

CANTIDAD EN GRAMOS DE SALES DE CALCIO	CANTIDAD DE AGUA EN QUE ES SOLUBLE LA SAL DE CALCIO
0.09 g DE CITRATO DE CALCIO	100 g DE AGUA
0.3 g DE MALATO CALCIO	100 g DE AGUA

Como se observa la solubilidad es mayor con las sales del ácido

malico, esta característica es de gran importancia en productos en cuyas formulas se usan aguas duras, las sales de calcio que se forman tienden a precipitarse opaleciendo el producto. Con el uso de acido malico este problema se minimiza.

e) Sustitución de un ácido por otro.

Los fabricantes de acido malico reportan que el acido citrico ha sido sustituido por el acido malico en los siguientes sabores; Cereza en 92%, Frambuesa en el 90%, Limon en el 94%. Reportan que en promedio una libra (0.454 kg) de acido citrico puede ser sustituido por 0.92 libras (0.417 kg) de acido malico. (3)

Actualmente el uso de acido malico en combinacion con azúcares artificiales como el aspartamo y la sacarina. En comparacion con el acido citrico se usa en un 10 a 20% menos de acido malico encontrandose niveles de acidez iguales a la proporcionada por el acido citrico; se demostro, tambien que el uso de acido malico suprime los sabores amargos que dejan los azúcares artificiales siendo preferido el acido malico en una relacion de 2 a 1 sobre el acido citrico. (13) (26)

Usando el aspartamo se utiliza el 21.8 menos de acido malico en comparacion con el acido citrico, ademas se reduce la cantidad de aspartamo en 10 a 20%, esto representa cierta economia en los procesos donde se utiliza. (refrescos y bebidas dieteticas). (13)

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

Las conclusiones que se infieren del estudio realizado son las siguientes:

El ácido málico ha sido motivo de estudio desde el año de 1785 y con el tiempo ha tomado gran importancia debido principalmente a que es un intermediario en los ciclos metabólicos del organismo humano y de los sistemas biológicos.

El ácido málico junto con el ácido cítrico se encuentra en la mayoría de frutas y vegetales en forma natural en cantidades variables y por consiguiente, el ácido málico forma parte de la dieta humana, encontrándose en forma natural en el cuerpo. Partiendo de este fundamento puede deducirse que el ácido málico se encuentra en forma intracelular llevando acabo funciones propias del metabolismo celular y en forma extracelular manteniendo parte del equilibrio ácido-base que mantiene el pH de la sangre, por medio de absorción y oxidación del mismo.

Actualmente en varias ramas de la industria se involucra el uso de ácido málico principalmente en la industria alimenticia, donde se utilizan diversos acidulantes siendo el más utilizado el cítrico. En el presente trabajo se ha demostrado que el ácido málico a pesar de que tiene características muy parecidas a las del ácido cítrico presenta ventajas representativas en cuanto a su uso.

Como acidulante el ácido málico se usa en un 10 a 20% menos con respecto al ácido cítrico, esto trae como consecuencia que el proceso en

el cual se utilice tenga más rendimiento, además tiene otras ventajas como son: su alta solubilidad, el bajo pH que proporciona a bajas concentraciones, el no afectar las características naturales del alimento y mantener y acresentar sus propiedades como son sabor, olor, proporcionando estabilidad y preservación al alimento.

Tomando en cuenta sus propiedades físicas y químicas el ácido málico puede combinarse en los sistemas alimenticios ya sea líquidos o en polvo. Es un producto que no requiere gran cuidado debido a su baja higroscopicidad.

Los métodos de identificación y cuantificación del ácido málico se realiza principalmente con extracto de frutas, siendo los más exactos y confiables la cromatografía de gases y la cromatografía de intercambio iónico.

La determinación cuantitativa del ácido málico es importante en determinados productos, por ejemplo en la fermentación de vino, ya que la presencia de éste en el mosto nos da la calidad del vino (fermentación maloláctica). Es importante también determinar la cantidad de ácido málico en frutas y verduras las cuales han perdido sus propiedades por el proceso al que fueron sometidas, de esta determinación se puede tener una base para agregar la cantidad adecuada de ácido málico y así mantener o acresentar el sabor natural del alimento.

De los métodos de obtención de ácido málico los principales y más productivos son los procesos químico o sintético y el proceso enzimático. El proceso de extracción de productos naturales no es

37

costoable debido a que el contenido de ácido málico en las frutas se encuentra en cantidades relativamente bajas por lo que se necesitan grandes volúmenes de frutas para obtener el ácido málico a nivel industrial.

El proceso fermentativo no se ha llevado a cabo a una escala comercial y la producción está limitada a nivel laboratorio, ya que la cantidad de ácido málico que se obtiene es muy poca y en el mismo proceso fermentativo se producen otros ácidos orgánicos que incrementan los costos de su purificación.

En cuanto a las ventajas o desventajas de los dos métodos principales de obtención, a nivel industrial de ácido málico es importante tomar en cuenta el lugar o país donde se desarrolle el proceso de fabricación. Así el método que se elija depende esencialmente de las materias primas que se disponga, por ejemplo en Canadá y Estados Unidos, así como en otros países Europeos el método de fabricación es por síntesis química, como un derivado del petróleo. La fabricación de ácido málico mediante el proceso enzimático no resulta costoable por el alto costo de la enzima. En cambio para países como Japón, cuyo recurso petroquímicos son limitados y tomando en cuenta que su industria de biosíntesis es muy desarrollada, el método de elección es el enzimático.

En este proceso las cantidades de ácido málico que se producen en la columna de células inmovilizadas son significativas y a un costo que permite su comercialización. La productividad de este método se debe a la actividad enzimática, a la alta estabilidad operacional y al bajo costo de la enzima.

El uso del ácido málico en nuestro país a pesar de sus ventajas es muy limitado, siendo actualmente más caro comparado con el precio del ácido cítrico (en proporción de 4 a 1) que es el acidulante de elección. Su elevado costo se debe a que el ácido málico que se consume aquí en México es de importación, proveniente de Estados Unidos. Lo ofrecen dos proveedores comerciales a precios diferentes los cuales fluctúan dependiendo de los gastos de importación.

Con este estudio inicial se abre el camino para realizar aquí en México investigaciones para la fabricación industrial en las que se establezcan los criterios y condiciones de producción. En la información que se describe a lo largo de este trabajo queda definida la tecnología a nivel laboratorio o industrial que utilizan otros países en la obtención de ácido málico.

Tomando en cuenta la disponibilidad de petróleo que se tiene en México es conveniente estudiar el método sintético, ya que la producción por este camino sería ventajosa por la infraestructura con la que se cuenta, así el costo del ácido málico se puede abatir sustancialmente siendo competitivo con el ácido cítrico.

APENDICE

EXTRACTOS SOBRE
METODOS DE
OBTENCION

1) METODOS QUIMICO-SINTETICOS

1.1) Acido Mállico Grado Comestible.

Se preparó un producto para uso comestible, a partir de la hidratación de ácido maléico o fumarico o de sus anhídridos seguido por hidrogenación. Una mezcla de anhídrido maléico y agua fue calentado por 4 horas a 180°C y 150 psi en una autoclave, después la mezcla fue colectada, enfriándose. El ácido mállico fue filtrado y tratado con hidrogenación sobre Pb/C a 25°C y 50 psi por una hora, se filtra y se trata con carbón a 50°C y se evapora para formar cristales de ácido mállico. (5)

1.2) Manufactura de Acido Mállico.

La síntesis de ácido a partir de ácido maléico o fumarico en una zona de reacción cuya superficie está expuesta a la mezcla reaccionante que contiene titanio, zirconio, tantalum. (11)

1.3) Proceso para la Purificación de Acido Mállico.

El proceso para la purificación de ácido mállico en solución acuosa que contiene ácido maléico y ácido fumarico e impurezas, consiste en el paso directo a una columna de aniones fuertemente básicos. (63) (72)

1.4) Purificación de Acido Mállico.

El proceso de purificación de ácido mállico crudo que contiene

ácido málico y fumárico, comprende los siguientes pasos:

a) Ajustar la solución de ácido málico a una concentración cerca de 40% a una temperatura dentro del rango de 0°C y 50°C, después sobre la saturación la temperatura debe mantenerse sobre 10 y 15 C.

b) Separación sólidos de ácido fumárico de la lechada resultante.

c) Concentración del licor madre obtenido en el paso b y recuperar el ácido málico purificado que tiene alrededor de 500 ppm de ácido málico y cerca de 7500 ppm de ácido fumárico. (46) (63)

2) EXTRACCIÓN DE VEGETALES

2.1) Extracción de Ácidos Orgánicos de Vegetales.

Los ácidos orgánicos son extraídos de materiales vegetales por exprimido y filtrado del jugo y añadiendo H_2SO_4 para originar la sal y dejar libre el ácido málico. Se añade $CaCO_3$ para llevar el pH a 7.0 y volver a agregar H_2SO_4 hasta pH menor de 1.5. El líquido resultante es filtrado y evaporado, los ácidos producidos se presentan como productos sólidos. De esta manera los ácidos málico y tartárico fueron extraídos. (79)

3) METODOS ENZIMATICOS

3.1) Ácido L-Málico de Ácido Fumárico.

El fumarato de sodio fue convertido a ácido L-málico por tratamiento sobre una solución acuosa conteniendo granulos de vinil

polimero conteniendo un microorganismo inmovilizado que produce fumarasa. Se utiliza extracto de bilis para activar la inmovilización del microorganismo. (9)

3.2) Inmovilización de células de *Candida rugosa* con actividad de la fumarasa.

La inmovilización de células de *C. rugosa* que posee actividad de la fumarasa fue preparada por varios métodos encontrándose que la mayor actividad es usando células inmovilizadas en gel de poliácilamida. El efecto del pH y cationes divalentes en la actividad de células inmovilizadas y células nativas fue la misma. La actividad de la fumarasa inmovilizada permanece constante durante 91 días de almacenaje a 4-6°C y la columna de células inmovilizadas que fue usada para la producción continua de ácido málico, a partir de fumarato de sodio 1 M a 30°C y pH= 0.5. Esta columna tiene una vida media de la fumarasa inmovilizada a 30°C de 95 días. (77)

3.3) Acido L-Málico

El ácido L-málico es un producto de la catálisis de ácido fumarico por células o enzimas preparadas a partir de *Candida lipolytica*. Se cultiva en una mezcla conteniendo fumarato de sodio 81g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ la cual se incubó a 30°C por 20 horas. La producción fue de 90g/l. (78)

4) METODOS FERMENTATIVOS

4.1) Producción Microbiológica de Acido L-Málico.

El ácido L-málico fue producido por Aureobasidium pullulans (FERM-2760). Este microorganismo fue cultivado con agitación a 27°C por cinco días, en un medio conteniendo glucosa 50g, NaNO_3 1.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, extracto de levadura, CaCO_3 20g/litro. La producción fue de 25.2 g/litro, el sobrenadante fue tratado con Ambelita IR-126 (M) y absorbido en IRA-400 (HCOO) y eluido con HCOOH 6N. El eluido fue decolorado con carbón activado y concentrado. (80)

4.2) Producción de Ácidos Orgánicos por Levaduras.

Los ácidos orgánicos como succínico, málico, cítrico son producidos por cultivo de Brettanomyces pastophilum. El microorganismo fue cultivado aeróbicamente a 33°C por tres días en un medio conteniendo: hexanodecano 4g, urea 0.1g K_2HPO_4 0.15g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1g, MgSO_4 0.5g, CaCl_2 0.1g y extracto de levadura, pH=6.0. El cultivo fue filtrado y fraccionado por cromatografía en columna obteniéndose ácido succínico, málico y cítrico. (67)

4.3) Producción Fermentativa de Ácido L-Málico.

Candida brumptii IFB-731 fue cultivada aeróbicamente con agitación a 30°C por 7 días en un medio líquido (pH=6.2) con sorbitol, manitol o glicerol al 1.6%. La producción de ácido L-málico fue de 17.6, 16.2, 15.8 g/litro. (48)

4.4) Producción de Ácido L-Málico.

El ácido L-málico es preparado a partir de el cultivo de Candida hydrocarbofumarica, fue cultivada aeróbicamente a 30°C por 20 horas en

un medio conteniendo: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5g, KH_2PO_4 1.0g, MgSO_4 0.5g extracto de levadura, 1 litro de agua y CaCO_3 fue añadido en 2g/50ml. El cultivo fue incubado a 30°C por siete días se obtiene 6.2g/litro de ácido málico. (75)

4.5) Fermentación de Ácido L-Málico con fuente de carbono no de azúcar egr *Panicomyces*.

P. variotii tiene la capacidad de producir ácido L-málico a partir de acetato, propionato y etanol.

La cepa de *P. variotii* AHU 8007, 9254 y 9417 fueron las más efectivas entre 230 razas, produjeron ácido L-málico con un rendimiento de 27.5, 37.5 y 48.0% respectivamente.

4.6) Preparación de Fumarasa Termofílica

Una fumarasa termofílica (temperatura óptima $50-80^\circ\text{C}$) preparada de microorganismos como *Thermus* y *Bacillus* en cultivo son usados para la preparación de ácido L-málico. El *T. rubens* # 102 fue inoculado en tres litros de medio (pH = 7.0) conteniendo polipeptina 0.8g, extracto de levadura y NaCl 0.2 g/litro se incubó a $50 - 80^\circ\text{C}$ con aereación y agitación (300 rpm) por 24 horas.

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFIA

- (1) AHIGRON, CARL R.
Manufacture of Malic Acid, Allied Chemical Corporation, New York, 1964, (Patente No. 404, 166)
- (2) ATAM (ASOCIACION DE TECNOLOGOS EN ALIMENTOS DE MEXICO)
La tecnologia de Grasas y Aceites y sus Aplicaciones en la Industria Alimenticia, ATAM, Mexico, D. F. 1965; pags. 50-51.
- (3) BARTEK.
Folleto de Informacion de Acido Malico, Chemical Company Limite, Canada, Abril 1985; pags. 1-6.
- (4) BOHINSKY ROBERT C..
Bioguinica Trad. Maria A. Valenzuela, Mexico, Fondo Educativo Interamericano, 1978.
- (5) BREZINA VITZALAV.
Edible Grade Malic Acid, Czech. CS 211010., 1980 (Patente); 3pp.
- (6) BUSSY DE J.H.,
Materials and Technology, Vegetable Food Products First ed. U.S.A, Logman Grup Ltd., 1975, Vol. 1; pags. 850-864.
- (7) CASIDA L. E. JR.,
Industrial Microbiology, U.S.A., Hohn Wiley Sons INC 1968; pags. 406-407.

- (8) COOR, A. H.,
The Chemistry and Biology of Yeasts. New York, Academic Press
Inc., 1959; pages. 444-447.
- (9) CHIBATA ICHIRO,
L-Malic acid from Fumaric acid. Tenabe Seiyaky Co LTD Japan,
Ger. 1629447 (Patente).
- (10) DAVIDSO SIR STANLEY,
Human Nutrition and Dietetics. Sixth ed. New York: Churchill
Livingstone 1975; pages. 105-106.
- (11) DAVIS D. R.,
Effect of Selected Organic Acids on the Pitting of Tinplate Cans
in Model Systems. Journal of Food Science. Arkansas, Vol. 48,
1983; pages. 1148-1150.
- (12) DEIANA PIETRINO and FALICENTY FABRIZIO,
Malic acid production and consumption by Selected of
Saccharomyces Cerevisiae under anaerobic and aerobic conditions.
Italy. Applied Microbiology Biotechnology, 1984. Volumen 19;
pages. 427-429.
- (13) DENKA CHEMICAL CORPORATION,
Malic Acid Safety Data. Food Chemical Division, Houston Texas,
Enero 1984; pages. 1-6.

(14) DESROSIER NORMAN W.,

Conservacion de Alimentos, 13 ed., México, Ed. Continental
1984; págs. 325-326, 350-351.

(15) EUROPEO AMERICANA

Enciclopedia Universal Ilustrada, Madrid, Espasa Calpe, 1916,
tomo 32; págs. 524-526.

(16) FISHER HARRY J.,

Análisis Moderna de los Alimentos, Trad. Dr. Justino Burgos
González, Zaragoza España, Acribia 1971; págs. 56-62, 286-209.

(17) FOSTER DEE SNELLAM LESLIE S.,

Encyclopedia of Industrial, Chemical Analysis, U.S.A.
Interscience Publication 1984, Vol. 2; págs. 377-379.

(18) FOSTER DEE SNELLAM LESLIE S.,

Encyclopedia of Industrial, Chemical Analysis, U.S.A.
Interscience Publication 1984, Vol. 10; págs. 374-322.

(19) FOSTER DEE SNELLAM LESLIE S.,

Encyclopedia of Industrial, Chemical Analysis, U.S.A.,
Interscience Publication 1984, Vol. 12; págs. 135.

(20) FOSTER DEE SNELLAM LESLIE S.,

Encyclopedia of Industrial, Chemical Analysis, U.S.A.,
Interscience Publication 1984, Vol. 18; págs. 458-459.

- (21) FOSTER DEE SNELLAN LESLIE S.,
Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis, U.S.A.
Interscience Publication 1984, Vol. 19; págs. 411-423.
- (22) FURIA TOMAS E.,
Handbook of Food Additives, 2o ed., New York CRC Press, 1972;
págs. 239-241.
- (23) FURIA TOMAS E.,
Handbook Fenolis e Flavor Ingredients, 2o ed., Clevelan Ohio,
CRC Press Inc., 1971; págs. 675.
- (24) GOULD R. F.,
Enzimas in Food and Beverage Processing, Washington A. C.,
American Chemical Society ACS Symposium, serie 47, 1977; págs.
100-124.
- (25) GRUYTER WALTER D.E.,
Concise Encyclopedia of Biochemistry, New York, Walter Gruyter,
1983; págs. 262-263.
- (26) HANSEN P. ARTNUR.,
Malic Acid/Aspartame, Food Processing, Denka Chemical Corp.,
Houston Texas, July 1986; Boletín.
- (27) HARPER HAROLD A.,
Manual de Química Fisiológica, Septima ed., Ed. El Manual
Moderno, México, 1980.

- (28) HOAGLAND MEYER LILLIAN.,
Food Chemistry, Third Printing, U.S.A., Litton Educational Publishing, The Avi Publishing Company 1978; pags. 276-277,358.
- (29) HULME A.C.,
The Biochemistry of Fruits and Their Products, London, Academic Press, 1970, Vol. 19; pags. 96-109.
- (30) KENT-JAMES A.,
Manual Brevet de Química Industrial, Trad. I.Q. Antonio Eroles Gómez, México, Compañía Editorial Continental 1984; pags. 831-859.
- (31) KING EARLY J.,
Biochemistry Hand Book, Great Britain, Great Britain Company LTD 1961.
- (32) KIRK OTHMER.,
Encyclopedia of Chemical Technology, Third ed., U.S.A., John Wiley, 1976, Vol. 1; pags. 150-167.
- (33) KIRK OTHMER.,
Encyclopedia of Chemical Technology, Third ed., U.S.A., John Wiley, 1976, Vol. 4; pags. 442, 710-713.
- (34) KIRK OTHMER.,
Encyclopedia of Chemical Technology, Third ed., U.S.A., John Wiley, 1976, Vol. 9; pags. 861-864.

(42) KYOWA HAKKO,

Preparation of Thermophilic Fumarase and use of fumarase an fumarase producing microorganism preparation of L-malic acid. Kyowa Hakko Co. LTD, Jpn Kokai 79/118, 835. 18 Sep. 1979.

(43) LEACH ALBERT E.,

Food Inspection And Analysis. Fourth ed.. New York John Wiley. Sons Inc. Chapman J. Hall LTS 1945.

(44) MARK HERMAN F.,

Encyclopedia of Polymer Science and Technology. New York. Ed. Board, 1964 Volumen 1; págs. 70-71.

(45) MARTINDALE,

The Extra Pharmacopoeia. Twentr-Sixth Ed. Ia Pharmaceutical Press 1964; págs. 50-51.

(46) MATTHEW A. CULLEN JR.,

Purification of Malic Acid. Allied Chemical Corporation New York, N.Y. Hamburg N.Y. No. 520, 477 (patente)

(47) MERCK INDEX,

An Encyclopedia of Chemicals and Drugs. Ninth edition. Rahway, N.Y. U.S.A., Merck Co., INC. 1976.

(48) HINGOYA YASUJI,

Fermentative Production of L-Malic Acid. (Ajinomoto Co. Inc), Japan Kokai 76, 130, 587, 12 Nov. 1976. (patente)

(49) MONATSHEFTE OF CHEMICAL.

U.S.A., 1951. Volumen 12; págs. 129-130.

(50) MORRIS B. JACOBS,

Chemical Analysis of Food Products. Tercera ed., New York, Robert E. Publishing 1973; págs. 465-469.

(51) MORRISON ROBERT THORNTON,

Química Orgánica. Trad. Peter Fiedler E.U.A., Fondo Educativo Interamericano 1973.

(52) NOVELLI ARMANDO,

Química Orgánica. 2a ed., Buenos Aires, El Ateneo 1955. Vol. 1; págs. 570-590, 611, 648-655.

(53) OCKERMAN HERBER W.,

Source Book for Food Scientists. U.S.A. The Avi Publishing Company 1978 Volumen 1; págs. 311.

(54) PATTY FRANK A.,

Industrial Hygiene and Toxicology. 2a ed., New York Interscience Publishers, 1963 Volumen II; págs. 1813.

(55) PERLMAN D.,

Annual Reports on Fermentation Processes. U.S.A., Academic Press 1978 337p. Volumen 2 (págs. 91, 92, 93, 110)

- (56) PETERSON JOHSON,
Encyclopedia of Food Technology, U.S.A., The Avi Publishing
Company Westport Connecticut 1974 Volumen 2; págs. 1-6.
- (57) PINTAURO NICHOLAS D.,
Food Additives to Extend Shelf Life, U.S.A., Nicholas
Pintauro, 1974, Food Technology Review No. 17; págs. 100-115.
- (58) POTTER NORMAN N.,
La Ciencia de los Alimentos, Mexico, Ed. Edutex 1980.
- (59) ROSE A. H.,
Primary Products of Metabolism, London, Academia Press, 1978
Volumen 2; págs. 48-49, 90-91.
- (60) SATO SHUNICHI,
L-Malic Acid Production From n-Paraffins By, Candide Brumptyy
IFD-0731, Dep. de Agricultural Chemistry Tokyo, Agric Biol, Chem
Volumen 41, 6, 967, 973. 1977.
- (61) SCHWIMMER S.,
Source Book of Food Entomology, West port, Connecticut, The Avi
Publishing Inc. 1981. págs. 164-167.

(62) SHAW PHILIP AND WILSON CHARLES.

Organic Acids in Orange, Grapefruit and Cherry Juice Quantified by High-performance Liquid Chromatography Using Neutral Resin and Propylamine Columns. J. Sci Food Agric 1983, Volumen 34, Pags. 1265-1268.

(63) SHOJO SUMIKAWA.

Process For the Preparation of Malic Acid Crystals Filed. Japan 1975, (Patente No. 558296)

(64) TAKAO SHOICHI

L-Malic Acid fermentation on non-Sugar Carbon Sources by Pectinomyces variolii. Ability to produce malic acid from acetate, propionate and ethanol. Fac. Agric. Hokkaido Univ. Sapporo Japan Hokkaido Daigaku Noarubu Nobunkyo 1978, 11(1). 13-19 Japan

(65) TAKAO SHOICHI.

L-Malic acid Fermentation by Mixed Culture of Rhizopus arrhizus and Proteus vulgaris. Agric. Biol. Chem Sapporo 1977, Volumen 41 945-950.

(66) TAKATA ISAO.

Immobilization of Brevibacterium Flavum with Carrageenan and its application for continuous production of L-malic acid. Department of Biochemistry, Research Laboratory, Tanabe Seiyaku Co. Ltd. Osaka Japan, April 18, 1979. Vol. 2 January pags. 30-36.

(67) TAKEDA ISAO.

Organic Acid production by Yeast, Asahi, Chemical Industry Co. Ltd. Japan 1977. (Patente No. 7749, 060).

(68) THERENT MICHEL,

Diccionario Enciclopedia de Metalurgia. Trad. Antonio Manclustora, 2da. ed., Barcelona Esp., 1969.

(69) THOPER SIR EDWARD,

Enciclopedia de Química Industrial, Madrid. Ed. Especial, No. York, Ed. Labor; págs. 561-563.

(70) TOSA TETSUYA,

Kinetics and Decay of Fumarate Activity of Immobilized Brevibacterium Ammoniaques Cells, For Continuous Production of L-malic Acid. Biotechnology and Bioengineering Osaka, Japan 1977 Vol. XIX, Págs. 1101, 1114.

(71) WAYNE H. FITCHER.,

Immobilized Enzymes Food Processing, Florida U.S.A. CRC. Press Inc., 1980.

(72) WINSTROM LEON O.

Purification of crude Malic Acid Liquors. Allied Chemical Corporation New York, N.Y. a Corporation of New York filed 1964, (patente No. 419540)

(73) WINTON ANDREW L.

The Analysis of Food, U.S.A., John Wiley J. Sons Inc. copman J. Hall 1945; page. 585-587.

(74) WOODMAN W. G.,

Food Analysis, Fourth ed, New York, Mc Graw Hill Book Company Inc., 1952, page. 322, 451.

(75) YAMADA KOICHI,

L-Malic Production, Mitsui Petrochemical Industries LTD, Japan 78. 24, 315, 21 Jul. 1978.

(76) YAMAMOTO KOZO,

Continuous Production of L-Malic Acid by Immobilized *Saccharomyces amoniasces* Cell., European Journal of Applied Microbiolog, Osaka, Japan, Oct 1985, Volumen 3 169-183.

(77) YANG LIAN WAN,

The immobilized Cells of *Candida rugosa* possessing fumarase activity, Inst Microbiol, Acad Sin, Peking Rep. de China wei Sheng Wu Hsueh, page. 1980 20(3) 296-302.

(78) YASUDO AKIRA,

L-malic Acid, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. Japan Kokai Tokkyo Kano, 7976, 894, 19 Jun. 1979.

(79) YAT KING LEC.

Extraction of Organic acids from Vegetable matter Brit. Hk. pat
appl 2031, 419, 23 Apr. 1980.

(80) YOSHIHIRO TSURUMI,

Microbial Production of L-Malic Acid. Mitsubishi Gas Chemical
Co. Ltd. Japan Kokai 7679, 783, 12 Jul. 1978.