

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS

PRODUCCION DE ACIDO CITRICO
POR FERMENTACION DE MIELES
FINALES EN CULTIVO SUMERGIDO

TESIS

QUE PARA SU EXAMEN PROFESIONAL DE QUIMICO
PRESENTA

FEDERICO MARTINEZ ZAMORA

2023



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS

**PRODUCCION DE ACIDO CITRICO
POR FERMENTACION DE MIELES
FINALES EN CULTIVO SUMERGIDO**

TESIS

**QUE PARA SU EXAMEN PROFESIONAL DE QUIMICO
PRESENTA**

FEDERICO MARTINEZ ZAMORA

MEXICO, D. F.

1950

*Para mis queridos Padres,
que con sus sacrificios
hicieron posible mi carrera.*

*Para mi hermano Jorge,
como estímulo y anhelo.*

*Para mis maestros y amigos,
que redimieron mi espíritu*

e

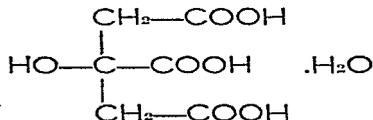
*hicieron más gratas
mis horas de estudio.*

*A los H. miembros
de mi jurado.*

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología Química de la Escuela Nacional de Ciencias Químicas, bajo la dirección del Profesor Alfredo Sánchez Marroquín, Director del Instituto de Microbiología Experimental en el Instituto Politécnico Nacional, a quien desde aquí doy las más expresivas gracias por sus consejos y ayuda.

INTRODUCCION

El ácido cítrico, es un sólido que forma cristales incoloros translúcidos cuando está hidratado y un polvo cristalino blanco, cuando está anhidro. Cuando se cristaliza de una solución acuosa y fría, toma una molécula de agua. Los cristales son del sistema ortorrómbico, tienen una gravedad específica de 1.553 y la siguiente fórmula:



Estos cristales son estables en una atmósfera de humedad ordinaria; pero si se dejan permanecer en aire seco eflorescen rápidamente (31).

La forma anhidra del ácido cítrico, cristaliza en prismas monoclínicos con una gravedad específica de 1.665. El agua de cristalización de la molécula hidratada se pierde a 130° C., y si el calentamiento continúa al llegar a 153° C., se verifica la fusión.

El ácido cítrico es ópticamente inactivo; la constante de disociación del primer átomo de hidrógeno es 8.2×10^{-4} a 18° C., los valores de esta constante para el segundo y tercer átomo, son respectivamente, 1.77×10^{-5} y 3.9×10^{-7} .

Este ácido es fácilmente soluble en agua, moderadamente en alcohol y ligeramente en éter; un gr. se disuelve en 0.5 ml. de agua, 2 ml. de alcohol de 96% y en 30 ml. de éter siempre y cuando la temperatura sea de 25° C.

Quando se calienta a 175° C., es parcialmente convertido en ácido aconítico, si se continúa el calentamiento, pierde más agua, formando bióxido de carbono y ácido acetondicarboxílico, el cual se descompone inmediatamente en bióxido de carbono y acetona.

Es un ácido tribásico, y puede por lo tanto dar tres clases de citratos, de acuerdo que se reemplacen uno, dos o tres átomos de hidrógeno por un metal; las dos primeras clases son citratos ácidos y la última citrato neutro. Las sales de los metales alcalinos son rápidamente solubles en agua, las sales neutras de los alcalino-térreos, son ligeramente solubles. La sal de calcio $\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_7)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, es menos soluble en caliente que en frío y puede ser secada a 100° C. sin pérdida del agua de cristalización.

Quando el citrato de calcio es cristalino su solubilidad en agua es de 1 en 1180 a 14° C. y de 1 en 1730 a 100° C.; pero puede suceder que el citrato de calcio se precipite en forma amorfa, y entonces su solubilidad es más grande: 1 en 707 a 18° C. y 1 en 1123 a 100° C.

El ácido cítrico se usa en la manufactura de citratos, extractos de sabores, dulcería, bebidas suaves, como un agente en el plateado, como un ingrediente en las tintas en el grabado, en teñidos y estampados de calicot y en medicina. De acuerdo con el U.S.D.C. (28) alrededor del 65% del consumo doméstico, fué para usos medicinales, incluyendo la manufactura de citratos; 15% en alimentos; 9% en dulces y pequeñas cantidades fueron usadas en el grabado, plateado, etc. Descubrimientos recientes en resinas sintéticas del tipo alquilo, le dieron importancia a los ácidos citracónico e itacónico y a sus anhídridos correspondientes. Últimamente se han obtenido altos rendimientos de estos productos del ácido cítrico y por lo tanto está indicado un enorme uso potencial de este ácido.

El uso del ácido cítrico, en la manufactura de esteres comestibles de resinas, los cuales pueden ser indicados como substitutos para el chicle, fué sugerido por Ellis. Corbellini reporta el uso del ácido cítrico en la manufactura de fenil 3 metil pirazolona el cual es usado como intermedio en la producción de antipirina y ciertos colorantes azoicos.

El primero en aislar el ácido cítrico fué Scheele en 1784, cristalizándolo del jugo de los limones. Se encuentra en las frutas

excepto ciruelas y cerezas, en éstas frecuentemente se encuentra asociado con uno o más de los ácidos tetracarbónicos dicarboxílicos y con ácido oxálico. Los ácidos tricarbálico, isocítrico y aconítico, que tienen una gran relación con el ácido cítrico, se encuentran raramente en las plantas (29).

El desarrollo de la industria de la obtención de ácido cítrico por fermentación de azúcares, ha aumentado en interés durante los últimos años (13). Los éxitos obtenidos en la producción comercial de este ácido, por este proceso han cambiado la situación en el mundo con respecto a este producto. En un principio fué Italia la fuente principal de abastecimiento, obteniéndose todo el ácido de frutas, especialmente limones; pero la obtención de ácido cítrico por un proceso fermentativo, es más económica, y debido al desarrollo de esta industria los E. U. han desplazado a Italia del primer lugar en producción.

El interés en la producción micológica del ácido cítrico, se funda en el descubrimiento de Whemer hecho en 1891, de que un nuevo género de hongos parecidos a los *Penicillium*, a los cuales él llamó *Citromyces*, y en especial el *C. glaber* y el *C. pfefferianum*, eran capaces de sintetizarlo por fermentación de carbohidratos; creyendo que la formación del ácido oxálico, era característica del género *Aspergillus*.

La separación de estos dos grupos de hongos, basándose en sus diferencias fisiológicas, fué abandonada, después que Zahorski y Tom y Church, (24) demostraron que las características de *Citromyces*, eran insuficientes para distinguirlo del género *Aspergillus*.

El ácido cítrico no se encuentra únicamente en cultivos de especies de *Aspergillus*, sino que también se ha aislado de los productos metabólicos de hongos de otros géneros; por ejemplo, *Penicillium* y algunas razas de *Botrytis cinerea*, que lo pueden formar de azúcares. Whemer lo encontró también en cultivos de *Mucor piriformis* Fisher.

No obstante que todos los hongos enumerados pueden producirlo, los estudios del mecanismo por el cual se forma este producto se han hecho con *A. niger*, salvo algunas otras investigaciones aisladas, que se han efectuado con especies distin-

tas; debe hacerse notar que los estudios están hechos con gran detalle.

Tom y Church, expusieron que el término *Aspergillus niger* no designa una rama definida o especie, sino que es usado para nombrar "un grupo de *Aspergillus* negros con características fundamentales en común". La gran variación en producción de ácido cítrico, con diferentes razas de *Aspergillus niger*, no es por lo tanto una sorpresa, y la actividad de las razas individuales frecuentemente varía tanto que, la estabilización o mantenimiento de un alto rendimiento, o capacidad de producción de el organismo, es uno de los problemas más difíciles que se necesitan resolver; esta dificultad es debida, en gran parte, a que estos organismos son muy sensibles a los factores que gobiernan la fermentación; ligeras variaciones en éstos, en fermentaciones realizadas en condiciones aparentemente iguales, redundan en amplias variaciones en el rendimiento del ácido.

La influencia de varios factores que afectan la fermentación, ha sido estudiada por varios autores. En 1917, Currie (6) hizo una investigación determinando rendimientos de ácido cítrico, por varias razas seleccionadas de *A. niger*, y mostró que por un control cuidadoso del pH y la concentración de nutrientes inorgánicos, la proporción de los ácidos oxálico y cítrico se podía variar. La importancia de una acidificación a un pH bajo con ácido clorhídrico, para suprimir la producción de ácido oxálico, parece ser indispensable, y disminuye el peligro de contaminación. Este proceso se efectúa usualmente a temperaturas que varían entre 25 y 35° C., aunque se han empleado temperaturas entre 20 y 40° C. estas amplias variaciones dependen probablemente de la raza que se use.

Las primeras fermentaciones que se hicieron fueron por cultivos en superficie; se usaban tinajas de fermentación en las cuales, la relación que había entre superficie de área y volumen de medio, era muy pequeña; pero las ventajas industriales de los tanques de fermentación profundos sobre los procesos superficiales son bien conocidas. Aunque tales tanques de fermentación profundos han sido aplicados con bastante éxito a la producción de ciertos ácidos orgánicos, tales como glucónico y fumárico, y a sustancias antibióticas como penicilina y estreptomocina; se han encon-

trado dificultades considerables en otros procesos, particularmente la producción de ácido cítrico.

En este trabajo se ha hecho el intento de usar como substrato las mieles finales de los ingenios azucareros. Nuestro país produce cada año una gran cantidad de mieles finales, de las cuales sólo se consume una mínima parte en la producción de alcohol; considerando que estas mieles son muy ricas en azúcares, se investigó la manera de utilizarlas, y así librar a los ingenios de este subproducto, indeseable para muchos de ellos. Se encontró poca literatura a este respecto.

MATERIALES Y METODOS

En el desarrollo de este trabajo, se usaron como organismos fermentativos únicamente los *Aspergillus*, ensayándose las siguientes cepas.

Aspergillus niger N.R.R.L. 598

Aspergillus niger Cepa cedida por el Prof. A. Sánchez Marroquín.

Aspergillus wentii N.R.R.L. 375

La miel final usada fué del Ingenio de Cuatotolapan que está ubicado en Cuatotolapan, Ver.; al hacer el análisis de esta miel se encontró que tenía la siguiente composición:

Brix	75.2
Sacarosa	29.7%
Azúcar invertida	20.5%
Ceniza	6.4%

Los métodos seguidos para hacer este análisis fueron los comunes y corrientes, y por lo tanto sólo se hará una breve explicación de ellos.

Brix.—Se disuelve una cantidad pesada de la miel final, en una cantidad igual, en peso, de agua destilada; después que la solución es uniforme, lo que se logra con un agitación vigorosa, se pone en un cilindro de cristal o probeta, esperándose a que la formación de burbujas de aire cese; se introduce entonces un aerómetro de Brix, procurando que no toque las paredes de la

probeta, después que este aereómetro se ha estabilizado se hace la lectura y se corrige por temperatura; el resultado obtenido se multiplica por dos, y el producto es el brix real.

Sacarosa.—De la solución diluida de 1:1 se toma el peso normal (26.00 g.), y se pasa cuantitativamente a un matraz aforado de 200 ml.; se le añaden 100 ml. de agua destilada y se defeca con una solución de subacetato de plomo al 50%; se afora y se filtra; la polarización se hace en un tubo de 200 mm., la lectura se multiplica por cuatro y el resultado es sacarosa en por ciento.

Azúcar invertida.—Esta determinación se hace por el método volumétrico de Lane-Eynon (21). Se usaron soluciones de Fehling, modificadas por Soxhlet.

Se prepara una solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. pesando 34.64 g. de la sal y disolviéndolos en 500 ml. de agua; a esta se le llama Solución A; además de ésta se necesita otra de tartrato alcalino, para hacerla, se disuelven 173 g. de tartrato doble de sodio y potasio y 50 g. de sosa cáustica en 500 ml. de agua; a esta se le llama Solución B.

La determinación se hace en la siguiente forma:

Se mezclan volúmenes iguales de las soluciones A y B (10 ml. de cada una), en un matraz de 500 ml., se les agregan aproximadamente 100 ml. de agua destilada, y se ponen a hervir procurando que la ebullición se alcance en dos minutos; es conveniente poner en el matraz unas cuantas perlas de vidrio, para regular la ebullición y evitar que haya proyecciones.

Por otro lado, se pesan 2 g. de miel final y se pasan cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml.; esta solución se pone en una bureta y se va agregando a la mezcla de soluciones de Fehling en ebullición, hasta reducción total del cobre, para poder apreciar cuando se ha terminado la titulación, se recomienda agregar en las etapas finales de ésta, dos gotas de azul de metileno y seguir agregando la solución de miel hasta decoloración total de éste.

Antes de hacer la titulación de miel final, se debe hacer una con glucosa ϕ . P., con el objeto de tener una referencia.

Cenizas.—Se pesa en un crisol tarado, una cantidad conveniente de melaza (4 a 5 g.), y se hace la calcinación, primero sobre un mechero, teniendo especial cuidado en que no haya proyecciones, para esto se pueden agregar unas gotas de aceite de oliva; cuando ya no hay formación de espuma, se introduce el crisol en una mufla que ha sido puesta previamente a 510° C., hasta que se obtenga una ceniza blanca; se saca el crisol y se deja enfriar, se le agregan unas gotas de agua y se vuelve a poner en la mufla a 510° C., durante unos minutos más; se seca, se pone en un desecador y cuando está frío se pesa.

Como ya se vió en el análisis hecho, el tipo de melazas que se usó tiene una gran cantidad de cenizas, lo que nos indica claramente un alto contenido en cationes. En experimentos hechos, se ha demostrado, que para tener buenos rendimientos en ácido cítrico, se debe tener un control exacto sobre los nutrientes inorgánicos.

Las melazas sirven como un medio de crecimiento bastante aceptable; sin embargo, cuando se usan medios de cultivo hechos con melazas sin purificar se obtienen muy bajos rendimientos en ácido cítrico. Para el objeto de esta purificación se usaron los siguientes métodos:

Coprecipitación con sulfato de aluminio y amoníaco.—Una solución de melazas conteniendo 150 g. de azúcares por litro, es tratada con 5 ml. de una solución de $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$, conteniendo un gramo de la sal por ml. en seguida se le va agregando hidróxido de amonio 1:1 hasta tener un pH de 9.0, se filtra y se vuelve a hacer la precipitación, agregando otros 5 ml. de la solución de sulfato de aluminio y ajustando el pH ahora a 7.0, volviéndose a hacer la filtración. Este método de purificación da muy buenos resultados, cuando se trata de purificar glucosa comercial (23).

Coprecipitación con sulfato de aluminio y cal.—Se emplea el mismo método anterior, únicamente que en vez de alcalinizar con amoníaco se hace con una solución saturada de hidróxido de calcio.

Tratamiento de las melazas por ferrocianuro de potasio.—Este método ha tenido un gran éxito en la purificación de las melazas de remolacha, y como teóricamente elimina varios de los meta-

les que deben estar mejor controlados, se pensó que podía tener éxito en la purificación de melazas de caña. El método para hacer el tratamiento es como sigue:

Se pesan 300 g. de melazas y se aforan a 1 litro; se agregan 1.8 g. de $K_4Fe(CN)_6$ y dos ml. de ácido sulfúrico 1N, la solución se agita durante 10 minutos y después se deja reposar dos días a 10° C. Al final de este tiempo se decanta la solución que sobrenada y se afora a 1 litro. Esta solución contiene aproximadamente 150 g. de azúcares por litro (15).

Tratamiento con carbón activado.—Las melazas convenientemente diluidas, son tratadas por 1% de carbón animal activado, por peso de melaza; en seguida se calientan durante una media hora a 40° C., teniendo un agitación constante; al final de este tiempo, se agregan 2 g. de filtro ayuda, se agitan durante otros cinco minutos se filtran en caliente. Se han reportado varios trabajos en los cuales se tuvo éxito por este tratamiento (12).

Tratamiento con bentonita.—Se hace la dilución conveniente de la miel, y se le agrega 1% de bentonita por peso de miel final. Esta bentonita ha sido previamente puesta en solución con objeto de tener una mejor floculación. Después de agitar la solución durante unos minutos, se pone a 10° C., durante unas dos horas, y el líquido que sobrenada se decanta y se afora a un litro. El objeto de poner a 10° C., es evitar que haya fermentaciones, lo que ocasionaría una pérdida de azúcar.

Se hicieron experiencias, con miel final tratada por cada uno de los métodos anteriores, con el objeto de ver cuál es el más conveniente para el caso.

El medio de esporulación empleado para las cepas, fué pepton-glucosa en agar, (27) puesto en botellas de Blake de las que sólo se ocupa una delgada capa. Después de tres días se produce abundante esporulación. Para la inoculación, se hicieron suspensiones de esporas, en agua destilada estéril, sembrando alrededor de tres millones de esporas por cada 100 ml. de medio. Antes de la inoculación se ajustó el pH a 3.5, excepto unas pruebas que se hicieron en condiciones de pH diferentes.

Para efectuar la fermentación en superficie, se usaron botellas de refrigerador, y para las fermentaciones en cultivo sumer-

les que deben estar mejor controlados, se pensó que podía tener éxito en la purificación de melazas de caña. El método para hacer el tratamiento es como sigue:

Se pesan 300 g. de melazas y se aforan a 1 litro; se agregan 1.8 g. de $K_4Fe(CN)_6$ y dos ml. de ácido sulfúrico 1N, la solución se agita durante 10 minutos y después se deja reposar dos días a 10° C. Al final de este tiempo se decanta la solución que sobrenada y se afora a 1 litro. Esta solución contiene aproximadamente 150 g. de azúcares por litro (15).

Tratamiento con carbón activado.—Las melazas convenientemente diluidas, son tratadas por 1% de carbón animal activado, por peso de melaza; en seguida se calientan durante una media hora a 40° C., teniendo un agitación constante; al final de este tiempo, se agregan 2 g. de filtro ayuda, se agitan durante otros cinco minutos se filtran en caliente. Se han reportado varios trabajos en los cuales se tuvo éxito por este tratamiento (12).

Tratamiento con bentonita.—Se hace la dilución conveniente de la miel, y se le agrega 1% de bentonita por peso de miel final. Esta bentonita ha sido previamente puesta en solución con objeto de tener una mejor floculación. Después de agitar la solución durante unos minutos, se pone a 10° C., durante unas dos horas, y el líquido que sobrenada se decanta y se afora a un litro. El objeto de poner a 10° C., es evitar que haya fermentaciones, lo que ocasionaría una pérdida de azúcar.

Se hicieron experiencias, con miel final tratada por cada uno de los métodos anteriores, con el objeto de ver cuál es el más conveniente para el caso.

El medio de esporulación empleado para las cepas, fué peptona-glucosa en agar, (27) puesto en botellas de Blake de las que sólo se ocupa una delgada capa. Después de tres días se produce abundante esporulación. Para la inoculación, se hicieron suspensiones de esporas, en agua destilada estéril, sembrando alrededor de tres millones de esporas por cada 100 ml. de medio. Antes de la inoculación se ajustó el pH a 3.5, excepto unas pruebas que se hicieron en condiciones de pH diferentes.

Para efectuar la fermentación en superficie, se usaron botellas de refrigerador, y para las fermentaciones en cultivo sumer-

gido, matraces erlenmeyer de 250 ml. de los cuales sólo se ocuparon 100 ml.; estos matraces son obturados con tapones de hule bihoradados, que sostienen dos tubos de vidrio, uno que llega hasta el fondo del frasco y otro que apenas llega al final del tapón. Estos tubos fueron conectados por medio de mangueras de hule, a un tanque de oxígeno, a una compresora o a una trompa de vacío, según las condiciones del experimento. Se conectaron 10 matraces en serie y en otros casos se hizo uso de un tubo en Y, conectando ocho matraces, cuatro a cada rama.

La velocidad de flujo fué aproximadamente de medio litro por minuto por 100 ml. de medio. Para esterilizar el aire u oxígeno, se le filtró a través de una capa de 20 cm. de grueso de algodón estéril.

El azúcar residual se determina por el método del ferricianuro alcalino como sigue: (19)

Se toma una dilución del medio por ejemplo 5:100 y de aquí se toma una parte alícuota de 1 a 5 ml. en un tubo de ensayo de 20 x 3 cm.; el objeto de esto es que la concentración de azúcares, no pase de 18 mg. en total, si se tomaron menos de 5 ml., se añade agua destilada hasta completarlos; en seguida se añaden 15 ml. de solución de $K_3Fe(CN)_6$ 0.05 N. se agita el tubo y se introduce en un baño de agua hirviente por 20 minutos, al final de ese tiempo, se saca el tubo y se enfría rápidamente al chorro de agua. El contenido del tubo se pasa a un matraz erlenmeyer, lavando el tubo con 30 ml. de solución acética (3 veces en porciones de 10 ml.), se agregan al matraz 1 ml. de solución de yoduro de potasio y 1 ml. de solución de almidón, se agita y se titula con solución 0.05 N de tiosulfato de sodio.

Reactivos:

Solución de tiosulfato de sodio.—Se pesan 12.41 g. de $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$. se disuelven en agua y se afora a 1 litro. Se deben seleccionar los cristales claros que indiquen una mayor pureza química, el agua usada debe ser bidestilada libre de bióxido de carbono, destilando por segunda vez, después de agregar permanganato de potasio; para destruir la materia orgánica.

Solución de almidón.—Un gramo de almidón soluble se disuelve en unos 20 ml. de agua destilada añadiendo después 60 ml.

de agua hirviendo, en seguida se añaden 30 g. de sal común y se afora a 100 ml. La solución deberá ser transparente e incolora.

Solución alcalina de ferricianuro de potasio.—Se pesan 16.5 g. de ferricianuro de potasio seco y puro y 22.0 g. de carbonato de sodio anhidro y se disuelven en 1 litro de agua destilada. La normalidad es 0.05 N. Esta solución conserva su concentración por un largo período de tiempo, si se guarda en un frasco obscuro fuera de la luz.

Solución acética.—Esta solución contiene 200 ml. de ácido acético glacial, 70 g. de cloruro de potasio y 20 g. de sulfato de zinc por litro.

Solución de yoduro de potasio.—A una solución de yoduro de potasio de 50%, se le agrega una gota de solución de sosa cáustica concentrada por cada 100 ml., para impedir la destrucción de la solución. Esta no debe usarse a menos que esté incolora.

Para poder hacer uso de este método, se tituló una solución valorada de glucosa y se trazó la gráfica.

La acidez titulable se determina por titulación de alícuotas de 5 ml. con una solución de sosa cáustica 0.25 N., usando fenolftaleína como indicador. Un ml. de esta solución es equivalente a 16.0 mg. de ácido cítrico anhidro; pero debemos tener en cuenta que no toda la acidez titulable es producida por el ácido cítrico, ya que en la fermentación se producen otros ácidos, para poder cuantear éste, se hizo uso del siguiente método: (9) (14)

Se toma una alícuota de la solución, procurando que tenga unos 25 mg. de ácido cítrico, se pone en un tubo de ensayo de 20 x 3 cm., se le agregan dos ml. de la solución de ácido sulfúrico, se ajusta el volumen a 20 ml. y se lleva a la temperatura de ebullición manteniendo ésta durante unos tres minutos, se enfría y se le agregan unos 3 ml. de agua de bromo saturada; después de esperar 10 minutos cualquier precipitado que se haya formado se remueve por centrifugación, decantando el líquido y ajustando a 20 ml. De esta solución se toman alícuotas que contengan de tres a cinco mg. de ácido cítrico y se colocan en tubos de ensayo de 150 x 18 mm., se agregan 0.5 ml. de la solución de ácido sulfúrico, 0.5 ml. de agua de bromo y 0.5 ml. de la solución de permanganato de potasio, se ajusta el volumen a 5 ml. y se dejan

reposar los tubos durante 5 minutos, al final de este tiempo, se sumergen en un baño de hielo, y se agregan unas gotas de hidrazina, hasta decoloración del permanganato, se ajusta el volumen a 10 ml. y se agregan 13 ml. de éter de petróleo; los tubos se tapan se agitan y se centrifugan para romper la emulsión. Finalmente, se toman 10 ml. del éter de petróleo y se les agrega 1 ml. de la solución de bisulfito de sodio, se deja evaporar casi todo el éter y se agregan 10 ml. de agua destilada. El bromuro formado se titula con solución de nitrato de plata 0.05 N usando como indicador cromato de potasio al 5%.

Cada ml. de la solución de AgNO_3 . titula 1.91 mg. de ácido cítrico anhidro.

Reactivos.

Solución de ácido sulfúrico 1:1.

Agua de bromo saturada.—Se disuelven 3.6 g. de bromo en 100 ml. de agua.

Solución 1.5 N de permanganato de potasio.—Se pesan 48 g. de KMnO_4 y se disuelven en un litro de agua destilada, se deja reposar esta solución durante tres o cuatro días al abrigo de la luz, y se filtra a través de lana de vidrio. Esta solución se debe conservar en un frasco obscuro.

Solución de hidrazina 2N.—Para esta solución se pesan 60.0 g. de hidrazina y con ayuda de sosa de 50% se disuelven en agua destilada, se afora a 500 ml.

Solución normal de bisulfito de sodio.—Se disuelven 21.5 g. de bisulfito de sodio en 200 ml. de agua. Se debe agregar sosa cáustica concentrada, hasta tener un pH de 6.0.

Solución de nitrato de plata 0.05 N.—Se pesan exactamente 8.497 g. de AgNO_3 seco y puro, y se afora a un litro.

Solución de cromato de potasio al 5%.

Eter de petróleo.—Se debe procurar que éste tenga un punto de ebullición de alrededor de 40° C.

En las tablas de resultado, se da el dato de por ciento de conversión en ácido cítrico, sobre la base del azúcar consumida, este dato se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Conversión \%} = \frac{\text{Mg. de ácido cítrico}}{\text{Mg. de azúcar consumida}} \times 100.$$

PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

Para efectuar las fermentaciones, es necesario que los hongos que se van a usar, estén acostumbrados a la concentración y calidad de azúcares con que se va a trabajar.

Las primeras cepas ensayadas, fueron las enviadas por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos. Para aclimatarlas a las condiciones necesarias, se procedió en la siguiente forma:

Se prepararon tres medios con cantidades crecientes de miel final y se hicieron resiembras cada cinco días. Debe hacerse notar una gran diferencia en el crecimiento, pues el *Aspergillus niger*, a los tres días de inoculado presentó un crecimiento abundante y una gran cantidad de esporas, mientras que el *Aspergillus wentii*, a los 5 días todavía no se había desarrollado. Para hacer crecer el *A. wentii* se prepararon medios con diferente pH y menor cantidad de melaza, y en ninguno de ellos presentó desarrollo aún después de siete días de sembrado.

Medios usados para el *Aspergillus niger*.

Medio 1)

Melaza	107.00 g.
Sacarosa	75.00 g.
NH_4NO_3	2.50 g.
KH_2PO_4	1.00 g.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g.

Agua para completar 1 litro.

Medio 2)

Melaza	150.00 g.
Sacarosa	38.00 g.
NH_4NO_3	2.50 g.
KH_2PO_4	1.00 g.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g.

Agua para completar un litro.

Medio 3)

Melaza	214.00 g.
NH_4NO_3	2.50 g.
KH_2PO_4	1.00 g.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g.

Agua para completar un litro.

Los medios fueron esterilizados media hora en el autoclave a una presión de 8 Libras por pulg.², y después se ajustó asépticamente el pH a 3.5

Con objeto de ver si con un cambio en el medio, se lograba hacer crecer el *A. wentii* y para determinar cuál era la cepa que mejores resultados daba, se hizo la siguiente prueba:

Se prepararon matraces erlenmayer de 2000 ml. con 250 ml. cada uno de medio A; se sembraron con esporas de *A. niger* y micelio precrecido de *A. wentii*, y se pusieron a fermentar en superficie a una temperatura de 28° C. Los resultados de este experimento están en la tabla Núm. 1.

Medio A

Melaza	214.00 g.
Urea	1.00 g.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.50 g.
KH_2PO_4	0.08 g.
KCl	0.15 g.
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02 g.
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01 g.

Agua para completar 1 litro

HCl hasta pH de 3.5

TABLA NUM. 1

Investigación de dos cepas de *Aspergillus* para determinar rendimiento de ácido cítrico.

Cepa usada	Días de fermentación	Conversión % base Azúcar consumida	Acido cítrico %
<i>A. niger</i>	10	12.6	11.4
<i>A. wentii</i>	15	6.4	5.2

La deficiencia en el crecimiento y el bajo rendimiento obtenido con la cepa de *A. wentii* nos conduce a seguir el trabajo utilizando solo la cepa de *A. niger*.

Se han hecho muchas investigaciones para determinar cual es la mejor fuente de nitrógeno; sin embargo estas son muy contradictorias, proponiendo algunos autores el uso de una sal y otros el de otra. Estas diferencias, son probablemente debidas a la raza del organismo que se use. Para determinar cual es la fuente de nitrógeno, que con la cepa que se va a usar de altos rendimientos de ácido cítrico, se hicieron las siguientes fermentaciones.

Se preparó medio A sin urea y se repartió en proporciones de 75 ml. en siete matraces erlenmeyer de 250 ml. A cada matraz se le agregó 0.1% de diferentes sales conteniendo nitrógeno, se inocularon con esporas de *A. niger* y se dejaron fermentar durante 10 días en superficie. Los resultados están en la tabla número 2.

TABLA NUM. 2

Relación que hay entre las sales conteniendo nitrógeno y el rendimiento en ácido cítrico.

Fuente de N usada	Conversión en % base Azúcar consumida	Acido cítrico por ciento
MgNO ₃ .6H ₂ O	26.0	24.8
Na ₂ NO ₃	24.7	23.6
NH ₄ NO ₃	33.3	32.4
KNO ₃	17.8	15.6
Agua de remojo de maíz a 9° Bé.	18.9	18.0
Urea	13.9	12.8
	19.5	18.6

Como se ve, la amplia variación en los rendimientos obtenidos, indica que la sal de nitrógeno afecta mucho la fermentación. Los bajos rendimientos pueden también indicar, que las melazas tienen un catión o grupo de cationes que impiden que la fermentación sea normal.

Con objeto de eliminar estas impurezas, se trataron las melazas con varios absorbentes y se hizo la fermentación en cultivo sumergido.

Los detalles de esta fermentación son como sigue:

Se preparó el siguiente medio:

Medio B

Melazas	214.00 g.
NH_4NO_3	1.00 g.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.50 g.
KH_2PO_4	0.08 g.
KCl	0.15 g.
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02 g.
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01 g.

Agua para completar 1 litro.

HCl hasta pH de 3.5.

Las melazas agregadas a este medio fueron previstamente purificadas, por el método del sulfato de aluminio e hidróxido de amonio, y otro medio igual se preparó tratando las melazas con carbón animal activado. Estos medios se repartieron en matraces erlenmayer de 250 ml. de los que sólo se ocuparon 100 ml. Se prepararon matraces por duplicado, ajustando el pH antes de hacer la inoculación unos a pH 3.5 y otros a pH 2.0, el método de aeración fué empleando una trompa de vacío. La fermentación se efectuó durante 10 días a una temperatura de 28° C. Se pusieron como testigos medio B con glucosa, medio B con sacarosa, y medio B con melaza sin tratar. Los resultados de este experimento están en la tabla núm. 3.

TABLA NUM. 3

Efecto de la purificación de las melazas en el rendimiento en ácido cítrico por fermentación en cultivo sumergido.

Método de purificación	pH inicial	Conversión %	Acido cítrico %
Carbón activado	3.5	37.9	36.0
Carbón activado	2.0	35.6	34.6
Sulfato de aluminio	3.5	31.9	30.0
Hidróxido de amonio			
Sulfato de aluminio	2.0	33.4	32.9
Hidróxido de amonio			
Glucosa q. p.	3.5	62.8	61.2
Glucosa q. p.	2.0	56.4	55.3
Glucosa q. p.	2.0	56.4	55.3
Sacarosa refinada	3.5	60.2	59.3
Sacarosa refinada	2.0	60.4	59.2
Miel sin tratar	2.5	14.2	12.9

Los resultados obtenidos en el cuadro anterior nos indican que por una purificación de las melazas los rendimientos suben, asimismo, podemos ver que aunque a un pH menor de 3.5, se produce menor cantidad de otros ácidos, la conversión es notoriamente más baja, y por lo tanto, el rendimiento total en ácido cítrico baja también.

Con el objeto de tratar de aumentar los rendimientos, se hizo otra serie de fermentaciones utilizando oxígeno para airear el substrato, empleando además otros métodos de purificación y otra concentración de nutrientes inorgánicos.

Medio C

Melaza	214.00 g.
NH ₄ NO ₃	2.50 g.
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25 g.
KH ₂ PO ₄	1.00 g.
KCl	0.15 g.
CuSO ₄ .6H ₂ O	0.05 g.

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 g.
FeCl ₃	0.03 g.
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g.

Agua para completar 1 litro.

HCl hasta pH de 3.5

Las melazas agregadas a este medio son purificadas en la forma indicada por la tabla núm. 4. La inoculación se hace por esporas de *A. niger* suspendidas en agua destilada estéril. La fermentación se hizo por cultivo sumergido aireado con oxígeno de 98% de pureza a una velocidad media de flujo de medio litro por minuto por 100 ml. de medio. La temperatura se conservó a 30° C., la fermentación se suspendió a los diez días, haciendo determinaciones de acidez titulable a los seis, ocho y diez días.

Los resultados obtenidos en esta fermentación son bastante buenos, los de las melazas purificadas con carbón animal activado, se pueden comparar con los obtenidos con glucosa q. p.; los resultados de la tabla núm. 4 son los que se obtuvieron a los diez días de empezada la fermentación. Debemos hacer notar que, los medios se dejaron que desarrollaran sin aeración durante 72 horas.

TABLA NUM. 4

Influencia de varios métodos de purificación de melazas en la fermentación por cultivo sumergido aireando con una corriente de oxígeno.

Purificación con:	pH inicial	Conversión %	Acido Cítrico %
Sulfato de aluminio hidróxido de calcio	3.5	11.0	9.8
Sulfato de aluminio hidróxido de amonio	3.5	46.7	45.3
Ferrocianuro de potasio	3.5	33.6	32.2
Sulfato de aluminio hidróxido de amonio y carbón activado	3.5	62.4	61.9
Carbón activado	3.5	70.1	69.1
Glucosa q.p.	3.5	72.9	71.2
Sacarosa refinada	3.5	73.1	72.6
Miel sin tratar	3.5	15.2	14.1

Los resultados obtenidos, según la tabla anterior, son muy buenos para algunos métodos de purificación de las melazas, además se ve que la influencia de una corriente de oxígeno beneficia grandemente los rendimientos en fermentaciones en cultivo sumergido.

Los rendimientos más altos, hasta ahora obtenidos han sido con melazas tratadas con carbón activado. Para ver qué efecto tiene la bentonita sobre estas en comparación con el carbón, se hizo el siguiente experimento:

Al inocular esporas de *A. niger* en medios con un pH de 3.5, se observó que no hubo desarrollo, aún después de pasados seis días. Se hicieron siembras en varios medios con diferente pH, y sólo hubo crecimiento en el medio que tenía pH 6.0. Por observaciones microscópicas se vió que no había contaminación, y entonces, se hicieron resiembras del hongo en medios con pH cada vez más bajo, hasta tener un crecimiento óptimo en un medio con pH de 2.5.

Después de esto, se consiguió una nueva cepa, y después de ser aclimatada, se probó su actividad para producir ácido cítrico comparándola con la de la cepa usada hasta ahora. Se preparó el siguiente medio:

Medio D

Melaza	214.00 g.
NH_4NO_3	3.00 g.
Peptona	0.50 g.
KCl	0.50 g.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.00 g.
KH_2PO_4	1.50 g.
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.00 g.
FeCl_3	1.00 g.
$\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.00 g.

Agua para completar un litro.

HCl hasta tener un pH de 3.5.

La fermentación se hizo en cultivo sumergido, la aeración se hizo con una trompa de vacío. La fermentación fué llevada a 30° C. Los resultados están en la tabla Núm. 5.

TABLA NUM. 5

Rendimientos de ácido cítrico con tres cepas diferentes de *Aspergillus*.

Cepa usada	Días de fermentación	Conversión %	Acido cítrico %
<i>Aspergillus niger</i> 1	10	15.3	14.1
<i>Aspergillus niger</i> 2	10	11.2	10.1
<i>Aspergillus wentii</i>	15	8.7	7.9

Estas pruebas, previas al último experimento efectuado, nos indican que se debe seguir trabajando con el hongo que se ha estado usando.

Este último experimento se hizo como sigue:

Se preparó medio C con melazas previamente purificadas con carbón activado y con bentonita (10) en la forma indicada, el medio se repartió en botellas de refrigerador poniendo en cada una de ellas 100 ml. y en matraces erlenmeyer de 250 ml. de los cuales sólo se ocuparon 100 ml.; la inoculación se hizo con esporas de *A. niger* 1; antes de la inoculación se ajustó a los pH indicados en la tabla Núm. 6. Se hicieron comparaciones por fermentaciones llevadas en superficie y fermentaciones en cultivo sumergido. La tabulación de los resultados se encuentra en el siguiente cuadro.

TABLA NUM. 6

Comparación de resultados por fermentaciones en superficie y en cultivo sumergido con medios en diferentes condiciones de nutrientes inorgánicos y a diferentes condiciones de pH.

Purificación con:	Cultivo en	pH inicial	Conversión %	Acido cítrico en %
Bentonita	Superficie	6.5	48.1	43.6
Bentonita	Superficie	3.5	44.8	43.9
Bentonita	Sumergido	6.5	51.9	46.8
Bentonita	Sumergido	3.5	43.2	42.8
Bentonita	Sumergido	3.5	55.7	54.1
Carbón activo	Superficie	6.5	51.3	43.3
Carbón activo	Superficie	3.5	47.9	46.3
Carbón activo	Sumergido	6.5	53.9	48.1
Carbón activo	Sumergido	3.5	50.3	49.5
Carbón activo	Sumergido	3.5	61.2	60.1

No se agregó a estos medios, nutrientes inorgánicos, es decir, el medio tiene únicamente miel tratada y diluída.

Como se ve en el cuadro anterior, la bentonita da resultados tan aceptables a los obtenidos cuando se usa carbón activo. La aeración de esta fermentación se hizo con una compresora pasando aproximadamente medio litro por minuto por 100 ml. de medio. Esta fermentación se hizo a la temperatura ambiente.

DISCUSION

Anteriormente se dijo, que el control que se debe tener de los diversos factores que afectan la fermentación, debe ser muy exacto para poder tener rendimientos uniformes. Haciendo una consideración de estos factores se pueden discutir los siguientes puntos:

- 1) Microorganismos.
- 2) Medio de fermentación.
- 3) Condiciones externas que afectan la fermentación.

1).—Condiciones del microorganismo.—Desde las investigaciones iniciales de Whemer, el cual usó las especies de hongos ya mencionadas, se han hecho estudios para encontrar otras especies que sean capaces de sintetizarlo a partir de carbohidratos. En un principio se tuvo el criterio de que la capacidad de producción de ácido dependía del color del organismo usado, creyéndose que las formas negras y café amarillentas eran las mejores formadoras de ácido.

Sin embargo esto no quiere decir que los organismos negros sean los mejores productores de ácido; hasta hoy se han utilizado una infinidad de hongos con el mismo objeto entre los que se cuentan los siguientes:

Cyrtomyces pfefferianus, *C. glaber*, *C. citrius*, *Aspergillus carbonarius*, *A. glaucus*, *A. clavatus*, *A. cinnmomeus*, *A. fumarios*, *A. awamori*, Var. *Nakazawa*, *idem* Var. *Fumeus*, *A. aureus* *Nakazawa*, *Penicillium arenarium*, *P. olivaceum*, *P. divaricatum*, *P. sanguifluus*, *P. glaucum*, *M. piriformis*.

El valor de los resultados experimentales, depende en gran parte de seguir una técnica uniforme para la fermentación, para poder hacer esto, se deben tener las siguientes precauciones:

Los cultivos del hongo usado, en este caso **A. niger**, deben ser resemebrados, a intervalos definidos, a un medio igual en composición química y concentración de azúcares, al que se use en la fermentación. Es difícil obtener rendimientos constantes de ácido cítrico, si cuando menos no se han hecho cuatro resiembras de esporas a intervalos definidos (7).

Las experiencias han demostrado que cada raza de **A. niger** tiene un tipo de adaptación. Las esporas tienden a recibir un estímulo definido de los constituyentes del medio, particularmente las sales inorgánicas, y esta característica tan importante deberá ser empleada en las operaciones de cultivo, previas a las resiembras de esporas en el medio, si se necesita una producción máxima de ácido cítrico. Este proceso de adaptación está mejor ilustrado por el hecho, de que por resiembras sucesivas del mismo organismo, en medios de composición uniforme, se aumentan las cantidades de ácido cítrico producido (1).

Para impedir las contaminaciones del cultivo, se debe emplear un método de purificación a intervalos definidos; se ha demostrado que la capacidad del hongo para producir ácido cítrico, a veces cambia sin ninguna razón aparente, o bien la naturaleza del producto se altera. Así, una raza puede repentinamente cesar su producción de ácido cítrico, y dar sólo ácido glucónico; cuando se encuentra que tal cambio es irreversible, es posible que haya ocurrido una mutación, o bien se puede tener la posibilidad de que un contaminante de apariencia similar, ha tenido acceso al cultivo. Yuill y Yuill (25) reportaron uno de los casos más interesantes de este tipo: ellos aislaron de cultivos de **A. niger**, un nuevo hongo, que en su morfología parece ser similar al **A. niger** hasta antes de la aparición de esterigmas, de donde su desarrollo sigue un curso enteramente diferente. Propusieron el nombre de **Cladosarum**, para este nuevo hongo, y los autores consideran que no es improbable que su origen sea del **A. niger**.

También se debe tener cuidado en evitar la llamada enfermedad de los **Aspergillus**, que consiste en un crecimiento de hon-

gos del género *Penicillium* en las "cabezas" de los *Aspergillus*, haciendo que éstas tomen un color verdoso.

En suma, para tener un buen crecimiento y una fermentación óptima, el hongo deberá ser activado y acostumbrado al medio en que va a trabajar; un método para activar la cepa que parece que da buenos resultados, es el siguiente:

Se hace una suspensión de esporas en 10 ml. de agua destilada estéril, contenidos en un tubo de ensaye, y enseguida se introduce el tubo en un baño de agua hirviendo durante 1 minuto; el motivo por el cual hay una activación puede ser el siguiente: al calentar las esporas a esa temperatura, sólo sobreviven las más fuertes, o sean las más activas, inhibiéndose las débiles, malas formadoras de ácido. Haciendo esto en varias resiembras consecutivas, se obtiene una buena activación de la cepa.

Las esporas que se siembran no deben ser ni muy viejas ni muy jóvenes, ya que por inoculación de éstas se tienen algunos efectos en la fermentación, lo mejor, es tomarlas de un cultivo que tenga de cinco a diez días de inoculado. La cantidad de esporas tomadas como inóculo no tiene influencia en el rendimiento, aunque no se debe poner un gran exceso, porque entonces quedan esporas que no desarrollaron dentro del micelio; la influencia de éstas es tal que puede inhibir la formación de ácido cítrico. Cantidades que varían entre uno y 57 millones de esporas por litro de solución, pueden ser sembradas sin tener ningún efecto.

Puede suceder que el hongo no desarrolle a un pH bajo, como el necesario para la fermentación, en este caso se preparan medios con pH que va bajando gradualmente, hasta tener un pH de 2.0; esto está en contradicción con los estudios de Webb (30), efectuados en 1919 en los cuales no encontró crecimiento a un pH menor de 2.8.

De lo dicho anteriormente, podemos concluir que en un proceso industrial, se debe tener un estricto control de los pies de cultivo, así como una atención general a las condiciones de cultivo.

2).—Medio de fermentación.—En el medio de fermentación, se necesita como fuente de carbono un carbohidrato. En los primeros trabajos se utilizaron azúcares puros (sacarosa o glucosa), pero en el presente se usan la mayoría de los azúcares naturales. En general se cree que se obtienen altos rendimientos de moléculas

de fructosa o de carbohidratos que al desdoblarse dan moléculas de ésta.

Amelung (26) reportó varios experimentos; cuando usaba un medio conteniendo rafinosa al 10%, obtenía rendimientos de 14.5% de ácido cítrico sobre base de la fructosa componente del trisacárido; no obtuvo ácido cítrico de melibiosa, obteniéndolo en cambio en rendimientos variables con glicerina, glucosa, fructosa, manosa, manitol, xilosa, arabinosa y galactosa. A los mismos resultados llegó Bernhauer. Doelger y Prescott usaron sacarosa pura con buenos resultados, pero se encontró que, si se substituía una parte de la sacarosa por glucosa o fructosa, los rendimientos bajaban; no obstante un procedimiento patentado hace uso de glucosa con rendimientos de 65%.

Cahn (3) impregna bagazo con melazas de caña e inocula con un hongo conveniente. Es de interés hacer notar que algunas melazas de caña contienen materiales tóxicos a la raza de *A. niger* que él usó. Para evitar esto se deben hacer los experimentos con melazas de una misma localidad.

Moiliard hizo estudios comparativos de sacarosa glucosa y fructosa encontrando que la sacarosa era mejor.

En este estudio, los experimentos se hicieron únicamente con melazas de caña, utilizando medios de sacarosa o glucosa, sólo como testigos. Los resultados obtenidos con melazas sin tratar son bastante desalentadores, pero al purificar las melazas por los métodos indicados, se obtiene un rendimiento considerablemente superior, comparable al de la glucosa pura.

Otro factor que tiene mucha influencia en el rendimiento de ácido cítrico es la concentración de la solución de azúcar. Luz, por ejemplo, mostró que en soluciones nutritivas con altas concentraciones de azúcar hay una mayor conversión a ácido cítrico, que en soluciones nutritivas similares con bajas concentraciones de azúcar.

Currie, encontró que las soluciones de sacarosa al 10.2% eran satisfactorias, mientras que Doelger y Prescott prefieren una solución de sacarosa al 9.8%. Bernhauer, Iglauer y Knobloch en un trabajo más reciente y usando azúcar de remolacha encontraron que una solución al 22.5% era la más conveniente. Porges (17) encontró que soluciones nutritivas con un 12 a 20% de azúcares,

eran necesarias para tener altos rendimientos del ácido; ya que, en soluciones bajas de azúcar (5%), ésta es utilizada por el hongo como fuente de energía, y en consecuencia se formaba menos ácido.

Lorentz en una patente reciente, señala el hecho de que las melazas y otros substratos de azúcar conteniendo vitaminas y otros factores de crecimiento, favorecen el desarrollo del hongo a expensas del rendimiento en ácido. Estos materiales, promotores del crecimiento, son destruidos tratando las melazas por substancias tales como H_2O_2 o NaOH o metales finamente divididos igual a los que se emplean en la hidrogenación de los aceites.

Junto con el carbono, hidrógeno y oxígeno proporcionados por el carbohidrato, en el medio en fermentación son necesarios nitrógeno y otros materiales inorgánicos. En general, tales sales consisten de un nitrato o una sal de amonio, un fosfato y magnesio. Otras sales pueden ser necesarias en algunos casos, pero las investigaciones hechas muestran grandes divergencias.

La fuente de nitrógeno que se usa varía considerablemente entre diferentes investigadores, y aparentemente tiene una importante relación con la clase de hongo usado. En las concentraciones óptimas de nitrógeno también hay grandes diferencias, Bernhauer e Iglauer lo usaron en concentraciones de 0.07 a 0.0875% para la raza particular que ellos usaron, mientras que otros autores reportaron pequeñas cantidades 0.01 a 0.03% como suficientes. Hablando generalmente, las concentraciones bajas de N favorecen la producción de ácido; mientras que altas concentraciones favorecen el crecimiento del micelio con baja producción de ácido cítrico. Sin embargo las condiciones parecen variar de acuerdo con la fuente de carbohidratos. Cuando se usa como substrato melazas de caña Nebe encontró que ya tienen suficiente cantidad de N y otras sales.

El N puede ser proporcionado por NH_4NO_3 $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl , KNO_3 , y $NaNO_3$. Cuando se usa cloruro de amonio el ácido oxálico no se forma conservando, por supuesto, todas las demás condiciones iguales. El nitrato de litio y el nitrato de calcio se ha encontrado que dan resultados satisfactorios en algunos casos.

De las fuentes orgánicas de N se pueden mencionar los aminoácidos, Chrazacszy y Zakomorony, encontraron que el triptófano

no tenía efecto, mientras que la asparagina y tirosina tienen alguna influencia. Nossbaum también encontró que la asparagina era valiosa y recomendó la adición de 0.5 a 1.5%. Los precios de la asparagina hacen tales adiciones económicamente imposibles.

Junto con el nitrógeno, los fosfatos y el magnesio son necesarios al sustrato; los fosfatos pueden ser proporcionados por el KH_2PO_4 ó K_2HPO_4 . Scütz en su método de cultivo sumergido, dice que los fosfatos asimilables deben estar ausentes. El magnesio puede agregarse como $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Se debe hacer notar que hay una amplia variación en la concentración de los diferentes nutrientes y es posible que esto pueda ser atribuido principalmente a la raza del hongo que se investiga.

Algunas otras sales, además de las mencionadas, han sido consideradas como necesarias por algunos otros autores; así, Vasilev, indica que algunas razas de *A. niger*, muestran un incremento en el rendimiento en ácido cítrico en la presencia de 0.01% de ZnSO_4 y Porges, dice que ambos Zn y Fe son necesarios para incrementar el crecimiento del hongo y la producción de ácido. Por otra parte Chracasz y Peyros son de la opinión que las sales de Zn son tóxicas, mientras que Zaldivar, encontró que ni el ZnSO_4 ni el FeCl_3 tenían efecto en las razas que él ensayó.

En trabajos más recientes, se agregan iones Fe, Mn, Al, Mo, Zn y Cr, en pequeñas cantidades, también se ha estudiado la acción del ácido selenioso (16).

Teniendo en cuenta todos los datos anteriores, se puede suponer que cada raza de *A. niger* tiene un tipo de metabolismo y, reaccionará en forma distinta con diferentes nutrientes inorgánicos y diversas cantidades de ellos.

El mantenimiento de una acidez apropiada en el medio de fermentación es otro factor importante en el éxito de la fermentación. Un pH bajo, favorece la producción de ácido cítrico, y disminuye el peligro de contaminación; mientras que un pH alto favorece la producción de ácido oxálico y propaga la contaminación por organismos extraños. Generalmente el mejor hongo productor de ácido cítrico, posee la más alta tolerancia a un pH bajo.

El pH conveniente, se obtiene agregando ácido al medio (generalmente HCl), diversas razas de hongos actúan diferentemente

con distintos ácidos, ya que se ha demostrado que el HCl es tóxico para algunas razas mientras que el H_2PO_4 lo es para otras.

Cuando el pH del medio tiene grandes variaciones resultará un debilitamiento del hongo y por lo tanto una disminución de su capacidad de producción.

Fernbach, usa HCl para obtener un pH de 1.8. Doelger y Prescott también usan este ácido para tener un pH de 1.6 a 2.2.

De acuerdo con Prescott y Dunn (18), no se considera necesario neutralizar el ácido formado durante la fermentación; sin embargo, bajo ciertas condiciones, el empleo de $CaCO_3$ parece ser conveniente; parece que da una protección al ácido cítrico ya formado. Cuando todo el azúcar ha sido gastado, el hongo tiene la tendencia a emplear el ácido cítrico en su metabolismo, cuando el azúcar está aún presente no tiene ningún objeto agregarlo. El carbonato de sodio se usa en la misma forma que el de calcio, pero este inhibe la formación de ácido. Kirsanova, por otra parte, dice que la neutralización parcial con carbonato de sodio o sosa cáustica a un pH de 4.0 da mejores rendimientos de ácido.

Chraszcz y Peyros, consideran conveniente neutralizar parcialmente el ácido con $CaCO_3$; pero la solución debe permanecer en el lado ácido siempre. Frey indica que si la neutralización llega hasta un pH de 6.0 se favorece la producción de ácido glucónico en lugar de la de cítrico.

En general, la fermentación en un medio ácido favorece la producción de ácido cítrico, mientras que en un medio alcalino se favorece la del oxálico. La formación del ácido oxálico, de acuerdo con Jacquot, es un verdadero fenómeno parasítico y roba nutriente al micelio, siendo desperdiciado como CO_2 .

La influencia que tiene el pH es por lo tanto muy importante, y no debe pasar desapercibida. Cuando el pH se mantiene abajo de 3.5, las cantidades de ácido oxálico producidas son muy pequeñas, aumentando según aumenta el pH. A un pH de 5.0 se produce una gran cantidad de ácido oxálico, encontrándose sólo trazas de cítrico durante los primeros días; después el oxálico producido es suficiente para bajar el pH a 3.5 y la producción de ácido cítrico comienza; pero de todos modos, se tiene una gran pérdida de azúcar, ya que no se utiliza una gran parte en la producción de ácido cítrico. Las hipótesis que se pueden formular, dependen todas de la

transformación de glucosa en ácido cítrico, fenómeno muy complicado, que hasta el presente no se ha podido dilucidar con claridad (5).

El agua usada en la preparación de los medios de cultivo, también tiene influencia en la producción de ácido cítrico. En algunas razas se encuentra que los cultivos hechos con agua destilada, muestran más alta producción que los cultivos hechos con agua ordinaria, se supone que la influencia del agua depende de las sales que puede tener en disolución y que pueden afectar a los constituyentes del medio ordinario.

Para poder tener una cantidad suficiente de esporas y poder hacer la inoculación, se han recomendado varios medios de esporulación, en casi todos estos medios se ponen iones Mn que aceleran la formación de esporas. Pero por estudios hechos sobre la influencia del medio de esporulación, sobre la producción de ácido cítrico, se ha indicado que en medios de esporulación que tengan más de 9.3 mg./l. de iones Mn, las esporas formadas retardan la fermentación, cuando se usan como inóculo (22).

Un medio de esporulación recomendable, es aquél en que, en un medio básico de agar, se ponen 1.5 g./l. de extracto de malta, que produce abundante esporulación y no tiene ningún efecto posterior. Otro medio que puede usarse es el de glucosa peptona en agar.

3).—Condiciones externas.

Entre las condiciones externas, que afectan la fermentación se pueden mencionar las siguientes:

Aeración.—Este factor es uno de los más importantes en la fermentación. Cuando ésta se hace en tinas profundas sin aeración, el rendimiento en ácido cítrico es muy bajo, obteniéndose en cambio un marcado olor a alcohol; desde el descubrimiento de que la penicilina se podía obtener por una fermentación sumergida y con aeración, se han hecho diversas experiencias para aplicar el mismo procedimiento a la producción de ácido cítrico, en algunos casos con bastante éxito. Se debe tener gran cuidado en la velocidad de flujo de aire, que no deberá ser muy grande, porque la producción de ácido cítrico baja, ni muy pequeña porque sería insuficiente; se

recomienda un litro por hora por 100 ml. de medio. En este trabajo se usó 1 litro por minuto por cada litro de medio con buen resultado; sin embargo debe existir un límite ya sea porque baje el rendimiento o por razones económicas.

La influencia que tiene el bióxido de carbono, es muy importante, ya que si se inserta un tubo con álcali para absorberlo, la producción de ácido cítrico baja considerablemente y, esto hace suponer, que el CO_2 , tiene una influencia decisiva en la producción del ácido, esto ha originado unas pruebas en que la aeración se hizo con una corriente de CO_2 ; pero los resultados no han concluido nada.

Agitación.—Cuando el hongo se desarrolla va a la superficie del medio y ahí permanece hasta que el medio se agota.

La formación de ácido cítrico se supone que se lleva a cabo por enzimas intracelulares (11) y, por lo tanto, la fermentación no puede proceder si el micelio no está en contacto constante con el medio. Si la fermentación se lleva a cabo sin agitación, la capa de ácido se difunde en la capa de azúcar del fondo a una velocidad muy baja, y en tinas con un gran volumen la conversión se retarda por la dilución y por el hecho de que sólo hay una pequeña superficie de micelio en contacto con el medio. Se cree que la concentración de ácido cítrico en el medio, estimula en razón directa la producción de ácido cítrico por las enzimas del micelio.

Por lo anterior, se debe tener un movimiento que ponga en contacto constante con el micelio al medio que se quiera transformar; se debe tener en cuenta que la velocidad de agitación es muy importante para controlar la fermentación; esta velocidad debe ser de intensidad suficiente para que las enzimas hagan la conversión, pero esta no debe ser muy grande, ya que entonces el tiempo de contacto es muy pequeño y no da tiempo suficiente para la conversión.

Temperatura.—La naturaleza de los cambios sufridos por el organismo depende, en gran parte, de la temperatura de incubación empleada. Hablando generalmente, si la temperatura de incubación es arriba de 30°C ., la producción de ácido cítrico bajará y se formará ácido oxálico a su costa.

La producción de ácido cítrico se incrementa usando diferentes temperaturas durante el crecimiento. El máximo rendimiento, se obtiene conservando el hongo a 28° C., durante el crecimiento y, bajando durante el período de fermentación, a 20° la temperatura. Si se conserva el hongo a 28° C., por períodos más largos de tres días, durante la incubación, baja la habilidad de éste para producir ácido cítrico. El uso de este método de dos temperaturas no disminuye el tiempo de fermentación.

Hay una gran cantidad de trabajos de diferentes autores que recomiendan distintas temperaturas como óptimas para la fermentación. Estas grandes divergencias se deben probablemente al tipo de raza que se use.

Por los resultados obtenidos en este trabajo, hemos podido deducir, que las condiciones óptimas para la producción máxima de ácido cítrico, son las siguientes:

El microorganismo debe ser sembrado con intervalos de diez días a un medio igual en composición al que se vaya a usar en la fermentación, teniendo cuidado de evitar las contaminaciones del cultivo. El medio de esporulación que se use, no debe de contener sales de manganeso; obteniéndose buenas resultados con el medio peptona melaza en agar.

La forma más conveniente para agregar el nitrógeno, es cuando está en forma de nitrato de amonio agregándose en la cantidad de 2.50 g./l.

Los fosfatos y el magnesio que también deben estar presentes, se agregan en forma de KH_2PO_4 , y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en las cantidades de 1.00 g./l. y 0.25 g./l. respectivamente. Respecto a la influencia que tienen los iones metálicos sobre la producción de ácido cítrico, no se notó ningún efecto. Cabe hacer notar que el agua usada en la preparación de los medios de cultivo, fué agua de la llave.

De las varias pruebas que se hicieron con aeración, los rendimientos más altos de ácido cítrico se obtienen cuando el substrato es aireado con una corriente de oxígeno puro. La agitación que se dió a los medios en fermentación, fué sólo la producida por el aire u oxígeno, cuando burbujan dentro del substrato; pero teniendo en cuenta el pequeño volumen de medio en fermentación, creemos que este agitamiento fué suficiente.

La temperatura óptima fué de 28° C. La concentración de azúcares fué de 214.00 g. de melazas (equivalentes a 150 g. de glucosa) por litro de medio de fermentación.

Las diferencias entre estas condiciones óptimas y las recomendadas por algunos autores, se deben probablemente a la raza de hongo que se usó.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1.—Se estudió la producción industrial de ácido cítrico por fermentación de mieles finales en cultivo sumergido.

2.—Las melazas usadas para este trabajo fueron del Ingenio de Cuatotolapan, Ver.

3.—Cuando las melazas son purificadas con carbón animal activado en las condiciones indicadas, se obtuvieron rendimientos de 69.1%, éstos se pueden comparar a los obtenidos con glucosa en las mismas condiciones (71.2%).

4.—De las cepas estudiadas, la que mejores rendimientos produjo fué *Aspergillus niger* N.R.R.L. 598.

5.—Para la raza usada, la mejor fuente de nitrógeno fué el nitrato de amonio.

6.—El pH óptimo es de 3.5; a menores pH se tienen conversiones más bajas.

7.—Cuando la aireación o aeración se efectúa con oxígeno puro, los rendimientos aumentan considerablemente.

8.—Se hicieron comparaciones de resultados obtenidos con melazas tratadas con carbón animal activado y con bentonita, los resultados obtenidos son: medio preparado con melazas tratadas con carbón animal activado 60.1% de ácido cítrico, medio preparado con melazas tratadas con bentonita 54.1% de ácido cítrico.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—Birkinshaw J. H. Biochemistry of the Lower Fungi.
Biol. Rev. 12 (357) 1937.
- 2.—BROWNE C.A. Citric Acid.
Jour. Ind. Eng. Chem. 13 (81) 1921.
- 3.—CAHN F. J. Citric Acid Fermentation on Solid Materials.
Ind. Eng. Chem. 27 (201) 1935.
- 4.—CHALLENGER F. The Production of Citric Acid by Fermentation
Process.
Ind. Eng. Chem. 5 (181) 1929.
- 5.—CHALLENGER F. SUBRANIANIAM V. Y WALKER T. K. The
Mechanism of the Formation of Citric and Oxalic Acids from
Sugar by *Aspergillus niger*.
Jour. Chem. Ind. January 1927 p. 200.
- 6.—CURRIE J. N. The Citric Acid Fermentation of *Aspergillus niger*.
Jour. Biol. Chem. 31 (15) 1917.
- 7.—DOELGER W. P. y PRESCOTT S. C. Citric Acid Fermentation.
Ind. Eng. Chem. 26 (1142) 1934.
- 8.—GERHARDT P., DORRELL W. W. Y BALDWIN L. Z. Citric Acid
Fermentation of Beet Molasses.
J. Bact. 52 (555) 1946.
- 9.—GOLDBERG A. S. Y BERNHEIM A. R. Citric Acid Determination.
J. Biol. Chem. 156 (33) 1944.

B I B L I O G R A F I A

- 1.—Birkinshaw J. H. Biochemistry of the Lower Fungi.
Biol. Rev. 12 (357) 1937.
- 2.—BROWNE C.A. Citric Acid.
Jour. Ind. Eng. Chem. 13 (81) 1921.
- 3.—CAHN F. J. Citric Acid Fermentation on Solid Materials.
Ind. Eng. Chem. 27 (201) 1935.
- 4.—CHALLENGER F. The Production of Citric Acid by Fermentation
Process.
Ind. Eng. Chem. 5 (181) 1929.
- 5.—CHALLENGER F. SUBRANIANIAM V. Y WALKER T. K. The
Mechanism of the Formation of Citric and Oxalic Acids from
Sugar by *Aspergillus niger*.
Jour. Chem. Ind. January 1927 p. 200.
- 6.—CURRIE J. N. The Citric Acid Fermentation of *Aspergillus niger*.
Jour. Biol. Chem. 31 (15) 1917.
- 7.—DOELGER W. P. y PRESCOTT S. C. Citric Acid Fermentation.
Ind. Eng. Chem. 26 (1142) 1934.
- 8.—GERHARDT P., DORRELL W. W. Y BALDWIN L. Z. Citric Acid
Fermentation of Beet Molasses.
J. Bact. 52 (555) 1946.
- 9.—GOLDBERG A. S. Y BERNHEIM A. R. Citric Acid Determination.
J. Biol. Chem. 156 (33) 1944.

- 10.—GONZALVES OSWALDO, BENTO MAGALHAES NETO, IVAN LEON-CIO DE ALBUQUERQUE Y SEBASTIAO SIMOES FILHO.
Producao de acido citrico a partir de melazo de cana de Pernambuco.
Vol. II Anais do Associazao Quimica do Brasil.
- 11.—JHONSON M. J. Y SHU P. Production of Citric Acid in Submerged Culture with *A. niger*.
Ind. Eng. Chem. **40** (1202) 1948.
- 12.—LAMB A. R. Utilization of Cane Molasses.
Proc. Hawaiian Sugar Planters' Assn. 56th. Meeting 1936.
- 13.—MAY O. E. Y HERRICK H. T. Production of Organic Acids Form Carbohydrates by Fermentation.
U. S. Dept. Agr. Circular 216, 1932.
- 14.—PERLMAN D., LARDY H. A., JHONSON M. J. Determination of Citric Acid in Biological Materials.
Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. **16** (515) 1944.
- 15.—PERLMAN D., KITA A., PETERSON W. H., Citric Acid Production of Cane Molasses.
Arch. Bioch. **10** (131) 1946.
- 16.—PERLMAN D., DORRELL W. W., JHONSON M. J. Effect of Metallic Ions, on Citric Acid Production.
Arch. Bioch. **11** (131) 1946.
- 17.—PORGES Citric Acid Production by *Aspergillus niger*.
Am. Jour. Bot. **19** (559) 1932.
- 18.—PRESCOTT S. C. Y DUNN C. D. Industrial Microbiology.
Chap. XXV. The citric Acid Fermentation. Mc. Graw Hill Book. New York. 1949.
- 19.—SANCHEZ MARROQUIN A. Prácticas del Curso de Microbiología Química. E. N. C. Q. (U. N. A.) 1950.
- 20.—SMITH G. A. a Introduction to the Industrial Mycology. Edwards Arnold co. Ltd. London 1947.

- 21.—SPENCER G. L. y MEADE G. P. Cane Sugar Handbook.
Jhon Wiley and Sons. New York 1945.
- 22.—SHU P. y JHONSON M. J. Effect of the Composition of the Sporulation Medium on Citric Acid Production by *A. niger* in submerged culture.
Jour. Bact. 54 (2) 161, 1947.
- 23.—SHU P. y JHONSON M. J. The interdependence of the Constituents of the Medium in the Citric Acid Production In Culture Submerged.
J. Bact. 54 (161) 1943.
- 24.—THOM C. y CHURCH M. B. The Aspergillus. The Williams and Wilkins Co. Baltimore 1920.
- 25.—THOM C. y RAPER K. B. Manual of the Aspergilli. The Williams and Wilkins Co. Baltimore 1945.
- 26.—VON LOESECKE H. W. A review of Information on Mycological Citric Acid Production.
Chem. Eng. News. 23 (1952) 1945.
- 27.—Waksman S. A. y KAROW W. A. Citric Acid Production in Submerged Culture.
Ind. Eng. Chem. 39 (821) 1947.
- 28.—WELLS P. A. y HERRICK H. T. Citric Acid Industry.
Ind. Eng. Chem. 30 (255) 1938.
- 29.—WALKER K. T. PATHWAYS OF Acid Formation in *Aspergillus niger* and Related Molds. Advances in Enzimology. F. F. Nord Vol. IX.
Interscience Publishers Inc. New York. 1949.
- 30.—WOLF y WOLF. The Fungi. Vol. II Jhon Wiley and Sons Inc. New York 1947.
- 31.—WOOD H. C. y OSEL A. The dispensatory of the United States of America. 23th. Edition.
J. B. Lippincott Co. 1943. p. 24.