

Estudio fisiológico de la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* O-5

Lutgarda Abín, Orquídea Coto, Bladimir Marrero y Jeannette Marrero.

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Calle 25 entre J e I, El Vedado, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Código Postal 10400, Cuba.

Recibido: 1 de abril de 2002. Aceptado: 18 de octubre de 2002.

Palabras clave: hongos, ácido cítrico, *Aspergillus niger*.
Key words: fungi, citric acid, *Aspergillus niger*.

RESUMEN. Existe un gran interés en la búsqueda de tecnologías limpias que permitan disminuir el impacto ambiental que ocasiona la industria minera. La lixiviación biológica con empleo de hongos filamentosos puede ser una alternativa para el tratamiento de los minerales no sulfurados. Los ácidos orgánicos que producen los hongos han sido estudiados a nivel de laboratorio para disolver los metales presentes en los minerales oxidados. Las cepas de *Aspergillus niger* productoras de ácido cítrico son de las más empleadas para la biolixiviación de minerales lateríticos, por lo que es importante determinar las condiciones de cultivo que garanticen mayores producciones de este ácido orgánico. En este trabajo se estudió la influencia de la edad del inóculo (72, 96, 112, 120 y 144 h), del volumen de inóculo (2,5; 5 y 7 %), del volumen de medio (20 y 40 %) y de la aireación (cultivo sumergido y superficial), sobre la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* O-5. Las mayores producciones de ácido cítrico fueron obtenidas con un volumen efectivo de medio del 20 %, un volumen de inóculo del 5 % con una edad de 112 h. El cultivo sumergido favoreció el crecimiento del hongo y su producción de ácido cítrico se incrementó en casi 5 g/L con relación al cultivo superficial a los 7 d de incubación. Sin embargo, el rendimiento producto/biomasa en cultivo superficial superó en un 17 % al obtenido en cultivo sumergido. Además la relación entre crecimiento de *A. niger* O-5 y su producción de ácido permitió clasificar esta fermentación como tipo I (asociada).

ABSTRACT. Due to an increasing demand for valuable metals, there is a great interest in looking for alternative technologies that improve the environmental impact caused by mining industry. Biological leaching could be an alternative for processing nickel laterite ores. The organic acids from fungi are used for dissolving metals from ore. Citric acid producer strains of *A. niger* are the most employed bioleaching. Therefore it is important determining the best culture conditions for higher productions of this organic acid. In this work the influence of incubating time of inoculums (72, 96, 112, 120 and 140 h), inoculums volume (2,5; 5 and 7 %), culture media volume (20 and 40 %) and aeration (superficial and submerged culture) on citric acid production of *A. niger* O-5, a Cuban strain isolated of acidic media was studied. The highest production of citric acid was obtained with inoculums of 112 h, 20 % of culture media volume and 5 % of inoculums volume. On the other hand the fungal growth in submerged culture was increased and was obtained almost 5 g/L of citric acid, more than on superficial cultures. Nevertheless, the product/biomass yield was higher using superficial cultures than submerged cultures. According to the relation between product and biomass, it can classify citric acid production by *A. niger* O-5 as fermentation type I (associated).

INTRODUCCION

Los procesos de biolixiviación de minerales lateríticos precisan de la intervención de microorganismos heterótrofos productores de ácidos orgánicos, dentro de los que se destacan los hongos filamentosos, especialmente los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*.^{1,2} Los ácidos cítrico, oxálico, glucónico, tartárico y pirúvico han sido los más referidos en la literatura con buena capacidad de solubilización del níquel y el cobalto. Entre ellos, el ácido cítrico es el mejor agente lixivante.³⁻⁵

Para la producción industrial de ácido cítrico, metabolito intermedio del ciclo de los ácidos tricarbónicos se emplean fundamentalmente cepas de *Aspergillus niger*. Para favorecer su acumulación y una superproducción se requiere de un desbalance del metabolismo microbiano. Este desbalance se logra al desviar el metabolismo de los azúcares hacia la acumulación del ácido cítrico en detrimento del crecimiento.⁶ Entre los factores a tener en cuenta están los factores físicos y químicos como pH, temperatura, inóculo, aireación y además, la composición del medio de cultivo, entre otros.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de la edad y el volumen de inóculo, del volumen de medio y la aireación sobre la producción de ácido cítrico por *A. niger* O-5.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismo

Se utilizó la cepa *Aspergillus niger* O-5 aislada como contaminan-

te de un medio ácido (pH 2,5) que permite el desarrollo de bacterias heterótrofas acidófilas.⁷ Se conservó en cuñas de agar Sabouraud glucosa a temperatura de 4 °C .

Medio de producción

Para el cultivo del hongo se empleó azúcar de caña (blanco directo) 14 %, extracto de levadura 0,3 %, KH₂PO₄ 0,05 % y MgSO₄ · 7H₂O 0,0125 %, pH 6,0.⁸

Inóculo

Se trabajó con suspensiones de esporas (10⁷ esporas/mL) procedentes de cultivos en cuñas de agar Sabouraud glucosa con tiempos de incubación de 72, 88, 96, 112, 120, 144 y 168 h . Los erlenmeyers con medio de producción fueron inoculados con 2,5; 5 ó 7,5 % de suspensión de esporas.

Cultivo

El estudio se desarrolló en erlenmeyers de 250 mL con 50 y 100 mL de medio de producción, con el objetivo de lograr volúmenes efectivos del 20 y el 40 %, respectivamente. Los cultivos fueron incubados con agitación, en zaranda orbital IKA-KS 501 a 150 r/min, temperatura ambiente (entre 25 y 30 °C) durante 7 d .

Para determinar la cinética de la producción del ácido cítrico y el crecimiento del microorganismo se incubó en paralelo, bajo condiciones estáticas y agitadas, para lo cual, se tomaron muestras a intervalos (3, 5, 7, 10 y 17 d).

Determinación de la producción de ácido cítrico, crecimiento y rendimientos

Al concluir el tiempo de incubación todos los cultivos se filtraron por papel Whatman No. 1. A los filtrados se les determinó la concentración de ácido cítrico, mediante una técnica colorimétrica que emplea piridina y anhídrido acético⁹ y el contenido de azúcares totales, utilizando la técnica del fenol-sulfúrico. Se siguió el crecimiento por medida del peso seco de la biomasa retenida en el papel de filtro. Por último,

se calcularon los rendimientos producto/sustrato (Y P/S) y producto/biomasa (Y P/B):

$$Y P/S = \frac{\text{Acido cítrico obtenido (g/L)}}{\text{Sustrato consumido (g/L)}} \cdot 100$$

$$Y P/B = \frac{\text{Acido cítrico obtenido (g/L)}}{\text{Biomasa (peso seco) (g/L)}} \cdot 100$$

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza de clasificación simple y una comparación de medias por Duncan, (n = 3, p < 0,5).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
Influencia de la edad del inóculo

La mayor producción de ácido cítrico por *A. niger* O-5 correspondió al inóculo de esporas con 112 h de incubación (10 g/L), valor que difiere significativamente del resto de las edades de los inóculos ensayados (Tabla 1). Le siguieron en orden decreciente los inóculos de 96, 120 y 144 h de incubación, entre los cuales no se observaron diferencias significativas. Estos resultados indican que el estado fisiológico de los cultivos influye en la acumulación y posterior excreción de este ácido orgánico.

Volumen efectivo/volumen total

Dentro de los factores a tener en cuenta durante un cultivo discontinuo (*batch*) se encuentra la concentración apropiada de oxígeno disuelto que permita el desarrollo del microorganismo y la formación del producto de interés. Uno de los factores que influyen en este sentido es la relación entre el volumen de medio de cultivo y la capacidad del erlenmeyer, ya que a mayor cantidad de medio nutritivo en los frascos se limita la superficie expuesta al aire, lo que conduce a una disminución del acceso del oxígeno hacia el interior del medio.¹⁰ Durante el desarrollo de ensayos de biolixivia-

ción es usual utilizar un volumen efectivo de medio de 40 %, ^{4,11-13} mientras que en los procesos fermentativos de producción de ácido cítrico los volúmenes efectivos mas empleados son 10 y 20 %.¹⁴⁻¹⁶ De ahí la necesidad de determinar el comportamiento de la producción de ácido cítrico por *A. niger* O-5 a volúmenes de 20 y 40 % (Fig. 1). A un menor volumen efectivo (20 %) se logró una concentración de ácido cítrico significativamente superior a la obtenida al 40 %, para un 10,37 y 7,74 g/L, respectivamente. Como era de esperar los mayores valores de Y P/S y Y P/B correspondieron al 20 % de volumen efectivo. Estos resultados corroboran que las fermentaciones aerobias son más eficientes a relaciones de volumen de medio/volumen del frasco del 20 %.¹⁷

Volumen del inóculo

La cantidad de inóculo afecta el crecimiento de la cepa en el medio de cultivo, por lo que es importante conocer la influencia de este factor sobre la producción de ácido cítrico por *A. niger* O-5. Se observó que en la medida que incrementó el volumen de inóculo, la biomasa, determinada como peso seco, también aumentó (Fig. 2). Pero no ocurrió lo mismo con el Y P/B, ya que este parámetro depende de la relación entre el ácido cítrico producido y el crecimiento. Con un volumen de inóculo del 5 % se alcanzó el mayor rendimiento Y P/B (32 %), la mayor concentración de ácido cítrico (12,25 g/L), pero no la mayor biomasa (38,2 g/L). Estos valores difieren significativamente de lo alcanzado con 2,5 y 7,5 % de inóculo. Esos resultados reafirman la importancia de lograr un balance adecuado entre producto y biomasa para lograr una buena producción de ácido cítrico.¹⁸

Efectos de la aireación

El ácido cítrico se puede obtener por cultivo sumergido (agitado) o por cultivo superficial (estático). Solo el 10 % de la producción mundial se realiza por cultivo superficial,¹⁹ ya que es menos productivo, aunque mucho más barato. Se reportan incluso cepas muy produc-

Tabla 1. Efectos de la edad del inóculo sobre la producción de ácido cítrico por *A. niger* O-5.

Edad de las esporas	72	88	96	112	120	144	168
Acido cítrico (g/L)	8,67	9,3	9,57	10,16	9,73	9,70	8,85
Análisis estadístico	d	c	b	a	b	b	d

Volumen efectivo de medio del 40 %. Incubación en agitación (150 r/min) y a temperatura ambiente, 8 d . (n = 3, p < 0,05).

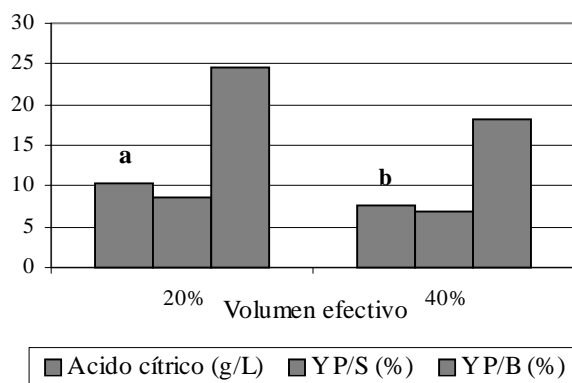


Fig. 1. Efectos del volumen de medio/volumen del erlenmeyer sobre la producción de ácido cítrico por *A. niger* O-5. Resultados de YP/B y YP/S. Inóculo de 112 h. Incubación a 150 r/min, temperatura ambiente, 7 d. Resultados del Duncan.

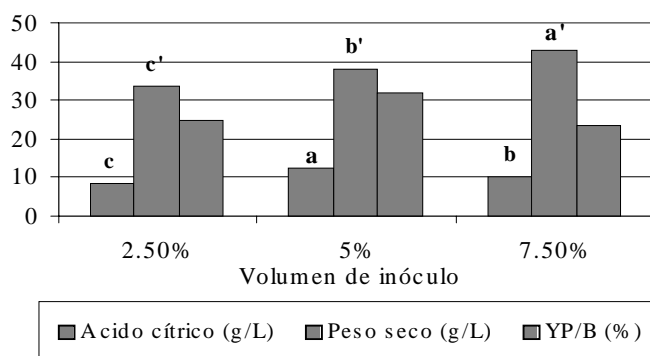


Fig. 2. Efectos del volumen de inóculo sobre la producción de ácido cítrico y el crecimiento de *A. niger* O-5. Volumen efectivo de medio del 20 %. Inóculo de 112 h de incubación. Incubación en agitación (150 r/min), temperatura ambiente, 7 d. Resultados del Duncan.

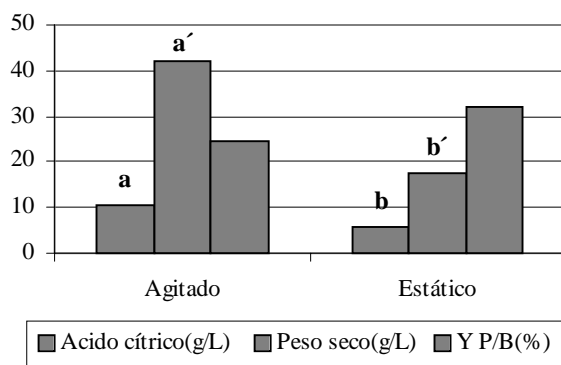


Fig. 3. Efectos de la aireación sobre la producción de ácido cítrico y el crecimiento de *A. niger* O-5. Volumen efectivo de medio del 20 %. Inóculo de 112 h. Incubación a temperatura ambiente, 7 d, en estático y agitado (150 r/min). Resultados del Duncan.

toras en este tipo de cultivo.²⁰ Se comparó la producción de ácido cítrico, el crecimiento y el rendimiento de la cepa O-5 al cultivarla durante 7 d en ambas condiciones (Fig. 3). La fermentación en cultivo sumergido favoreció el crecimiento del microorganismo (42,09 g/L), lo que permitió lograr casi 5 g/L más de ácido cítrico que en cultivo superficial. Sin embargo, al relacionar am-

bas variables se aprecia que bajo condiciones estáticas el rendimiento producto/biomasa (Y P/B) superó en un 7 % al obtenido en cultivo sumergido, ya que en el superficial el crecimiento del hongo fue mucho menor. En los cultivos superficiales el oxígeno se comporta como un factor limitante del crecimiento, y estas condiciones favorecen la producción de una mayor cantidad de

ácido cítrico por unidad de biomasa.²¹

Teniendo en cuenta estos resultados se determinó la concentración del ácido cítrico en el tiempo bajo condiciones de cultivo superficial y sumergidas. En cultivo superficial la excreción del ácido cítrico se incrementó gradualmente, con lo que se alcanzó una concentración de 19 g/L a los 10 d de incubación, para un valor máximo de 21 g/L a los 17 d (Fig. 4). Este valor no difiere de lo obtenido en cultivo sumergido a los 7 d de incubación.

La tendencia de la curva de producción de ácido cítrico evidencia que después de los 10 d de incubación la cinética del proceso disminuye notablemente, obsérvese que entre los días 10 y 17, la concentración de este metabolito en el medio se incrementó solo en 2 g/L (Fig. 4). Al relacionar el crecimiento con la concentración de ácido cítrico se obtuvieron bajo condiciones estáticas un rendimiento producto/biomasa de 109,4 %, mientras que el máximo Y P/B alcanzado en cultivo sumergido fue de 92 %. Esto demuestra que el cultivo superficial favorece las condiciones para obtener una mayor cantidad de producto por unidad de biomasa,²⁰ ya que la acumulación del ácido cítrico se beneficia bajo condiciones que limiten el crecimiento.²¹ También es conocido que cuando el crecimiento microbiano se detiene, la actividad de la citrato sintasa, enzima que condensa el acetyl CoA y el ácido oxaloacético, aumenta casi diez veces, mientras que la actividad de la aconitasa disminuye notablemente, enzima responsable del paso del ácido cítrico a isocítrico y luego, a otros intermediarios del ciclo hasta llegar a oxalacetato.

Por otro lado, el crecimiento de *Aspergillus niger* O-5 y su producción de ácido cítrico ocurrieron simultáneamente (Fig. 4) por lo que se reafirma que el ácido cítrico es un metabolito primario,^{6,22} y la fermentación puede catalogarse como tipo I (asociada al crecimiento) teniendo en cuenta la clasificación de Crueger y Crueger.⁶ La relación entre biomasa y producto bajo condiciones de cultivo sumergido también se corresponde con una fermentación tipo I.

Con este trabajo se reafirma que la síntesis de ácido cítrico depende de la cepa, del medio de cultivo y de las condiciones de incubación.^{21,23-25}

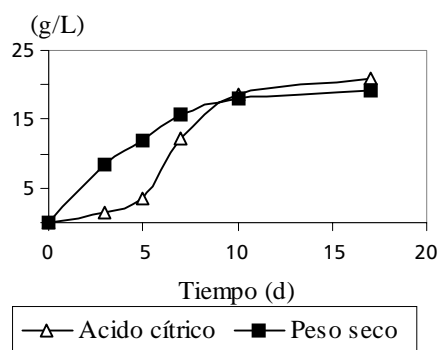


Fig. 4. Cinética de la producción de ácido cítrico y del crecimiento de *A. niger* O-5. Volumen efectivo de medio del 20 %. Inóculo de 112 h. Incubación en estático, a temperatura ambiente.

CONCLUSIONES

La producción de ácido cítrico por *A. niger* O-5 se ve favorecida al utilizar un volumen de inóculo del 5 % con esporas de 112 h de incubación, en frascos con un volumen efectivo de medio del 20 %.

El cultivo superficial favorece el rendimiento producto biomasa en comparación con el cultivo sumergido.

BIBLOGRAFÍA

1. Burgstaller W. and Schinner F. Leaching of metal with fungi. **Journal of Biotechnology**, **27**, 91, 1993.
2. Ehrlich H.L. Past, present and future of biohydrometallurgy. Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st Century. Amils y Ballester (Ed.). Part A, Elsevier, Madrid, España, 3-12, 1999.
3. Alibhai K., Dudeney A.W.L. and Leak D.J. Bioleaching and bioprecipitation of nickel and iron from laterites. Biohydrometallurgy IX International Symposium. J. Cardoso and R.W. Lawrence (Ed.), Portugal, 3.2.28-3.2.29, 1991.
4. Tarasova I.I., Khavski N.N., Khairullina R.T., Karavaiko G.I. and Dudeney A.W.L. Red mud leaching with fungal metabolites. Biohydrometallurgical processing. T. Vargas, C. Jerez, J. Wiertz and H. Toledo (Ed.). Universidad de Chile, Vol. I, 379-384, 1995.
5. Bosecker K. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. **FEEM**

- Microbiology Review**, **20**, Elsevier, 591, 1997.
6. Crueger W. and Crueger A. *Biotechnology: a Textbook of Industrial Microbiology*. Science teach Publisher. Madison, Wisconsin, 134-142, 1990.
7. Abín L., Coto O., Gomez Y. and Bosecker K. Screening of fungi with capacity for organic acid production. **Revista Biología**, **16**, 69, 2002.
8. Abín L., Coto O., Gomez Y. and Bosecker K. Isolation and characterization of indigenous microbiota from lateritic nickel ore of Moa mine. **Revista Biología**, **16**, 66, 2002.
9. Marrier J.R. and Boulet M. Direct determination of citric acid in milk, improved pyridine-acetyl anhydride method. **Journal Dairy Science**, **41**, 1689, 1958.
10. Demain A.L. and Salomon N.A. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. American Society Microbiology. Washington D.C., USA, 140-142, 1986.
11. Bosecker K. Leaching of lateritic nickel ores with heterotrophic microorganisms. Proceeding of the 6th International symposium of Biohydrometallurgy. W. Lawrence, A. Branion and E. Ebner (Ed.), Oxford, 367-382, 1986.
12. Tarasova I.I. and Khavski N.N. The effect of ultrasonic on the bioleaching of laterites. Biohydrometallurgical technologies. A. Torma, J. Wey and V. Lakshmanan (Ed.). The Mineral, Metals and Materials Society, 357-361, 1993.
13. Tungaviveshkul T., Thiravetyan P. and Tantichaoren M. Mechanisms for

bioleaching of zinc silicate residue by organic acid producing microorganisms. Biohydrometallurgical processing. T. Vargas, C. Jerez, J. Wiertz and H. Toledo (Ed.). Universidad de Chile. Vol. I, 385-393, 1995.

14. Rugsaseel S., Kirimura K. and Usami S. Citric acid accumulation by cicloheximide-sensitive mutant strain of *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **45**, 28, 1996.
15. Pintado J., Torrado A., Gonzalez M.P. and Murado M.A. Optimization of nutrient concentration for citric acid production by solid-state culture of *Aspergillus niger* on polyurethane foams. **Enzyme and Microbiology**, **23**, 149, 1998.
16. Jianlong W. and Ping L. Phytate as stimulator of citric acid production by *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, **33**, 313-316, 1998.
17. Calam C.H. Shake-Flask fermentation. *Industrial Microbiology and Biotechnology*. Chapter 1, Prentice Press, USA, 59-61, 1986.
18. Kubicek C.P. and Rohr M. Citric acid fermentation. **CRC. Critical review. Biotechnology**, **3**, 331, 1986.
19. Madigan M.T., Mantinko J.M. and Parker J. *Biology of Microorganism-Brock*. 8th edition. Prentice Hall, Inc. Chapter 12, 431-456, 1997.
20. Rugsaseel S., Morikawa S., Kirimura K. and Usami S. Stimulation of citric acid production in *Aspergillus niger* addition of viscous substances in shake culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **42**, 839, 1995.
21. Wang J.L. and Liu P. Phytate as a stimulator of citric acid production by *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, **33**, 313, 1998.
22. Smith J.E. *Biotechnology*, third edition, University Press, Cambridge, USA, 199-200, 1998.
23. El-Samragy A., Khorshid M.A., Foda M.I. and Shehata A.E. Effect of fermentation conditions on the production of citric acid in *Aspergillus niger*. **Int. J. Food Microbiol.**, **29**, 411, 1996.
24. Mourya N.V. and Jauhri K.S. Production of citric acid from starch-hydrolysate by *Aspergillus niger*. **Microbiol. Res.**, **155**, 37, 2000.
25. Pazouki M., Felse P.A. and Panda T. Comparative studies on citric acid production by *A. niger* and *Candida lipolytica* using molasses and glucose. **Bioprocess Engineering**, **22**, 353, 2000.