

Caracterización de Una Cepa Nativa de *Aspergillus niger* y Evaluación de la Producción de Ácido Cítrico

Alex Sáez Vega
Liliana Flórez Valdés
Andrés Cadavid Rendón

Fecha de aceptación: 27 de abril de 2002

RESUMEN

Mediante morfología, se llevó a cabo la identificación de la cepa nativa *A. niger* AL01. Se evaluó la producción de ácido cítrico en diferentes medios de cultivo: un medio estándar usando como base sacarosa y en un medio a base de almidón. Mediante un diseño experimental se evaluó la producción a diferentes concentraciones, variando las cantidades de almidón y nitrato de amonio en un diseño de dos factores a tres niveles cada uno. La cepa *A. niger* AL01 produjo bajas cantidades de ácido cítrico (1,113 g/l en sacarosa y 0,209 g/l en almidón) comparadas con las reportadas en la literatura.

Fecha de recepción: 25 de enero de 2002

ABSTRACT

The wild type strain *A. niger* AL 01 was identified, using morphological methods. The production of citric acid was evaluated in different culture media: a standard media with sucrose and a starch media. By means of an experimental design (two factors at three levels each one) the production to different concentrations was evaluated, changing the quantities of starch and ammonium nitrate. The wild strain produced low quantities of citric acid (1,113 g/l in sucrose and 0,209 g/l in starch) compared with those reported in the literature.

PALABRAS CLAVES

• *Aspergillus* • Ácido cítrico • Cepa nativa AL 01

ÁLEX SÁEZ VEGA. Profesor del departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT.
E-mail: asaez@eafit.edu.co

LILIANA FLÓREZ VALDÉS. Departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT.

ANDRÉS CADAVID RENDÓN. Departamento de Ingeniería de Procesos, Universidad EAFIT.

INTRODUCCIÓN

La Biotecnología es la aplicación controlada y deliberada de agentes biológicos sencillos (células vivas o muertas, o componentes celulares), en operaciones técnicamente beneficiosas, bien sea de fabricación de productos o como operaciones de servicios. (Bu'lock, 1991). El ácido cítrico es uno de estos productos, el cual se produce por la fermentación de una fuente de carbono por acción del hongo *Aspergillus niger*. En algunas industrias del mundo se alimenta el hongo con melazas o mieles de la industria del azúcar de caña y azúcar de remolacha (Bada, 1996). En Colombia inicialmente se empleó azúcar refinada como materia prima para la obtención de ácido cítrico en Sucromiles, generando un alto costo de producción. Con los años se han buscado nuevas alternativas de producción más económicas y se ha logrado cultivar el *A. niger* con azúcar morena obteniendo buenos resultados, pero aún el costo es alto. Este trabajo pretende evaluar una cepa nativa en diferentes fuentes de carbohidratos, una alternativa es el almidón, por lo tanto se diseña y evalúa un medio basado en este carbohidrato.

Debido a que Colombia es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, se puede aprovechar la gran cantidad de variedades de cada especie de microorganismos que han ido mutando y evolucionando a través de los años para desarrollar características especiales (Atehortúa, 1999). Una forma de ampliar el conocimiento de la diversidad colombiana es mediante el estudio de cepas nativas, algunas de ellas podrían presentar una buena productividad de ácido cítrico. Por esto se mide y compara la producción de ácido cítrico de una cepa nativa de *A. niger* con valores de cepas referenciadas reportados en la literatura. Para asegurar que la cepa nativa es *A. niger* se hizo una identificación basada en su morfología.

CARACTERIZACIÓN DEL MICROORGANISMO

La cepa utilizada de *Aspergillus niger*, para objeto de reconocimiento se bautizó como *A. niger* AL01, se mantiene en agar Sabouraud en el laboratorio de biotecnología de la Universidad EAFIT.

El *Aspergillus niger* se encuentra en el grupo de los aspergilos negros, el cual se clasifica dentro de la familia *moniliaceae*, orden *moniliales*, clase *hyphomicetes*, filum *deuteromycota*. (Kwon-Chung, 1992). Es importante conocer

las características del grupo de *Aspergillus niger* para su identificación, las cuales son: cabezas conidiales de tonos negro a negro grisáceo, negro café, negro púrpura o negro carbón, son globosas, radiadas o divididas formando columnas de cadenas de conidios irregulares o bien definidas. Los conidióforos son de color hialino a café, típicamente lisos o en pocas especies ligeramente granulares, de paredes robustas, quebradizas, dividiéndose longitudinalmente al ser trituradas. Vesículas globosas o casi globosas, hialinas o de color café claro a oscuro. Esterigmata en una o dos series dependiendo de las especies, con frecuencia profundamente coloreadas. Los conidios son globosos o subglobosos, elípticos o achatados horizontalmente, lisos o casi lisos, espinosos, o con estriaciones longitudinales marcadas. Esclerotia globosa o subglobosa, de coloración crema cuando es joven, tornándose rosada, gris o café. (Raper, 1965).

Este trabajo pretende evaluar una cepa nativa en diferentes fuentes de carbohidratos, una alternativa es el almidón, por lo tanto se diseña y evalúa un medio basado en este carbohidrato.

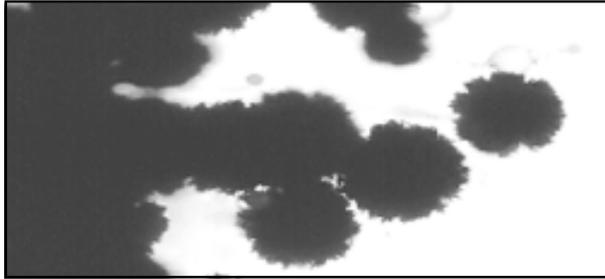
La caracterización morfológica de la cepa de *A. niger* AL01 confirma que la cepa empleada se trata de un *Aspergillus niger* Van Thiegem Var. Níger, y muestra las características principales detalladas para la identificación, las cuales se observan en la Figura 1.

MÉTODOS

El objetivo de este experimento es conocer la evolución en el tiempo del desarrollo del hongo y su producción de ácido cítrico cultivado en un medio estándar (contiene por litro: Sacarosa, 190 g; NH_4NO_3 , 2,3 g; KH_2PO_4 , 1,0 g; MgSO_4 , 0,3 g (Jagnow, 1991).) y en medios diseñados en almidón. El procedimiento para el medio estándar, se resume en la figura 2.

El inóculo está constituido por suspensiones de conidios, las cuales se preparan tomando tubos incubados durante cinco días a 30 °C en agar Sabouraud, adicionándoles 5 mL de una solución estéril al 0,8% de Tween 80 a cada tubo. (Roukas, 1986). Para lograr homogeneidad en el inóculo, se mezclan las suspensiones de varios tubos según la cantidad necesaria de inóculo para el cultivo. Este procedimiento se lleva a cabo en la cabina de flujo laminar vertical.

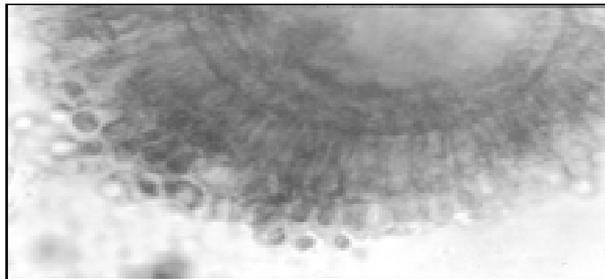
FIGURA 1
Imágenes de las características principales para la identificación



Cabezas conidiales (globosas)



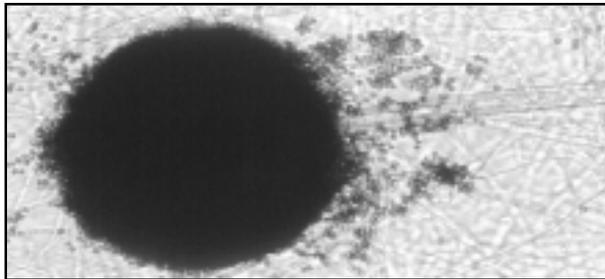
Cabezas conidiales mostrando las columnas



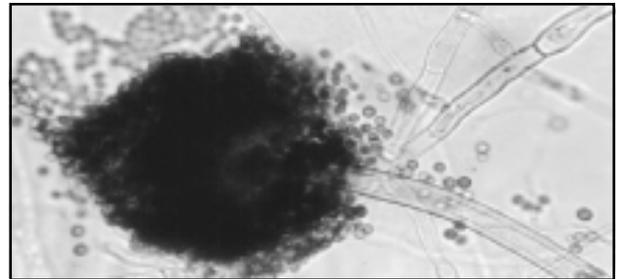
Vesícula, métulas, fiálides y conidios



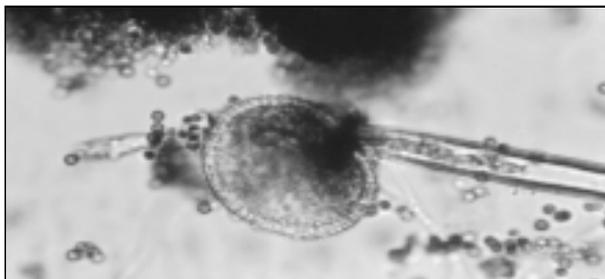
Vesícula, métulas, fiálides y conidios



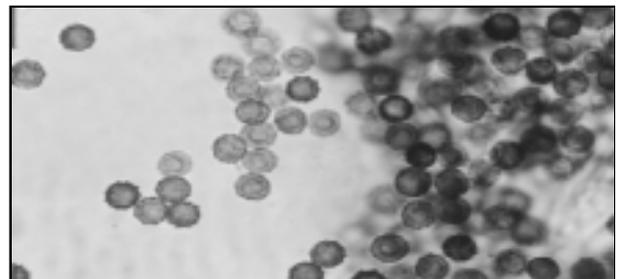
Cabeza conidial



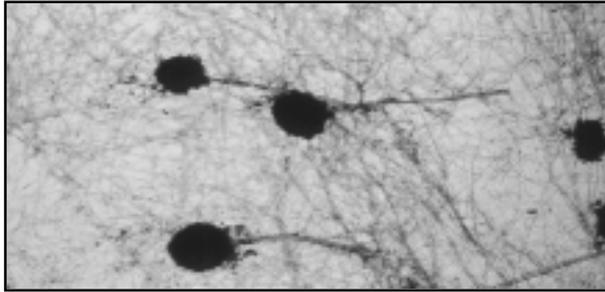
Cabeza conidial



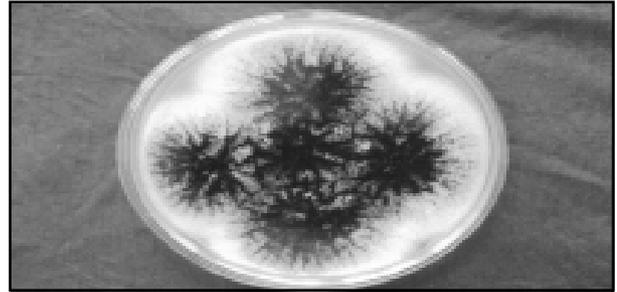
Conifióforo, vesícula y métulas



Conidios

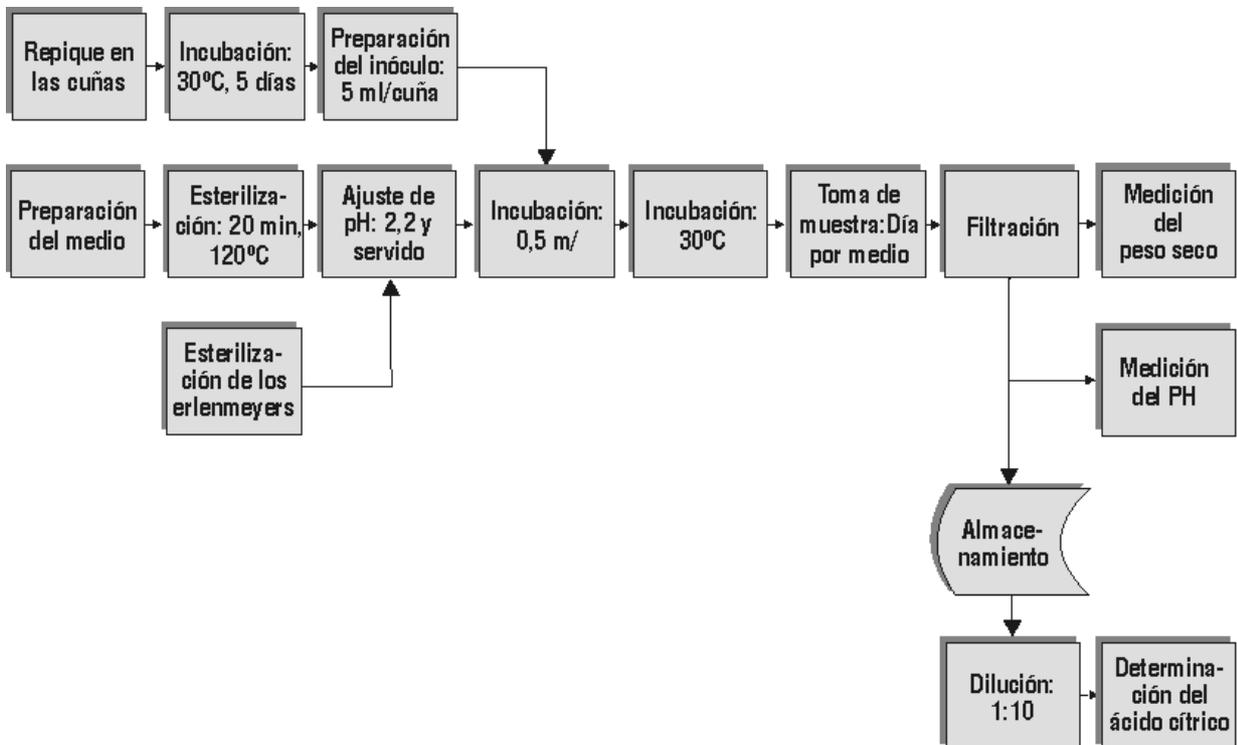


Hifas, conifióforos y cabezas conidiales



Colonias en placas petri con esporulación

FIGURA 2
Procedimiento para la determinación de la cinética de biomasa y producto



El objetivo de este experimento es conocer la evolución en el tiempo del desarrollo del hongo y su producción de ácido cítrico cultivado en un medio estándar (contiene por litro: Sacarosa, 190 g; NH_4NO_3 , 2,3 g; KH_2PO_4 , 1.0 g; MgSO_4 , 0.3 g (Jagnow, 1991).) y en medios diseñados en almidón.

Para la fermentación, se emplea cultivo en superficie, el medio se esteriliza en el autoclave a 120 °C por 20 min, se ajusta el pH a 2,2. Se inocula 0,5 mL de suspensión de conidios, los erlenmeyers, ya inoculados se llevan a incubar a 30 °C. Se muestrea cada dos días y se mide biomasa, pH y ácido cítrico de cada erlenmeyer con su replica, durante 16 días.

Se diseñaron medios de cultivo, en diversas concentraciones, de almidón y nitrato amónico, fijando los demás componentes (KH_2PO_4 , MgSO_4).

El arreglo experimental se configura al combinar los factores que se observan en la tabla 1. Cada muestra se llevó a cabo por duplicado.

TABLA 1
Arreglo experimental

		Nitrato amónico (g/l)		
Almidón (g/l)	Muestra	0.145	0.726	1.453
	10	1	2	3
	50	4	5	6
	100	7	8	9

Los medios se preparan con las cantidades correspondientes de almidón y nitrato de amonio, y se adicionan las mismas cantidades de sales que en el medio estándar, se ajusta el pH a 2,2 y se sirve 100 mL de medio en erlenmeyers de 500 mL, se esterilizan a 120°C por 20 min. Se inoculan con 0,5 mL de la suspensión de conidios y se incuban a 30 °C. En este caso la fermentación se lleva a cabo en zaranda a 120 rpm (Suzuki, 1996). Para la medición del ácido cítrico, se utiliza el método de Hartford (1962).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la cinética de biomasa y producto en medio estándar

En la tabla 2, se encuentran los valores promediados de cada muestra con su réplica, de los datos de biomasa, concentración de ácido cítrico y pH como factor relacionado con la producción de ácido. La cinética de biomasa se encuentra en la figura 6. El peso seco se determinó de la totalidad de caldo de cada erlenmeyer, por lo tanto, la biomasa total está dada para 100 mL, y se expresa en g/L.

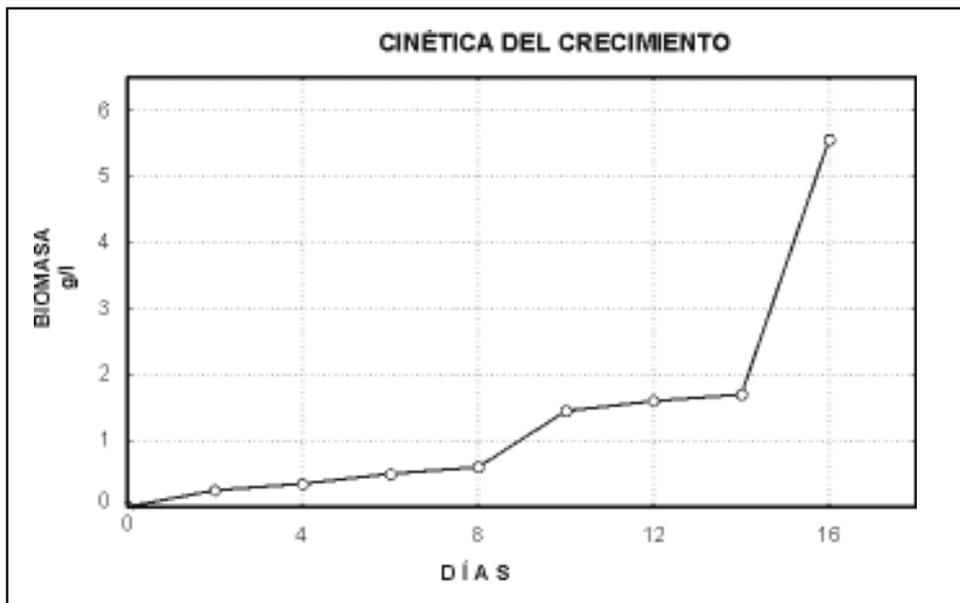
TABLA 2
Determinación de la cinética de biomasa y producto

Días	Ácido cítrico (mg/L)	Biomasa (g/L)	pH
0	-	-	2,20
2	16,667	0,25	2,15
4	41,667	0,35	2,15
6	194,444	0,5	2,09
8	158,333	0,6	2,06
10	530,556	1,45	1,98
12	805,556	1,6	1,77
14	1113,889	1,7	1,80
16	1072,222	5,55	1,83

En la figura 3 se observa un crecimiento lento los primeros ocho días, seguido de un crecimiento más acelerado que pareciera continuar después de los 16 días. Estas características muestran una fase de adaptación (lag) muy larga y la fase de crecimiento exponencial pendiente, pero no se encuentra la fase estacionaria debido a que el *A. niger* AL01 tiene un desarrollo muy lento

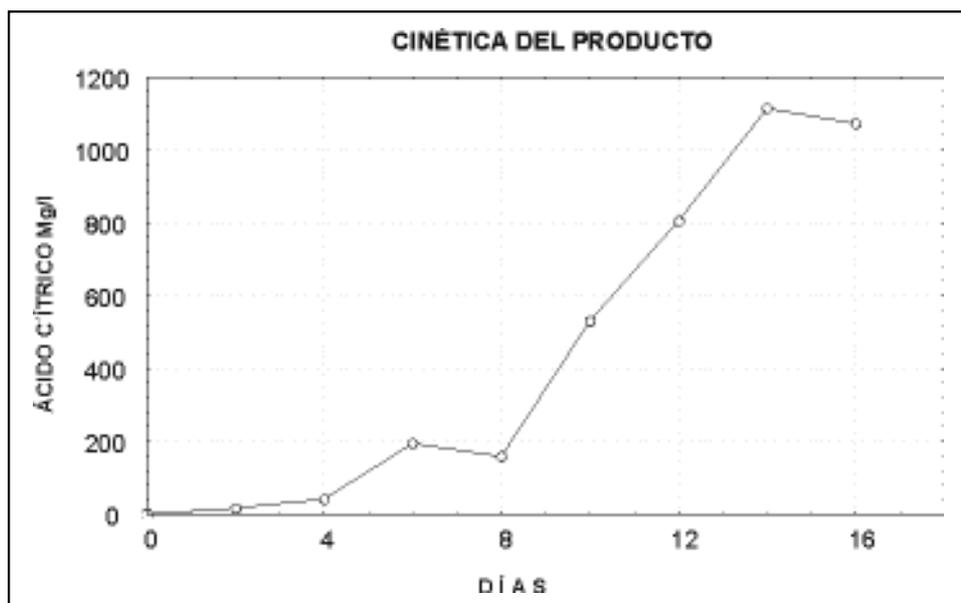
El pH decrece los primeros ocho días, asociado a una producción lenta de ácido cítrico, en los días diez y doce, se muestra una disminución aún más rápida con una posterior estabilización.

FIGURA 3
Cinética del crecimiento



La figura 4, indica que la producción del ácido cítrico aumenta a medida que crece el hongo, dando un máximo a los 14 días de 1113,88mg/L, luego baja hasta alcanzar una concentración final de 1072,22 mg/L a los 16 días. Este fenómeno se puede explicar por el decaimiento en la actividad del sistema enzimático responsable de la producción de ácido cítrico al consumirse la sacarosa. (Kristiansen, 1979).

FIGURA 4
Cinética del ácido cítrico en medio estándar



Determinación de producto en diferentes medios de almidón

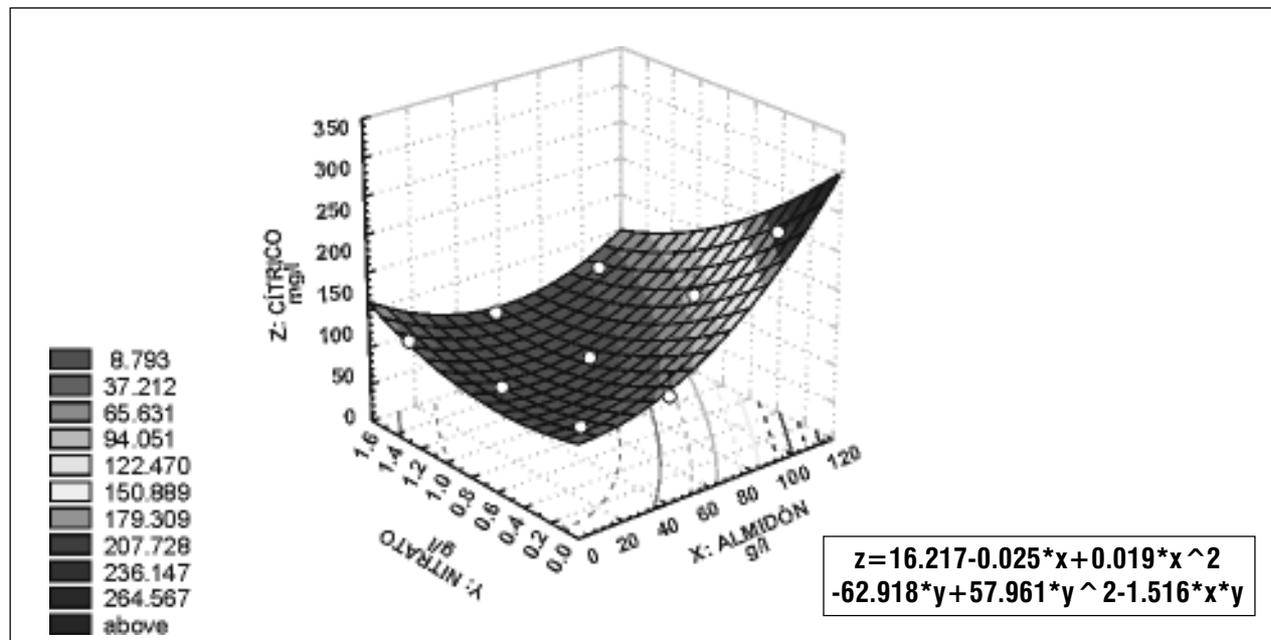
Los datos de concentración a los 16 días se encuentran en la tabla 3.

TABLA 3
Datos de concentración de ácido cítrico, en almidón

Muestras	Concentración (mg/L)
1	12,333
2	9,630
3	4,444
4	10,000
5	8,889
6	3,472
7	208,667
8	49,444
9	21,944

En la figura 5, se observa la relación entre la producción de ácido cítrico con la concentración de almidón y nitrato de amonio. La superficie muestra una tendencia creciente de la concentración de ácido cítrico al aumentar el contenido de almidón en el medio y al reducir el contenido de nitrato de amonio sin presentar un máximo local.

FIGURA 5
Superficie de respuesta de ácido cítrico en almidón
Dos factores a tres niveles



Comparación de datos de producción de ácido cítrico de la cepa nativa con datos bibliográficos

En la tabla 4 se resumen los datos de concentración de ácido cítrico, reportados por los diferentes autores. Analizando estos datos, se observa que a pesar de las diferencias en los medios y tipos de cultivo (que son factores muy influyentes en la producción del ácido cítrico), se puede concluir que la cepa AL01 presenta unos rendimientos muy bajos en comparación con las cepas altamente productoras de ácido cítrico.

TABLA 4
Resumen de datos de concentración de los diferentes autores

Autor	Cepa de <i>A. niger</i>	Concentración máxima de ácido cítrico (g/l)	Tipo de cultivo	Fuente de carbono
Yun-Ling	TD-01	200	Sumergido	Almidón
Suzuki	C192	69,500	Zaranda	Almidón
Rugsaseel	CHM I-C3	69,400	-	Glucosa
Saha	-	68,900	MRBC	Sacarosa
Rugsaseel	WU-2223L	63,090	-	Glucosa
Suzuki	Yang #2	45,130	Zaranda	Almidón
Roukas	ATCC 9142	18	Superficie	SGL
Kirimura	Yang #2.	15,400	Zaranda	Glucosa
Pazouki	NCIM 548	12	Zaranda	Melaza
Roukas	ATCC 9142	11	Superficie	LTS
Roukas	ATCC 4967	9	Superficie	LTS
Roukas	ATCC 4967	8	Superficie	SGL
Doelger	Van Tieghem	5,280	Superficie	Sacarosa
Cadavid y Flórez	AL01	1,113	Superficie	Sacarosa
Cadavid y Florez	AL01	0,209	Zaranda	Almidón

CONCLUSIONES

Morfológicamente se concluye que la cepa nativa AL01 se trata de un *Aspergillus niger* Van Tieghem

Se puede concluir que la cepa nativa de *Aspergillus niger* AL01 es muy baja productora de ácido cítrico, al comparar su productividad con la de cepas que han sido mutadas o seleccionadas para producir altas cantidades de ácido cítrico.

Al comparar la producción de ácido cítrico en el medio estándar a base de sacarosa con la que se obtiene en el medio a base de almidón se concluye que el almidón, aunque sirve como medio para la producción de ácido cítrico, no genera un alto rendimiento.

Al usar almidón como fuente de carbono, la mayor concentración de ácido cítrico se logró cuando el medio contenía 100 g/L de almidón y 0,145 g/L de nitrato de amonio. En el caso del medio a base de sacarosa, el máximo de concentración de ácido cítrico se alcanzó a los 14 días.

BIBLIOGRAFÍA

- Atehortúa, Lucía. (1999). Biodiversidad, Biotecnología y Bioindustria. En: *JORNADAS ACADÉMICAS DE INGENIERÍA DE PROCESOS*. **No. 4**, 1999: Medellín). Memorias.
- Bada, M.A. (1996). Los Campos de Acción del Ingeniero Bioquímico en la Manufactura del Ácido Cítrico. En: Galindo, E. Fronteras en biotecnología y Bioingeniería. México: Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, pp. 109-112.
- Blair, Gary and Staal, Philip. (1993). Citric Acid. En: Kirk, Raymond and Othmer, Donald. Encyclopedia of Chemical Technology. 4 ed. New York : John Wiley & sons, pp. 354-373.
- Bos, C.J. y Swart, K. (1995). Genetics of *Aspergillus*. En: *The Mycota II : Genetics and Biotechnology*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 19-32.
- Bu'lock, John. (1991). Biotecnología Básica. Zaragoza: Acibia, pp. 3-10.
- Chen, Hang-Chang. (1996). Optimizing the Concentration of Carbon, Nitrogen, and Phosphorus in a Citric Acid Fermentation with Response Surface Method. En: *Food Biotechnology*. Vol. 10, **No 1**. p. 13-27.
- Daniel, St. and Brauer, H. (1994). Continuous production of citric acid in the reciprocating-jet-bioreactor. En: *Bioprocess Engineering*. Vol. 11, **No. 4**, pp. 123-127.
- Doelger, W.P. and Prescott, S.C. (1934). Citric Acid Fermentation. En: *Industrial and Engineering Chemistry*. Vol. 26, **No. 11**, pp. 1142-1149.
- Godo, S. et al. (1999). Mixing time in airlift reactors during citric acid fermentation. En : *Bioprocess Engineering*. Vol. 21, **No. 3**, pp. 245-248.
- Hartford, Clark G. (1962). Rapid Spectrophotometric Method for the Determination of Itaconic, Citric, Aconitic, and Fumaric Acids. En: *Analytical Chemistry*. Vol. 34, **No. 3**. pp. 426-428.
- Kirimura, K. et al. (1999). Amylose-like polysaccharide accumulation and hyphal cell-surface structure in relation to citric acid production by *Aspergillus niger* in shake culture. En: *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 52, **No. 3**. pp. 421-428.
- Roukas, T. and Kotzekidou, P. (1986). Production of Citric Acid Using *Aspergillus niger*. En: *Journal of Food Science*. Vol. 51, **No. 1**. p. 225-226.
- Kwon-Chung, K.J. and Bennett, Jhon. (1992). Medical Micology. Filadelfia-London: Lea & Febiger, pp. 223-234.
- Mayilvahanan, D. et al. (1996). Citric acid production: Part 1: Strategies for reduction in cycle time for targeted yields. En: *Bioprocess Engineering*. Vol. 15, **No. 6**, pp. 323-326.
- Mycology online:*Aspergillus niger*. (2001). <http://www.mycology.adelaide.edu.au/> abril
- Rakshit, S.K. et al. (1994). A fed batch surface culture process for the production of citric acid. En: *Bioprocess Engineering*. Vol. 11, **No. 5**, pp. 199-201.
- Raper, Keneth and Fennelthe Williams & Wilkins company, pp. 293-344.
- Roukas, T. and Kotzekidou, P. (1986). Production of Citric Acid by Surface Fermentation Using *Aspergillus niger*. En: *Journal of Food Science*. Vol. 51, **No. 1**, pp. 225-226.
- Rugsaseel, S. et al. (1996). Citric acid mutant strains of *Aspergillus niger*. En: *Applied Microb. and Biotech.* Vol. 45, **No. 1/2**, pp. 28-35.
- Saha, Mihir Lal and Takahashi, Fujio. (1997). Continuous Citric Acid Fermentation by Magnetic Rotating Biological Contactors Using *Aspergillus niger* AJ 117173. En: *Journal of Fermentation and Bioengineering*. Vol. 84, **No. 3**, pp. 244-248.
- Saniez, Marie-Helen. (1999). Method for producing citric acid. Patent US5928911.
- Smith, George. (1963). Introducción a la Micología Industrial. Zaragoza : Acibia, pp. 283-315, 332-346.
- Sucromiles S.A. (2000). Sucromiles. <http://www.coltejer.com.co/oal/sucromil.htm>. [Consulta: 17 de agosto].
- Suzuki, Atsushi et al. (1996). Direct Production of Citric Acid from Starch by Mutant Strain of *Aspergillus niger*. En: *Journal of Fermentation and Bioengineering*. Vol. 81, **No. 4**, pp. 320-323.
- Yun-Ling, Yu et al. (2000). Studies on Citric Acid Fermentation by *Aspergillus niger* from Starch. <http://wdcn.nig.ac.jp/wfcc/ICCC7/rk030.html>. [Consulta: 20 de septiembre].

*Correos
de Colombia*



ADPOSTAL

Llegamos a todo el mundo!



Llame gratis a nuestras nuevas
líneas de atención al cliente

018000-915525

018000-915503

Visite nuestra página web
www.adpostal.gov.co