

Determinación del ácido glucónico por fermentación de la glucosa con *Aspergillus Níger*

(1)ELIANA FLORES, (2)MARIALBA VILLARREAL Y (3)CELESTE FERNÁNDEZ
Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química.
Universidad de Carabobo.

Resumen

El presente trabajo tiene como objetivo principal determinar el Ácido Glucónico a través de la fermentación de la glucosa con *Aspergillus Níger*. El procedimiento seguido para producir, a escala de laboratorio el mencionado producto fue la fermentación de la glucosa de almidón como sustrato. En la siguiente exposición se describe el mantenimiento y crecimiento de la cepa *Aspergillus Níger*, los métodos de esterilización y filtración realizados, el proceso de fermentación y la determinación e identificación de dicho ácido.

El objetivo perseguido fue alcanzado con rendimientos aceptables (73%) lo que indica que la cepa del moho empleado es buena productora del Ácido Glucónico. Entre los aditivos el nutriente I proporcionó el menor tiempo de desarrollo del moho y la mayor cantidad del ácido.

Palabras clave: *Aspergillus*, Fermentación, Glucónico, Glucosa, Moho.

Abstract

The present work has as main objective to determine the Gluconic acid through the fermentation of the glucose with *Aspergillus Niger*. The followed procedure to take place, to laboratory scale the mentioned product was the fermentation of the glucose of starch as substrate. In the following exhibition it is described the maintenance and growth of the strain *Aspergillus Niger*, the sterilization methods and filtration, the process of fermentation and the determination and identification of this acid.

The objective was reached with acceptable yields (73%) what indicates that the starch used mold is good producer of the Gluconic acid. Among the preservatives the nutritious I provided the smallest time in development of the mold and the biggest quantity of the acid.

Keywords: *Aspergillus*, Fermentation, Gluconic, Glucose, Mold.

Introducción

El Ácido Glucónico es un producto de gran demanda por su diversidad de aplicaciones a nivel industrial; éste se emplea en pequeñas cantidades para preparados antianémicos de Gluconato Ferroso, pero el uso principal de este ácido es como agente de limpieza y moldeado en las industrias de metal, así como para la eliminación de depósitos de calcio en instalaciones de tratamiento y elaboración de cerveza. A pesar de esto, no se produce en el país y tiene que ser importado, siendo esta una de las razones que motivaron a realizar esta investigación.

La producción de Ácido Glucónico a nivel industrial utiliza métodos de síntesis orgánica por lo que la pureza y el rendimiento del producto se ven afectados debido a presencia de productos secundarios. Los métodos de fermentación constituyen una alternativa tecnológica y comercial viable en la producción del Ácido Glucónico, ya que en contraste con los procedimientos de síntesis orgánica se obtiene un producto con mayor pureza y rendimiento debido a la ausencia de los problemas mencionados anteriormente.

Entre los trabajos de investigación sobre la obtención del Ácido Glucónico, se conoce el de Molliard, en 1922, quien descubrió el Ácido Glucónico como un producto de la fermentación por mohos junto con los Ácidos Cítrico y Oxálico. El Ácido Glucónico se producía en mostos sacarinos como resultado de la acción del *Aspergillus Níger*. La innovación del actual trabajo se basa en el cambio del sustrato y en las condiciones del proceso de fermentación utilizado para la obtención del ácido.

Una vez que se dispone de la cepa del moho *Aspergillus Níger*, se le mantiene bajo régimen de crecimiento uniforme en la fermentación empleando para ello la técnica de repique, que consiste en colocar un inóculo de la cepa original y sembrarlo en un medio de cultivo de agar apropiado para el crecimiento y desarrollo del moho en su forma pura(1). El medio de nutriente para el crecimiento del moho se prepara en base a los requerimientos nutricionales del mismo. El sustrato para la fermentación es la glucosa, a ésta se le hace un tratamiento previo de dilución, esterilización y adición de Carbonato de Calcio para eliminar la contaminación con otros ácidos. Los métodos de fermentación utilizados son: cultivo superficial y cultivo sumergido que son los más usados en la producción industrial, la utilización de los dos métodos permite elegir el más conveniente para el desarrollo de la cepa de *Aspergillus Níger* y el rendimiento del Ácido Glucónico.

Objetivos

El objetivo general es determinar el Ácido Glucónico a partir de la fermentación de la glucosa con *Aspergillus Níger*.

Materiales y métodos

En forma general el proceso consta de cuatro etapas: obtención, crecimiento y mantenimiento de la cepa del *Aspergillus Níger*, fermentación de la glucosa a Ácido Glucónico, esterilización y filtración de licor madre, la etapa de purificación e identificación del Ácido Glucónico. El procedimiento se inicia con la obtención del *Aspergillus Níger* con el objeto de lograr la esporulación de la especie, la cual se realiza sobre dos medios de nutriente compuestos de diferentes sales. La diferencia entre los nutrientes I y II, es la presencia de Peptona en el nutriente I, la cual es utilizada como fuente de nitrógeno orgánico, y la sal de Sulfato Ferroso en el nutriente II, usada para el suministro de hierro; la concentración de ésta debe ser baja, ya que una elevada concentración ocasiona un menor crecimiento vegetativo a expensas de una baja producción de ácido(2).

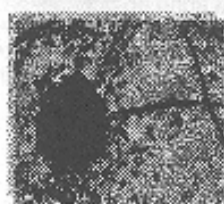


Figura 1
Esporas del *Aspergillus Níger*

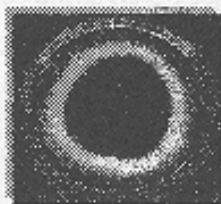


Figura 2
Micelio Uniforme de Color Negro

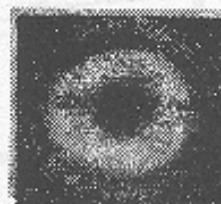


Figura 3
Ramificaciones blancas

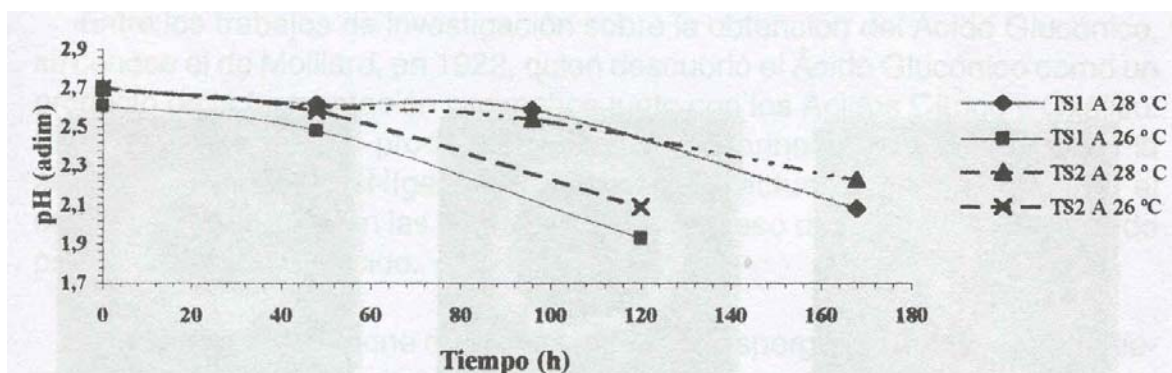
El propósito de esta etapa es garantizar el crecimiento uniforme del micelio (*Aspergillus Níger*). En la etapa de fermentación los métodos utilizados son: el cultivo sumergido y cultivo superficial; en ambos casos, la solución inoculada es sometida a una aireación superficial, con la diferencia de que en el primer método también es agitada continuamente(3). La etapa de esterilización y filtración se emplea para eliminar los microorganismos indeseables que pueden ser fuentes de contaminación y así poder separar el micelio del licor madre. En la última etapa del proceso se realiza la purificación del Ácido mediante la adición de Ácido Sulfúrico, y para su identificación se emplean los métodos de espectroscopia ultravioleta visible e infrarrojo(4).

Resultados y discusión

El nutriente I, presenta un rango de pH de 2,6–1,5 en el crecimiento del moho, lo cual garantiza que exista menor tiempo de desarrollo para obtener un micelio uniforme del moho(5). La mayoría de estos mohos obtienen mayor desarrollo

micelial a pH bajos, favoreciendo así el rendimiento; por otro lado es una buena barrera para los microorganismos infectantes, ya que con esta acidez no hay desarrollo de bacterias. El nutriente II presenta un rango de pH 7–2,5 lo cual proporciona mayor tiempo de desarrollo micelial, y no garantiza la acidez total para obtener mayores rendimientos(6).

A valores de temperatura de 28 °C y un rango de pH de 3,0–2,0, el crecimiento es escaso, para las cepas; sin embargo, dentro de un rango de pH 3,0–1,9 y un valor de temperatura de 26 °C, el crecimiento es abundante, lo cual revela un uniforme desarrollo en las dos cepas. No existe diferencia significativa de pH para ambas cepas a una temperatura de 26 °C. En la figura 4 se aprecia la disminución del pH con el tiempo.



Para la producción del Gluconato Cálcico es recomendable un rango de concentración de glucosa de 6–12%, la presencia de concentraciones mayores al 13% producen bajos rendimientos del ácido, causado por la baja solubilidad del Gluconato de Calcio (4 g/L a 30 °C); concentraciones más altas del sustrato permitirían concentraciones más altas de Gluconato de Calcio dificultando la purificación del ácido. Se realizaron un total de 20 experimentos en los cuales se variaron los siguientes parámetros: Concentración de sustrato, temperatura y concentración de Carbonato de Calcio, obteniendo los mejores resultados, expresados en un rendimiento del 73% a una concentración de 80 g/L (8%) de glucosa de almidón, una concentración de 50 g/L de Carbonato de Calcio a una temperatura de 26 °C. Cuando la concentración del azúcar es baja la agitación es conveniente, de este modo el rendimiento aumenta. Al aumentar la concentración de azúcar disminuye el efecto de la agitación. (Ver figuras 5 y 6)

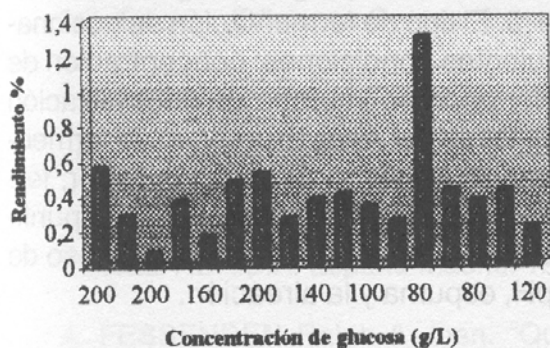


Figura 5
Rendimiento de producción del Acido a diferentes condiciones de sustrato (cultivo superficial)

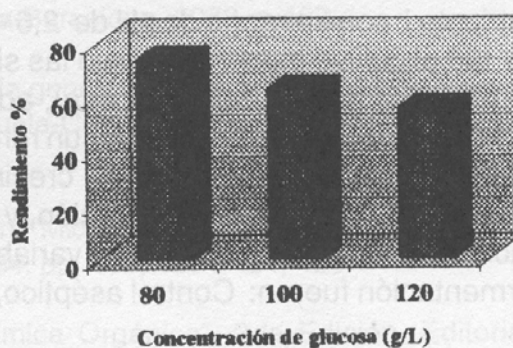


Figura 6
Rendimiento de producción del Acido a diferentes condiciones de sustrato (cultivo sumergido)

La concentración del ácido fue caracterizada bajo un patrón de Ácido Glucónico puro; el cual presenta una longitud de onda característica en 276 nm. Las muestras analizadas en el cultivo superficial fueron neutralizadas con Carbonato de Calcio, las cuales presentan una longitud de onda en 276 nm y las del cultivo sumergido fueron neutralizadas con Hidróxido de Calcio presentando una longitud de onda en 276 nm y 262 nm. (Figuras 7 y 8)

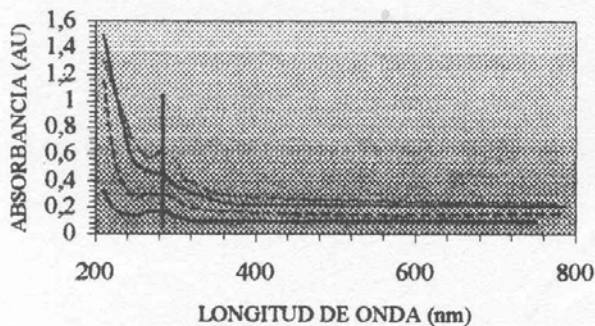


Figura 7
Determinación y neutralización del Acido Glucónico por medio de espectroscopía ultravioleta y visible (cultivo superficial)

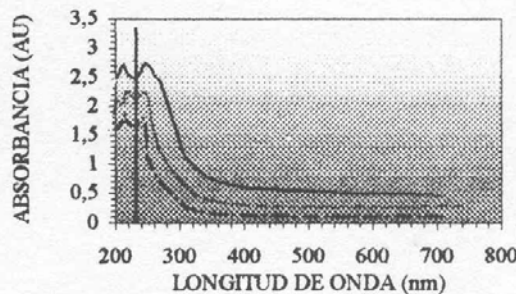


Figura 8
Determinación y neutralización del Acido Glucónico por medio de espectroscopía ultravioleta y visible (cultivo sumergido)

Conclusiones

Las condiciones para el crecimiento del moho *Aspergillus Níger* fueron: el nutriente I con un rango de pH de 2,6 – 1,5. El tipo de fermentación seleccionado fue el cultivo sumergido, bajo las siguientes condiciones: concentración de 80 g/L (8%) del sustrato (glucosa), adicionando en la etapa de neutralización Hidróxido de Calcio para obtener un rendimiento del 73%. El proceso de fermentación consta de cuatro etapas: crecimiento del moho *Aspergillus Níger*, fermentación, esterilización y filtración, y la última etapa la neutralización y purificación del Ácido Glucónico. Las variables que se controlaron en el proceso de fermentación fueron: Control aséptico, pH, espuma y la aireación.

Recomendaciones

1. Realizar el estudio de producción del Ácido Glucónico partiendo de otro sustrato (maltosa, sacarosa) y con la utilización de otro microorganismo (*Aspergillus Fumicarius*).
2. Analizar otro medio para la determinación del Ácido Glucónico.
3. Diseñar una planta industrial de producción de Ácido Glucónico por fermentación de la glucosa con *Aspergillus Níger*.
4. Evaluar la rentabilidad de la planta mediante un estudio económico.

Referencias bibliográficas

1. LEHNIGER, Albert. "Bioquímica, las bases de la estructura y función celular". 2da Edición. Ediciones Omega. España-Barcelona. 1978. p 427.
2. CASA RINCON, Guillermo. "Micología general". 2da Edición. Editorial Ediciones de la biblioteca de Caracas. Venezuela-Caracas. 1994. pp 41-44, 46-48, 55, 406.
3. PRESCOTT, Samuel. DUNN, Gordon. "Microbiología Industrial". 4th Edición. Editorial ACRIBIA. España-Madrid. 1984. pp. 413, 423 - 424, 435.
4. FESSENDEN Ralph & Joan. "Química Orgánica". 2da Edición. Editorial Iberoamérica. México.1982. pp 320, 924, 925.
Título original: Organic Chemistry.
Traducido por: Eliseo Ceoane Bardanca.
5. RIVERO, José y Rodolfo ZAMBRANO. "Diseño de una Planta para obtener Alcohol Etílico a partir de la pulpa de piña". Universidad de Carabobo. 1987.
6. BENITEZ, Luis y ZAHLOUT, Fernando. "Obtención de ácido cítrico por fermentación de la melaza con mohos". Universidad de Carabobo. Venezuela - Carabobo. 1991.