

# Optimización del proceso de producción de ácido cítrico en *Aspergillus niger*

Venus Melissa Gómez Lagunas<sup>1</sup>, Luz María Teresita Paz Maldonado<sup>2</sup>, Martha Imelda Maldonado Cervantes<sup>1</sup>,  
Minerva García Rangel<sup>1</sup>, María Guadalupe Martel Gallegos<sup>1</sup> y Enrique Maldonado Cervantes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Media, Carretera Rioverde-San Ciró km. 4, Col. Puente del Carmen, Rioverde, San Luis Potosí, [enrique.maldonado@uaslp.mx](mailto:enrique.maldonado@uaslp.mx)

<sup>2</sup> Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas, Av. Dr. Manuel Nava 6 – Zona Universitaria, 78210, San Luis Potosí, S.L.P.

## Resumen

El ácido cítrico es un producto con amplia aplicación industrial, actualmente para su producción se emplean cepas de *Aspergillus niger* con altos rendimientos, en condiciones óptimas para su producción, además existen distintas metodologías de fermentación de acuerdo con la disponibilidad de los productores. Se han realizado diversos estudios de acondicionamiento para una mayor producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger*, donde se realizan suplementaciones con distintas concentraciones de macronutrientes como P, K, N y Mg, o con metanol, gelatina y CMC, lo que nos lleva a seguir estudiando los efectos de estos en la producción de ácido cítrico. En este trabajo de investigación, se evalúa la cepa ATCC 1015 de *Aspergillus niger*, para la obtención de ácido cítrico a nivel de laboratorio, inoculando la cepa de *Aspergillus niger* en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa, suplementándolo con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fuente de amonio y con  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  como fuente de fósforo, con tres distintas concentraciones de cada una y con incubaciones de 0, 24, 48 y 72 horas para cada concentración. Se tomó el pH y cuantificó la acidez por medio de titulación ácido-base, a cada uno de los tratamientos establecidos. Los resultados mostraron una disminución en el pH y aumento de la acidez titulable con el paso del tiempo, lo que se asocia con la producción de ácido cítrico. También hubo incremento en la acidez titulable a mayor concentración en las suplementaciones, la mayor cantidad de acidez titulable se dio a 72 horas de incubación, con una suplementación de 480 ppm de fósforo y con un pH de 6.24, la cual fue de 1.619 g/l de acidez titulable. Ambas suplementaciones presentaron mayor acidez titulable conforme al paso del tiempo, lo que se considera un desarrollo en la producción de ácido cítrico.

**Palabras clave**— Ácido cítrico, Amonio, *Aspergillus niger*, Fósforo.

## Abstract

Citric acid is a product with wide industrial applications. Currently, high-yield strains of *Aspergillus niger* are used for its production under optimal conditions. Additionally, there are different fermentation methodologies based on the availability of producers. Various conditioning studies have been conducted to enhance citric acid production using *Aspergillus niger*, where supplements with different concentrations of macronutrients such as P, K, N, and Mg, or with methanol, gelatin, and CMC, have been applied. This leads us to continue studying their effects on citric acid production. In this research work, strain ATCC 1015 of *Aspergillus niger* is studied to produce citric acid at the laboratory level, inoculating the *Aspergillus niger* strain in a liquid culture medium of potato and dextrose, supplemented with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  as an ammonium source and with  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  as a phosphorus source, using three different concentrations of each and with incubations of 0, 24, 48, and 72 hours for each concentration. The pH was measured, and acidity was quantified through acid-base titration for each established treatment. The results showed a decrease in pH and an increase in titratable acidity over time, which is associated with citric acid production. There was also an increase in titratable acidity at higher concentrations in the supplements, with the highest amount of titratable acidity occurring at 72 hours of incubation, at a supplementation of 480 ppm of phosphorus and a pH of 6.24, yielding 1.619 g/L of titratable acidity. Both supplements showed greater titratable acidity over time, indicating progress in citric acid production.

**Keywords**— Citric acid, Ammonium, *Aspergillus niger*, Phosphorus.

## I. INTRODUCCIÓN

El ácido cítrico es un reconocido ácido orgánico, ya que es un metabolito intermediario del ciclo de los ácidos tricarbónicos que se encuentra básicamente en todos los organismos eucariotas y se acumula en la mayoría de los frutos cítricos. Debido a sus características acidulantes, preservación del sabor y consistencia original de algunos productos, el ácido cítrico tiene una alta demanda en todo el mundo y tiene aplicación en diversas industrias [3].

Una de las especies de hongos filamentosos más comunes es el género *Aspergillus* spp., éste fue descrito por primera vez por Micheli en 1729, que lo denominó con este nombre por su

parecido con un "aspergillum" (instrumento religioso utilizado para dispersar el agua bendita). *Aspergillus niger* es un importante agente productor de ácidos orgánicos, principalmente glucónico, cítrico y oxálico; también es utilizado para la obtención de enzimas como la glucoamilasa y del 1- $\alpha$ -galactosidasa, por lo que es ampliamente cultivado para la producción industrial de estos compuestos químicos [4].

Para la producción industrial de ácido cítrico se utilizan cepas de *Aspergillus niger*, las cuales son capaces de convertir con altos rendimientos la fuente de carbono en ácido cítrico, por lo que deben manejarse bajo determinados niveles de nutrientes y condiciones ambientales, como pH, agitación, temperatura, iones metálicos, concentración de fosfato, fuente de nitrógeno

y carbono, alcoholes y aditivos, ya que estos son factores importantes que regulan la morfología del microorganismo y el proceso fermentativo [2]. Comúnmente la producción se da por medio de cultivo líquido, se ha observado que se obtiene un alto rendimiento de ácido cítrico cuando existe una alta acumulación de este en el micelio, que puede estar asociada con una alta concentración de glucosa y de oxígeno disuelto en el medio líquido [5]. El medio de cultivo líquido más comúnmente utilizado es el de papa y dextrosa, esta última es el carbohidrato fermentable y la fuente de energía, la infusión de papa promueve un crecimiento abundante de los hongos y levaduras. El medio puede ser suplementado para inhibir el crecimiento bacteriano. El bajo pH de este medio ( $5.6 \pm 0.2$  a  $25^\circ\text{C}$ ) ayuda a inhibir el crecimiento bacteriano, permitiendo únicamente el crecimiento de hongos y levaduras [8].

La producción de ácido cítrico a nivel industrial se puede dar a partir de tres tipos de fermentaciones: por procesos de fermentación en tanques profundos, también llamada fermentación sumergida, es el método más común, se basa en el uso de dos fermentadores, el fermentador convencional con agitación y el fermentador de columna de aire, el último brinda mayores ventajas en precio, tamaño y funcionamiento. El segundo tipo es en tanques no profundos o fermentación de superficie, este método requiere menos esfuerzo en el funcionamiento e instalación y los costos de energía son inferiores, aunque es necesaria más mano de obra, además es necesaria una buena circulación de aire eficaz para controlar la temperatura y la humedad. Y la última es la fermentación en estado sólido, que consiste en el crecimiento de microorganismos sobre partículas sólidas en ausencia de agua libre en el sistema [9].

En diversos trabajos de investigación, se ha reportado que *Aspergillus niger*, tiene altos rendimientos de producción de ácido cítrico en medios ricos en sacarosa y minerales, que facilitan su propagación. Se han obtenido cantidades desde 13.5g/l de ácido cítrico en 8 días en medios de cultivo sumergidos, hasta 106.5g/l en 16 días en medios de cultivo sólidos [2]-[6]. Debido a esto y gracias a la biotecnología, que busca aprovechar al máximo los residuos de las industrias agropecuarias, se ha estudiado el rendimiento de *Aspergillus niger*, en medios integrados por harina de yuca y azúcar refinada [11] y medios con suero de leche complementados con nitrógeno, fósforo, magnesio, metanol, gelatina y CMC [2].

También se ha estudiado la influencia específica de los macronutrientes fósforo (P) y potasio (K), ya que son fundamentales en el proceso de producción de ácido cítrico. El primero se requiere para las fosforilaciones de sustrato, la producción de ATP/ADP y, la síntesis de ADN/ARN de células nuevas y/o en crecimiento. Por su parte el potasio es un cofactor de varias enzimas glucolíticas, es un activador de enzimas del ciclo de Krebs y juega un papel importante como osmorregulador ( $\text{Bomba Na}^+/\text{K}^+$ ) [1].

Otros estudios de laboratorio han demostrado que una reducción en las concentraciones de suplementación con fósforo (329mg/l) acompañada de un incremento en la concentración de potasio (271mg/l), genera un aumento en la productividad (1.2g/l por hora) y en el rendimiento (63.2%) del

proceso de producción de ácido cítrico, estas investigaciones nos llevan a pensar sobre la importancia de estudiar en detalle el efecto de diferentes concentraciones en la suplementación con estos elementos y comprender su participación en el proceso [1].

Existen diversas metodologías directas e indirectas para determinar la presencia y cuantificar ácido cítrico, pero uno de los principales factores que advierten la presencia de ácidos es el pH, por lo que es utilizado como un indicador de la presencia del ácido cítrico. Valores bajos de pH indican acidez en las soluciones y, por lo tanto, presencia de ácidos, un pH más bajo indica una acidez mayor y un ácido más fuerte. La cuantificación de este ácido puede llevarse a cabo empleando algunas técnicas analíticas, estas incluyen métodos como la espectrofotometría, la cromatografía de gases (GC), la cromatografía líquida (HPLC), la resonancia magnética nuclear y el método clásico de titulación [10].

El presente trabajo de investigación tiene por objetivo inducir la producción de ácido cítrico con la cepa ATCC 1015 de *Aspergillus niger*, inoculándola en medio de cultivo líquido de papa y dextrosa, y evaluar la mejora en la producción a través de la suplementación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fuente de nitrógeno y con  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  como fuente de fósforo. Para analizar el comportamiento de *A. niger* se establecieron tres distintas concentraciones de suplementación de nitrógeno y tres distintas concentraciones de suplementación de fósforo, se analizó cada una a través del tiempo, a 0, 24, 48 y 72 horas. La presencia y comportamiento de la producción de ácido cítrico se estudió tomando el pH y cuantificando la acidez por titulación ácido-base de cada tratamiento aplicado. Por lo que una disminución en el pH y aumento en la acidez indican la presencia y desarrollo de ácido cítrico.

## II. METODOLOGÍA

En esta investigación se utilizó la cepa ATCC 1015 de *Aspergillus niger* donada por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, se recibió una solución de esporas con una concentración de  $2.85 \times 10^8$  esporas/ml. Se inició con la propagación y la reserva de la cepa.

Para la propagación y uso de cultivos de *A. niger*, se sembraron en cajas Petri con 150 ml de medio de cultivo agar de papa y dextrosa, se esterilizo en una autoclave Tuttnauer, modelo 2340E-B/L (Tuttnauer, Israel), todos los experimentos fueron llevados a cabo bajo condiciones de esterilización en campana de flujo laminar se trabajó en una campana de flujo laminar (Lab Tech, modelo LCB-0122H, Corea del sur), se vertió en cajas Petri el medio de cultivo y se dejó solidificar. Cuando el agar se solidificó, con una micropipeta, se agregó 1ml de la solución de esporas de *Aspergillus niger* en cada caja Petri y se realizaron movimientos circulares para esparcir la solución en toda la superficie del agar. Las cajas se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  en una incubadora Lab companion, modelo IB-11E (Jeio tech, Corea), esta incubadora se estuvo utilizando durante el desarrollo del proyecto.

El resto de la solución de esporas se reservó en glicerol, para ello se esterilizaron 30ml de glicerol en la autoclave, junto con tubos eppendorf. Con una micropipeta, se prepararon los tubos

ependorf con 0.5ml de la solución de esporas y 0.5ml de glicerol, esto se realizó dentro de la campana de flujo laminar para evitar contaminación de los gliceroles. Se cerraron correctamente los tubos y se llevaron a congelar para su preservación.

Para el estudio de la reacción de la producción de ácido cítrico de la cepa de *A. niger*, se aplicaron dos tipos de suplementación a medios de cultivo líquidos de papa y dextrosa donde se inoculó el hongo, después se realizó el conteo de esporas, se tomó el pH y se calculó la acidez por titulación, para analizar la presencia y desarrollo de este. Se realizó una suplementación de amonio con sulfato de amonio  $(NH_4)_2SO_4$  y otra suplementación de fósforo con fosfato disódico  $Na_2HPO_4$ , usando distintas concentraciones de cada uno que a continuación se describen. También se establecieron periodos de tiempo de incubación. En la Tabla I se muestran los tratamientos establecidos.

TABLA I  
TRATAMIENTOS ESTABLECIDOS A LOS MEDIOS DE CULTIVO.

| Suplementación | 24h | 48h | 72h |
|----------------|-----|-----|-----|
| Amonio (ppm)   | 100 | 100 | 100 |
|                | 200 | 200 | 200 |
|                | 300 | 300 | 300 |
| Fósforo (ppm)  | 280 | 280 | 208 |
|                | 380 | 380 | 380 |
|                | 480 | 480 | 480 |

Cada uno de los 18 tratamientos se realizaron por triplicado.

A. *Tratamientos con Sulfato de Amonio,  $(NH_4)_2SO_4$ .*

Se establecieron las siguientes concentraciones de amonio: 100 ppm, 200 ppm, y 300 ppm a partir de  $(NH_4)_2SO_4$ , siguiendo la metodología de López y cols. [2] que estudia el efecto de 150 y 300ppm de amonio agregados a suero de leche entero para la producción de ácido cítrico, pero para este trabajo de investigación se decidió estudiar el efecto cada 100ppm de amonio tomando el máximo de 300ppm suplementados al suero de leche entero. Para calcular la cantidad a agregar de  $(NH_4)_2SO_4$  al medio de cultivo, se realizaron los cálculos adecuados a partir del peso molecular del compuesto (132.14g/mol) y calculando el porcentaje que representa el ion amonio (36g/mol) del compuesto, por lo que el 27.24% de  $(NH_4)_2SO_4$  es amonio, y con este valor se determina la cantidad de  $(NH_4)_2SO_4$  a agregar para obtener la concentración establecida de amonio. Por ejemplo, para obtener la concentración de 300ppm (0.3g/L), se realiza una regla de tres, donde se multiplican 0.3g/L por 100% y el resultado se divide entre el 27.24% de amonio, el resultado se da en g/L y para esta investigación se utilizaron volúmenes de 100ml, por lo que el resultado se divide entre 10 para obtener la cantidad correcta, de esta forma se realiza para las demás concentraciones. En la Tabla II se muestran las cantidades de  $(NH_4)_2SO_4$  agregadas para obtener la concentración requerida.

TABLA II  
CANTIDAD DE SULFATO DE AMONIO AGREGADO AL MEDIO DE CULTIVO.

| Concentración de amonio | $(NH_4)_2SO_4$ para 100ml |
|-------------------------|---------------------------|
| 100ppm                  | 0.0367g                   |
| 200ppm                  | 0.0730g                   |
| 300ppm                  | 0.1100g                   |

Para la aplicación de los tratamientos, por cada concentración, se prepararon 100 ml de medio de cultivo líquido de papa y dextrosa en matraces Erlenmeyer de 250 ml, y se agregó el  $(NH_4)_2SO_4$  sólido, en la cantidad calculada para cada concentración de amonio. Además, se realizó un testigo con solamente medio de cultivo, también 100ml. Se esterilizaron los medios de cultivo en una autoclave Tuttnauer, modelo 2340E-B/L (Tuttnauer, Israel), y se dejaron enfriar hasta 50°C aprox. Se trabajó asépticamente en la campana de flujo laminar, en ella se prepararon los tratamientos en tubos falcón de 50 ml, se vertieron 30 ml de los medios de cultivo preparados, para formar triplicados de cada tratamiento aplicado. Enseguida se inocularon en cada tubo, 50µl del glicerol con esporas previamente preparado, se cerraron y llevaron a incubar a 28°C, con agitación a 150 rpm. Esto se realizó por 24, 48 y 72 horas, con distintos triplicados para cada periodo de tiempo.

Después de cada uno de los periodos de tiempo, se centrifugaron los tubos a 4000 rpm por 10 min, en una centrifuga HWlab modelo C14000 (HWlab, China), esto con el fin de obtener solo el sobrenadante y separar el pellet consistente en el micelio del hongo. Se trasvasó el sobrenadante a tubos falcón limpios, para el análisis de la producción de ácido cítrico en las muestras.

B. *Tratamientos con Fosfato Disódico,  $Na_2HPO_4$ .*

Se trabajaron concentraciones de 280, 380 y 480 ppm de fósforo, siguiendo la metodología de López y cols. [2] donde utilizan estas concentraciones para suplementar un suero de leche entero para la producción de ácido cítrico. Se fermentó, de igual forma por 24, 48 y 72 h. Para la formulación de los tratamientos también se usó medio de cultivo líquido de papa y dextrosa, y se realizaron triplicados, incluyendo un control. En este caso, para agregar el fósforo al medio se realizaron soluciones saturadas de 2800, 3800 y 4800 ppm de fósforo con pH ajustado a 7 con HCl.

El cálculo para la cantidad de  $Na_2HPO_4$  a agregar para obtener las concentraciones de fósforo, fue realizado de igual forma que para el amonio. Se prepararon 10ml de las soluciones, por lo que se realizó el cálculo para esta cantidad. En este caso el ion fosfato representa el 66.9% del  $Na_2HPO_4$ , en la Tabla III se muestran las cantidades de  $Na_2HPO_4$  para formar las soluciones saturadas de fósforo.

TABLA III  
CANTIDAD DE FOSFATO DISÓDICO AGREGADO A LAS SOLUCIONES SATURADAS.

| Concentración de amonio | $Na_2HPO_4$ para 10ml |
|-------------------------|-----------------------|
| 2800ppm                 | 4.2g                  |
| 3800ppm                 | 5.7g                  |
| 4800ppm                 | 7.2g                  |

Debido a que las soluciones saturadas presentaban un pH muy alcalino, se ajustaron a pH 7 con HCl, se eligió este valor de pH debido a que la máxima actividad de las alfa amilasas está en el rango de pH: 4.5-7.8 [11]. Para el ajuste de pH, primero, a la cantidad de  $Na_2HPO_4$  calculada para cada concentración, se le agregaron 8ml de agua destilada, se le dio vórtex para homogenizar las muestras. Después, con el potenciómetro Oaklon pH 2700 (Eutech instruments, Singapur)

se ajustó el pH a 7 y finalmente se aforó a 10ml con agua destilada.

Para la preparación de los tratamientos, se agregó 1ml de las soluciones saturadas a 100 ml de medio de cultivo, para que las concentraciones en cada medio de cultivo quedaran de exactamente de 280, 380 y 480 ppm. Se colocaron en la autoclave a esterilizar y cuando salieron y se enfriaron lo suficiente, se vertieron volúmenes de 30ml de medio de cultivo a tubos falcón de 50ml, y se inocularon 50 $\mu$ l del glicerol con esporas, todo dentro de la campana de flujo laminar para evitar contaminación, también se llevaron a incubar a 28°C, con agitación a 150 rpm. Después de los periodos de incubación establecidos se realizó la centrifugación para la obtención de los sobrenadantes como se explicó en caso anterior.

### C. Muestras Tiempo 0.

Para obtener los valores del tiempo 0, se realizó la caracterización de los medios de cultivo suplementados. Para ello, se prepararon 40ml del medio de cultivo para cada una de las suplementaciones establecidas y un control, se homogenizaron completamente los medios y enseguida se tomó el pH y se cuantificó la acidez por titulación. Estos no se inocularon con *Aspergillus niger*.

### D. Conteo de Esporas Inoculadas.

Se inocularon 50  $\mu$ l de la solución de glicerol con esporas para cada 30 ml de medio de cultivo, por lo que con un tubo eppendorf de glicerol con solución de esporas se inoculaban 3 tratamientos, lo que son 9 tubos falcón con 30ml de medio de cultivo, el resto de la solución se utilizaba para cuantificar las esporas agregadas. Para conocer cuántas esporas fueron inoculadas en los medios de cultivo, se realizó el conteo de esporas por medio de conteo microscópico en una cámara de Neubauer Counting Chamber Neubauer-improved (Marienfeld, Alemania). Los conteos se realizaron por triplicado y se calculó el promedio de los resultados, después se realizaron los cálculos necesarios para obtener la cantidad de esporas inoculadas en los tubos falcón con 30ml de medio de cultivo.

### E. Toma de pH.

Para la medición de pH se utilizó un potenciómetro Oaklon pH 2700 (Eutech instruments, Singapur). Se hizo la medición directamente en los tubos falcón preparados, después de cada periodo de tiempo establecido, se introdujo el electrodo en el tubo y se esperó a que la lectura fuera estable. Se registró la medición y se calculó el promedio de los triplicados de cada tratamiento. Se tomó el pH de cada uno de los triplicados de cada tratamiento una vez, de esta forma se consideró el triplicado de cada tratamiento.

### F. Acidez Titulable.

La acidez de las muestras se cuantificó por titulación ácido-base. Por lo que se preparó una solución de 0.1N de NaOH, a partir de una solución 6N de NaOH estandarizada. Para la preparación de las muestras se tomaron alícuotas de 10 ml por cada uno de los triplicados de cada tratamiento, a estos se agregaron 500  $\mu$ l de fenolftaleína al 0.5% y se procedió a titularla. La titulación se realizó con una bureta de 50 ml, se

llenó con NaOH 0.1N, se eliminaron burbujas de aire y se comenzó la titulación colocando la muestra debajo de la bureta y abriendo un poco la llave de la bureta, cayendo gota por gota hasta el vire, que se observa de un color rosa oscuro uniforme en el medio de cultivo. Se registraron los mililitros de NaOH gastados en cada muestra y se calculó la concentración de acidez en g/l, mediante (1), donde "G" se refiere al volumen gastado de NaOH en ml y "V" al volumen de la alícuota titulada. Se tituló cada uno de los triplicados de cada tratamiento una vez, de esta forma se obtienen valores más acertados y significativos.

$$acidez \left( \frac{g}{l} \right) = \frac{0.0064 * G * 1000}{V} \quad (1)$$

## III. RESULTADOS

### A. Conteo de Esporas Inoculadas

El conteo en cámara de Neubauer se realizó por triplicado y se obtuvo la cantidad de esporas inoculadas por tubo de glicerol con esporas, donde con cada tubo se inocularon 9 tubos falcón con 30ml de medio de cultivo, es decir se utilizó un tubo de glicerol con esporas para cada periodo de tiempo en un tipo de suplementación. En la Tabla IV se muestran las esporas agregadas a cada 30ml de medio de cultivo, es decir las esporas contenidas en los 50 $\mu$ l inoculados.

TABLA IV  
CANTIDAD DE ESPORAS INOCULADAS POR CADA 30 MILILITROS DE MEDIO DE CULTIVO.

| Suplementación | 24 h                   | 48 h                   | 72 h                   |
|----------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Amonio         | 1,55 x 10 <sup>9</sup> | 1,56 x 10 <sup>9</sup> | 1,56 x 10 <sup>9</sup> |
| Fósforo        | 1,4 x 10 <sup>9</sup>  | 1,4 x 10 <sup>9</sup>  | 1,5 x 10 <sup>9</sup>  |

Se presenta la cantidad de esporas de *Aspergillus niger* inoculadas en 30ml de medio de cultivo, para los triplicados de los tratamientos por periodo de tiempo y por el tipo de suplementación. Por ejemplo, la primera cantidad de 1,552,000,000 esporas, esta es la cantidad que contiene cada uno de los triplicados con 100,200 y 300ppm de amonio para el periodo de 24 horas.

### B. pH.

Se calculó el promedio de los triplicados realizados, para obtener un valor de pH preciso. Para un mejor análisis se realizó una gráfica por tipo de suplementación: amonio y fósforo, en las que se observa el comportamiento de pH por periodo de tiempo establecido y también de acuerdo con la concentración de amonio y fósforo según corresponda. En la Fig. 1 se muestran los valores de pH obtenidos de los medios suplementados con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, como fuente de amonio, en las diferentes concentraciones agregadas y después de los tres periodos de tiempo establecidos.

El pH de solo el medio de cultivo líquido de papa y dextrosa es de 3.06 y se mantiene estable. Los resultados de las distintas concentraciones de amonio, tienen comportamientos similares lo que se puede asociar con la gráfica teórica de crecimiento celular donde, de las 0 a las 24hrs se presentó la fase exponencial, lo que dio lugar a que el hongo utilizara todo el ácido cítrico para crecer y cuando tuvo suficiente entró en la fase estacionaria, a partir de las 24hrs y comenzó a acidificar el medio de cultivo con la liberación de ácido cítrico, como reporta [11] la mayor cantidad de ácido cítrico se da a partir de las 72hrs de fermentación, con lo que se puede entender la

acidificación del medio de cultivo. Por otro lado, en la Fig. 2 se muestran los valores de pH tomados a los medios suplementados con  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , como fuente de fósforo, en las diferentes concentraciones y después de los periodos de tiempo establecidos.

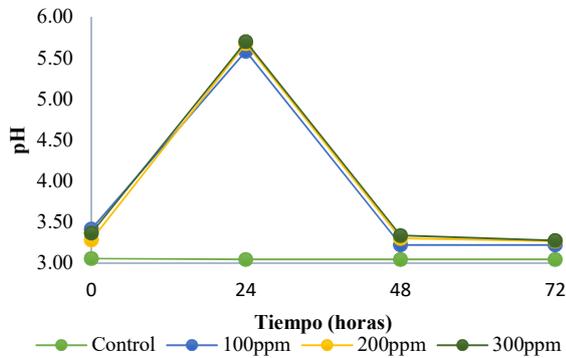


Fig. 1. Valores de pH tomados a los medios de cultivo suplementados con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , en 0, 24, 48 y 72 horas.

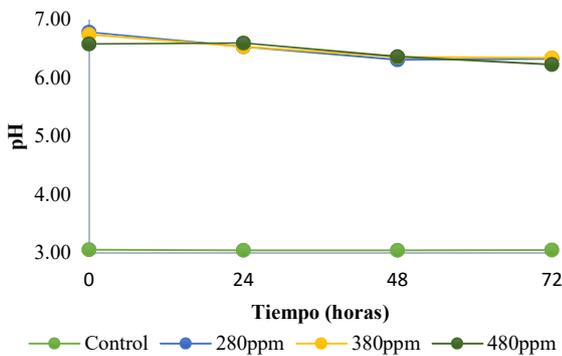


Fig. 2. Valores de pH tomados a los medios de cultivo suplementados con  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , en 0, 24, 48 y 72 horas.

Esta suplementación tiene el mismo efecto que la anterior, sin embargo, no es tan notable el cambio por el ajuste de pH realizado, pero a las 24hrs de fermentación no hay gran diferencia en los valores de pH porque el hongo está en un pH que favorece su crecimiento y como menciona [11] la máxima actividad de las alfa amilasas está en el rango de pH: 4.5-7.8, y aunque las provenientes de *Aspergillus niger* presenten actividad óptima a pH de 4.6, pudo estar en crecimiento durante ese periodo porque a las 48hrs se observa una caída de pH aunque no es muy grande. Por lo que a partir de las 48hrs se comenzó a producir el ácido cítrico y aún a las 72hrs había producción, aunque más lenta, lo que se puede considerar como la fase estacionaria.

C. Acidez Titulable.

Se titularon los triplicados y se calculó el promedio de los mililitros de NaOH gastados en la titulación hasta el vire del medio de cultivo, posteriormente se obtuvo la cantidad de acidez en g/l, con (1). De igual forma se realizó una gráfica por tipo de suplementación: amonio y fósforo, para observar el comportamiento en el desarrollo de la acidez, por cada concentración de amonio o fósforo y según el periodo de incubación dado. En cada grafica se presenta la cantidad de

acidez contenida en g/l, para cada concentración y periodo de tiempo establecidos. La Fig. 3, muestra la producción de ácido cítrico en la suplementación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , como fuente de amonio, y la Fig. 4 la suplementación con  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , como fuente de fósforo.

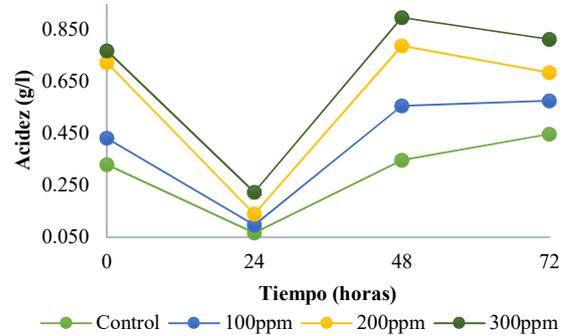


Fig. 3. Producción de ácido cítrico en g/l, en medios de cultivo suplementados con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , en 0, 24, 48 y 72 horas.

La medición de la acidez titulable muestra y comprueba el comportamiento del pH, pues a las 24hrs se ocurre una caída en la acidez y a las 48hrs aumenta, por lo que el pH sube a las 24hrs y a las 48hrs baja. De esta manera, se puede decir que el crecimiento del hongo es exponencial de las 0 a las 24hrs de fermentación, para ello el hongo necesita del ácido cítrico y por esto la acidez baja, pero a partir de las 48hrs entra en fase estacionaria y llega a su máximo punto de producción de ácido cítrico. Por otro lado, en el control y en la suplementación de 100ppm de amonio la mayor acidez se presenta a las 72hrs, por lo que se puede considerar que este tiempo no es la mayor producción de ácido cítrico; mientras que las suplementaciones con 200 y 300ppm alcanzan su máxima acidificación a las 48hrs, por lo que una mayor cantidad de amonio suplementada a los medios de cultivo acelera la acidificación y producción de ácido cítrico, y también aumenta su producción.

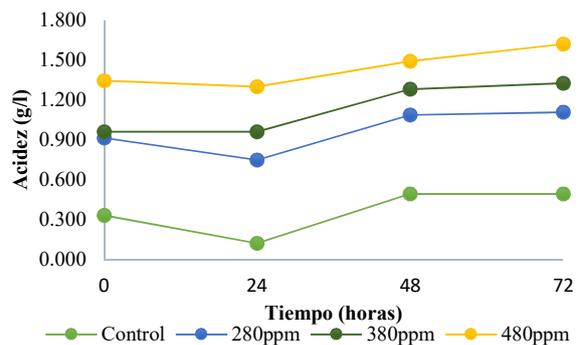


Fig. 4. Producción de ácido cítrico en g/l, en medios de cultivo suplementados con  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , en 0, 24, 48 y 72 horas.

Para esta suplementación, el comportamiento de la acidez corresponde con el del pH, donde se considera que a las 24hrs se tiene el mayor crecimiento celular del hongo y a partir de las 48hrs se comienza a producir el ácido cítrico en mayor cantidad y a las 72hrs se llega a la fase estacionaria en el control, y las suplementaciones con 280 y 380ppm de fósforo. Por otro lado, se presenta la mayor acidez (1.619 g/l) a las 72hrs con la suplementación de 480ppm de fósforo y la producción va en aumento, lo que indica que el aumento de fósforo favorece la

producción de ácido cítrico, y como reporta [2] la mayor producción de ácido cítrico (10.22 g/l) se obtiene con la suplementación de 480ppm de fósforo en la suplementación de suero de leche entero.

#### IV. CONCLUSIÓN

Los comportamientos de pH y acidez coinciden y comprueban los valores obtenidos de cada medición, pues en los tiempos en que el pH baja la acidez aumenta y viceversa. En ambas suplementaciones se observó un comportamiento similar de pH y acidez, pues en ambas hay un aumento de pH y caída de acidez a las 24hrs de fermentación, seguido de una caída de pH y aumento de acidez a las 48hrs de fermentación, lo cual podría tratarse de un crecimiento celular exponencial de las 0 a las 24hrs donde el hongo no produce ácido cítrico debido a la producción de energía a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos donde aprovecha este mecanismo para esto. Con comienzo de la acidificación del medio de cultivo a las 48hrs, se puede identificar la fase estacionaria celular del hongo, donde ya alcanzó un buen crecimiento y comienza a usar el ciclo de Krebs para producir ácido cítrico el cual es transportado fuera de la célula. Por esto, se asocia el pH bajo y el aumento de acidez con la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. Sin embargo, convendría realizar la curva de crecimiento del hongo para rectificar lo concluido, lo cual no se realizó para este estudio.

Concluido lo anterior, ambas suplementaciones favorecieron la producción de ácido cítrico, con base en el control, pero las suplementaciones con fósforo tuvieron mejores resultados. La mayor producción de ácido cítrico con la suplementación de amonio se alcanzó a las 48hrs con la concentración de 300ppm, obteniendo un pH de 3.34 y una acidez de 0.896 g/l, la cual bajo a las 72hrs de fermentación. En cuanto a la suplementación con fósforo, la mayor producción de ácido cítrico se identifica a las 72hrs con 480ppm, a pH de 6.24 y acidez de 1.619 g/l.

Se considera un aumento acelerado en la acidez con las mayores concentraciones de amonio (200 y 300 ppm), debido a que alcanzan el valor más alto a las 48 horas, mientras que para las concentraciones de 0 y 100 ppm de amonio, el punto más alto de acidez se da a las 72 horas, por lo que se sigue produciendo ácido cítrico. Para la suplementación con fósforo, se observa que, a mayor concentración, más aumenta la acidez, ya que con 280ppm la acidez aumenta lento a comparación con la concentración de 480ppm, además aún a las 72hrs de fermentación se observa en aumento la acidez, por lo que la producción de ácido cítrico continua. Con esto se concluye que el amonio si aumenta la producción de ácido cítrico, pero no tanto como el fósforo y lo hace de forma muy acelerada a mayor concentración de amonio. Y el aumento de la concentración de fósforo aumenta la producción de ácido cítrico en la cepa ATCC 1015 de *Aspergillus niger*.

#### REFERENCIAS

- [1] A. Gómez, M. Sánchez, J. Muñoz and I. Valencia, Efecto del fósforo y del potasio en la producción de ácido cítrico utilizando una cepa de *Aspergillus niger*, Acta Agron. vol.63 no.3 Palmira July/Sept. 2014.
- [2] C. López, A. Zuluaga, S. Herrera, A. Ruiz, and V. Medina, *Producción de ácido cítrico con Aspergillus niger NRRL 2270 a partir de suero de leche*, Dyna, Año 73, 150, 2006, 39-57.
- [3] F. Sánchez, C. Bosch, A. Ruiz and M. Espinoza, *Use of Experimental Design for Calibration and Validation of Ascorbic Acid and Citric Acid Mixtures*. J. Mex. Chem. Soc [online]. 2008, vol.52, n.4, pp.229-234. ISSN 1870-249X.
- [4] I. Reyes, "Difusión y Crecimiento Microbiano de *Aspergillus niger* sobre un Medio Sólido", [Tesis de maestría, Universidad Autonoma Metropolitana Unidad Iztapapala], 2006, pp. 7-8,
- [5] I. Reyes, M. González and F. López, *UN ANALISIS DEL METABOLISMO DE Aspergillus niger CRECIENDO SOBRE UN SUSTRATO SOLIDO*, Revista Mexicana de Ingeniería Química, vol. 12, núm. 1, 2013, pp. 41-56.
- [6] J. Velásquez, D. Beltrán, L. Padilla, and G. Giraldo, *Obtención de ácido cítrico por fermentación con Aspergillus niger utilizando sustrato de plátano dominico hartón (Musa aab simmonds) maduro*, Revista Tumbaga, 5, 2010, 135-147.
- [7] L. Abín, O. Coto, B. Marrero, and J. Marrero, *Estudio fisiológico de la producción de ácido cítrico por Aspergillus niger O-5*, Revista CENIC. Ciencias Biológicas. 35 (1), 2004, 15-18
- [8] MCD-LAB, Ficha técnica del caldo dextrosa y papa, Tlalnepantla de Baz, Estado de México. www.mcd.com.mx
- [9] O. Pérez, N. Ley, K. Rodríguez and E. González, *Oportunidades de producción de ácido cítrico por vía fermentativa a partir de sustratos azucarados en Cuba*, Revista Centro Azúcar, 43, 2016, pp. 85-99.
- [10] Y. Castillo, "Optimización de la concentración de ácido cítrico mediante la modulación de parámetros de fermentación con *Aspergillus niger* a partir de lactosuero", [Tesis de licenciatura, Universidad Politécnica Salesiana], 2024, pp. 15-16.
- [11] Z. Mármol, and G. Páez, *Producción de ácido cítrico por fermentación*, Rev. Téc. Ing. Univ. Zulla. 15 (3), 1992, 201-207.