



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Efecto de la variación de los niveles de P & K
en la producción de ácido cítrico utilizando
una cepa de *Aspergillus niger***

ANA LUCÍA GÓMEZ SCHOUBEN

Universidad Nacional de
Colombia Facultad Ciencias
Biológicas Palmira, Colombia
2012

Efecto de la variación de los niveles de P & K en la producción de ácido cítrico utilizando una cepa de *Aspergillus niger*

ANA LUCÍA GÓMEZ SCHOUBEN

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Maestría en Ciencias Biológicas

Director (a):

Ph.D., Marina Sánchez de Prager

Ph.D., Jaime Eduardo Muñoz

Línea de Investigación: Biotecnología Vegetal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad Ciencias Agropecuarias

Palmira, Colombia

2012

Dedicatoria

*A la memoria de mi madre, **Godelieve Schouben de Gómez q.e.p.d**, quién nos enseñó la importancia de la dedicación, la perseverancia y el amor que debemos poner en cada una de nuestras actividades y retos emprendidos en la vida; y a tener la fortaleza, el coraje y la paciencia suficientes aún en las situaciones adversas y difíciles de la vida. Te extraño mucho*



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ACTA DE JURADO DE TESIS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
LÍNEA DE INVESTIGACIÓN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

En Palmira a los 29 días del mes de Noviembre de 2012, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores: KARINA LÓPEZ LÓPEZ y EYDER DANIEL GÓMEZ LÓPEZ

Para calificar la Tesis de Grado de:

ANA LUCÍA GÓMEZ SCHOUBEN

Titulada:

“EFECTO DE LA VARIACIÓN DE LOS NIVELES DE P & K EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO UTILIZANDO UNA CEPA DE *Aspergillus niger*”, bajo la dirección de Marina Sánchez de Prager, Ph.D y Jaime Eduardo Muñoz Flórez, PhD

Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los doctores: KARINA LÓPEZ LÓPEZ y EYDER DANIEL GÓMEZ LOPEZ, y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADO

REPROBADO


KARINA LÓPEZ LÓPEZ


EYDER DANIEL GÓMEZ LÓPEZ

Agradecimientos

A mi familia,

Juan Carlos y Juan José, por ser mi principal motivación y motor diario, los amo.

A mis hermanos Carolina y Paulo, sus compañeros, mi sobrina Catalina, mi padre Adolfo León, por enseñarme el verdadero valor del trabajo en equipo y el apoyo incondicional.

A la Universidad Nacional,

Profesores Marina Sánchez de Prager y Jaime Eduardo Muñoz por sus continuos y valiosos aportes a la presente investigación.

A Sucromiles S.A , ahora Sucroal,

Por su apoyo continuo en mi desarrollo profesional y por permitirme disfrutar cada segundo de trabajo investigativo en el área de la

.

Resumen

Se estudió el efecto de variar el nivel del P y K en el proceso de fermentación de ácido cítrico. Los ensayos se realizaron a escala de frascos agitados, usando sacarosa (250g/L) y una formulación de base (micro y macro-nutrientes), 250rpm, 34.5°C con una cepa de *Aspergillus niger* mejorada por luz UV y seleccionada por su buen desempeño. Los resultados fueron analizados utilizando el paquete estadístico Minitab 15. Se demostró la importancia de ambos nutrientes para lograr buena productividad y eficiencia. Su presencia en niveles adecuados está asociada con la formación de la biomasa necesaria y de una morfología definida como pellets compactos con hifas cortas que tienen ventajas en la reología, aireación, transferencia de oxígeno y mezcla del cultivo. Los mejores resultados se obtuvieron con 300ppm de K y 380ppm de P, superiores a los reportados por diferentes autores dado que se utilizó una cepa industrial y condiciones óptimas para la producción. Se obtuvo un modelo de regresión de superficie de respuesta para cada variable que permite predecir resultados dentro del rango de evaluación.

Palabras clave: Ácido cítrico, fermentación, *Aspergillus niger*, fósforo, potasio.:

Abstract

The effect of varying the level of P and K in the process of citric acid fermentation was studied. Trails were performed at shake flask scale, using sucrose (250g / L) and a base formulation (micro and macro-nutrients), 250rpm, 34.5 °C with an improved *Aspergillus niger* strain selected for its good performance. The results were analyzed using the statistical package Minitab 15. It showed the importance of both nutrients to achieve good productivity and efficiency, presence that was associated with adequate levels of biomass and morphology with advantages in rheology, aeration, oxygen transfer and mixing. The best results were obtained with K 300ppm and 380ppm of P, greater than those reported by various authors as an industrial strain and optimum conditions for production were used. A regression model was obtained for each variable that predicts results within the range of evaluation.

Keywords: Citric acid, fermentation, *Aspergillus niger*, potasium phosphorus.:

Contenido

	Pág.
Resumen	XI
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XVII
Introducción	1
1. GENERALIDADES DEL ÁCIDO CÍTRICO	3
Producción de ácido cítrico	4
1.1.1 El actor principal del proceso: <i>Aspergillus niger</i>	7
§ Caracterización molecular.....	11
1.1.2 Condiciones para la fermentación.....	13
§ En cuanto a los nutrientes.....	14
§ En cuanto al hongo.....	16
Bioquímica de la producción del ácido cítrico	17
1.2.1 El Fósforo y el potasio, elementos claves del proceso	20
Optimización de la producción	22
Mejoramiento de cepas.....	22
§ Mutación y selección.....	23
§ Ingeniería genética	24
Estudio de la formulación de nutrientes	25
2. METODOLOGÍA	29
Ensayo 1	30
Diseño Experimental.....	30
Análisis de la información	31
Montaje de las fermentaciones	31
§ Preparación de sustrato	31
§ Preparación de inóculo	31
§ Condiciones y medio de producción	32
§ Técnicas Analíticas	32
§ Cálculo de las variables de respuesta	33
Ensayo 2.....	34
Diseño Experimental.....	34
Modelo estadístico	35
Ensayo 3.....	36
Diseño Experimental.....	36
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
Ensayo 1	39
Análisis del rendimiento.....	40
Análisis de Productividad	42

	Análisis de <i>Aspergillus niger</i>	44
§	Biomasa fúngica	44
§	Morfología fúngica	47
	Ensayo 2	52
	Análisis de Productividad	53
	Análisis del Rendimiento	55
	Modelo de Regresión	57
	Evaluación económica	59
	Ensayo 3	61
	Análisis de la Productividad	62
	Análisis de rendimiento	65
	Modelo de Regresión	67
	Evaluación económica	69
	Comparación de resultados con otras investigaciones	71
	4. Conclusiones y recomendaciones	79
	Conclusiones	79
	Recomendaciones	81
	A. Anexo: Resultados promedio, coeficientes de variación y de correlación	
	ensayo 1	83
	B. Anexo: Resultados promedio y coeficientes de variación ensayo 2	85
	Bibliografía	87

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: .Morfología microscópica de hongos pertenecientes al género <i>Aspergillus</i> . Izquierda. Desarrollo del aparato conidial en <i>A. niger</i> A: Foot Cell B. Desarrollo del conidióforo C y D: Desarrollo de la vesícula. E1 y E2: Vesícula y sterigmata. F: Desarrollo avanzado del esterigma. G: Cabeza conidial joven mostrando esterigma secundario con cadenas de conidias. Derecha: A: Aparato conidial de <i>A. niveo glaucus</i> con una sola serie de esterigma. B: Aparato conidial de <i>A. versicolor</i> . mostrando 2 series de esterigma. Tomado de Raper KB y Fennel DI, 1965; Abarca L, 2000; Lutzoni <i>et al</i> , 2004	10
Figura 1-2: Fotografía de <i>Aspergillus niger</i> al microscopio electrónico. Fuente: http://kacatko.files.wordpress.com/2008/11/asexual-structures-of-aspergillus-niger.jpg ..	10
Figura 1-3: Fotografía al microscopio óptico. Aumento 400X, Conidióforo de <i>Aspergillus niger</i> , cepa en estudio. Imagen no publicada (Gómez, 2011)	11
Figura 1-4: Rutas metabólicas utilizadas para la producción de ácido cítrico, glicólisis y ciclo de Krebs. Tomado textualmente de Papagianni, 2007.....	19
Figura 2-1: Agitador Orbital. Cuarto con temperatura (34.5°C) y humedad relativa (60-70%) controladas	33
Figura 2-2: Relación entre ensayos 2 y 3	36
Figura 3-1: Ensayo 1. Rendimiento (%), biomasa (g/L) y productividad (g/L*h) en la fermentación de ácido Cítrico en ausencia y /o presencia de P y K individualmente y en conjunto	40
Figura 3-2: Ensayo 1. Efectos principales rendimiento de la fermentación	41
Figura 3-3: Ensayo 1. Interacción para el rendimiento de la fermentación	41
Figura 3-4: Ensayo 1. Contorno para el rendimiento de la fermentación.....	42
Figura 3-5: Ensayo1. Efectos principales para la Productividad (g/L*h) de la fermentación	43
Figura 3-6: Ensayo1. Interacción para la Productividad (g/L*h) de la fermentación.....	43
Figura 3-7: Ensayo1. Contorno para la productividad (g/Lxh) de la fermentación	44
Figura 3-8: Ensayo 1. Efectos principales para Biomasa (g/L) de la fermentación.....	45
Figura 3-9: Ensayo 1. Interacción para Biomasa (g/L) de la fermentación	46
Figura 3-10: Ensayo 1. Contorno para la Biomasa (g/L) en la fermentación	46
Figura 3-11: Ensayo 1. Pellets de <i>Aspergillus niger</i> formados en las formulaciones evaluadas en los cuatro tratamientos. Microscopía óptica, aumento 400x.....	48
Figura 3-12: Ensayo 2. Efectos principales para la productividad de la fermentación.	54
Figura 3-13: Ensayo 2. Interacción para Productividad (g/Lxh) en la fermentación.....	54

Figura 3-14:	Ensayo 2. Gráfica de Pareto para Productividad (g/Lxh) de la fermentación	55
Figura 3-15:	Ensayo 2. Efectos principales para el rendimiento de la fermentación.	56
Figura 3-16:	Ensayo 2. Interacción para Rendimiento (%) en la fermentación.....	56
Figura 3-17:	Ensayo 2. Gráfica de Pareto para el Rendimiento (%) en la fermentación.	57
Figura 3-18:	Ensayo 3.Efectos principales para la Productividad (g/L*h) de la fermentación	63
Figura 3-19:	Ensayo 3.Interacción para la Productividad (g/L*h) de la fermentación.	64
Figura 3-20:	Ensayo 3.Gráfico de Pareto para la Productividad (g/L*h) de la fermentación.	64
Figura 3-21:	Ensayo 3.Efectos principales para el Rendimiento (%) de la fermentación	66
Figura 3-22:	Ensayo 3.Interacción para el Rendimiento (%) de la fermentación	66
Figura 3-23:	Ensayo 3.Gráfico de Pareto para el Rendimiento (%) de la fermentación..	67

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Tratamientos para evaluar el efecto de ausencia y presencia de P y K sobre la morfología de la cepa en estudio y su producción de ácido cítrico	30
Tabla 2-2: Tratamientos para determinar los niveles adecuados de P y K para	34
Tabla 2-3: Matriz de combinaciones evaluadas en el Ensayo 3	37
Tabla 3-1: Ensayo 1. Análisis de Varianza para rendimiento (%), productividad (g/L*h) y biomasa (g/L)	39
Tabla 3-2: Ensayo 2. Análisis de Varianza para la productividad (g/lxh) y rendimiento (%) de ácido cítrico	52
Tabla 3-3: Ensayo 2. Coeficientes de regresión y nivel de significancia (<i>p</i>) para el modelo de superficie de respuesta	58
Tabla 3-4: Ensayo 2. Productividad (g/L x h) y Rendimiento (%) de la fermentación de ácido cítrico. Valores experimentales vs valores estimados	59
Tabla 3-5: Ensayo 2. Ahorros potenciales al incrementar el K y reducir el P	60
Tabla 3-6: Ensayo 3. Análisis de Varianza para la productividad (g/Lxh) y rendimiento (%)	61
Tabla 3-7: Resultados promedio y coeficientes de variación del Ensayo 3	63
Tabla 3-8: Ensayo 3. Coeficientes de regresión y nivel de significancia (<i>p</i>) para el modelo de superficie de respuesta	68
Tabla 3-9: Ensayo 3. Productividad (g/Lxh) y rendimiento (%) de la fermentación de ácido cítrico. Valores experimentales vs valores estimados	69
Tabla 3-10: Ahorros potenciales por mejorar el rendimiento y productividad de la fermentación con la mejor combinación del Ensayo 3 y la mejor del Ensayo 2	70
Tabla 3-11: Comparación de condiciones en la presente investigación y usadas por Lofty <i>et al</i> , 2007	72
Tabla 3-12: Comparación de resultados obtenidos en la presente investigación y por Lofty <i>et al</i> , 2007	73

Introducción

El ácido cítrico es una sustancia natural que tiene múltiples usos. En la industria alimenticia y de bebidas, permite incrementar y/o preservar el sabor, en la industria farmacéutica, puede ser utilizado para preservar sangre o fabricar pastillas, también puede ser usado como detergente y puede reemplazar los poli-fosfatos. El ácido cítrico se extrae de los vegetales desde finales del siglo XIX, en el año 1983 varios científicos demostraron que podía producirse industrialmente usando microorganismos filamentosos mediante un proceso fermentativo.

En la producción industrial de ácido cítrico, el microorganismo más utilizado es el hongo *Aspergillus niger*, el cual utiliza azúcar como sustrato, una fuente de nitrógeno, micro y macro-elementos, bajo condiciones ambientales definidas. Mediante una serie de reacciones químicas, el ácido cítrico se recupera y purifica del caldo de fermentación

Dentro de los macro-elementos, el fósforo (P) y el potasio (K) son fundamentales en el proceso de fermentación. El P, no sólo se requiere para las fosforilaciones de sustrato, para la producción de ATP/ADP, sino también en la síntesis de ADN / ARN de nuevas células ó células en crecimiento. El K por su parte es co-factor de varias enzimas glicolíticas y activador de enzimas del ciclo de Krebs, determinantes en el proceso de acumulación del ácido cítrico. El K igualmente, juega papel importante como osmoregulador (Bomba Na^+ / K^+) (Stryer, 1995; Papagianni, 2007).

Las empresas productoras de ácido cítrico necesitan tener procesos altamente competitivos con el objetivo de obtener el producto al menor costo posible, ya que la producción mundial se ha incrementado considerablemente y la oferta supera la

demanda. Esta situación genera guerra de precios, ocasionando que productores con alto costo de producción y por lo tanto, alto precio de venta, estén abocados a salir del mercado y cerrar sus plantas.

En esta búsqueda, las compañías se preocupan continuamente por una parte, de obtener materias primas e insumos de bajo costo y elevada calidad, y por otra, de optimizar los procesos. Una de las estrategias de optimización de procesos es el desarrollo de microorganismos más productivos y eficientes a través de extensivos programas de mutación y selección. Sin embargo, las cepas resultantes se implementan con los niveles tradicionales de P y K o aquellos utilizados con sus parentales. Dado que en los procesos de mutación y selección son frecuentes las duplicaciones de genes codificantes por enzimas determinantes en el proceso, el requerimiento de nutrientes y/o co-factores también puede verse incrementado.

Estudios preliminares a nivel de laboratorio¹ muestran que una reducción en el P acompañada de un incremento en el K, genera aumento en la productividad (g/L x h) y eficiencia (%) del proceso, resultados que señalan la importancia de estudiar con detalle el efecto de niveles de estos dos elementos y comprender su participación en el proceso. De allí, el motivo de esta investigación.

¹ Resultados preliminares obtenidos por la autora del proyecto, 2010.

1. GENERALIDADES DEL ÁCIDO CÍTRICO.

La producción de ácido cítrico ha crecido notablemente en el presente siglo. En 1950, alcanzaba 50.000 toneladas/año, posteriormente y con el desarrollo de la fermentación sumergida, que constituye un proceso mucho más económico que la fermentación en superficie, se registró una importante expansión, actualmente, la capacidad instalada mundial es de aproximadamente 2180000 toneladas/año (Malveda *et al*, 2009) (CCM International Market research report, 2006).

El ácido cítrico es un “commodity” , producto genérico con margen de utilidad pequeño, que se fabrica en aproximadamente 20 países. En Europa, USA y China se reúne el 88% de la producción mundial. Un aumento importante de la capacidad de producción se ha observado en los últimos años en Europa oriental y el Lejano Oriente, particularmente en China (Malveda *et al*, 2009) (CCM International Market research report, 2006).

La industria alimenticia y de bebidas procesadas estimula el mercado del ácido cítrico dada su continúa utilización como aditivo, su uso se ha hecho extensivo en la industria farmacéutica y de jabones generando expansión de la demanda mundial. El consumo crece a razón de 5-8% al año, tendencia que parece mantenerse estable (Malveda *et al*, 2009) (CCM International Market research report, 2006).

Por ser el ácido cítrico un producto “commodity” y por el incremento día tras días en la oferta de producto, en el mercado del ácido cítrico se ha generado una guerra de precios entre los productores, razón por la cual todas las empresas del mundo se preocupan por tener sus productos al menor costo posible lo que los hace competitivos.

Dentro de esta competitividad el desarrollo y mejoramiento de cepas ha adquirido importante valor por el hecho de permitir tener elevadas concentraciones de producto en el menor tiempo posible (Malveda *et al.*, 2009).

Los capítulos son las principales divisiones del documento. En estos, se desarrolla el tema del documento. Cada capítulo debe corresponder a uno de los temas o aspectos tratados en el documento y por tanto debe llevar un título que indique el contenido del capítulo.

Los títulos de los capítulos deben ser concertados entre el alumno y el director de la tesis o trabajo de investigación, teniendo en cuenta los lineamientos que cada unidad académica brinda. Así por ejemplo, en algunas facultades se especifica que cada capítulo debe corresponder a un artículo científico, de tal manera que se pueda publicar posteriormente en una revista.

1.1 Producción de ácido cítrico.

Wehmer, en 1907 fue el primero en observar la presencia de ácido cítrico como un subproducto en la producción de oxalato de calcio utilizando cultivos de *Penicillium glaucum*. En 1913 Zahorsky, obtuvo la patente de producción de ácido cítrico vía fermentación con *Aspergillus niger*. Tom y Currie en 1916, establecieron que algunas especies del género *Penicillium* podían producir ácido cítrico, sin embargo, el medio de fermentación se contaminaba fácilmente debido al pH neutro que requería el proceso, y en 1917 Currie desarrolló la vía industrial basado en la observación de que *A. niger* crece bien en un pH entre 2.5 - 3.5, lo que permitía eliminar los problemas de contaminación. Observó además que a mayor concentración de azúcar mejor era la producción y que los mayores rendimientos se obtenían restringiendo el desarrollo del micelio (Rhem y Reed, 1983).

El género fungoso más importante en la producción industrial de ácido cítrico es el *Aspergillus* con las siguientes especies *niger*, *awamori*, *clavatus*, *fenicis*, *fumaricus*, *wentii* (Waksman, 1946; Betancourt, 2003 y Kamzolova *et al.*, 2011).

La primera planta productora de ácido cítrico industrial se construyó en Bélgica en 1919, y después en Nueva York por la compañía Pfizer en 1923. En 1928 se construyó una planta en Checoslovaquia que usaba las melazas de remolacha, sustrato muy económico. Sin embargo, se presentaban serias dificultades debido a las impurezas presentes en este material, lo cual se resolvió con el uso de hexacianoferrato, producto tóxico, que precipitaba los materiales indeseables (Rhem y Reed, 1983).

En 1933 ya se producían en el mundo cerca de 10400 toneladas de ácido cítrico, de las cuales 1800 toneladas las procesaba Italia a partir de limones, el resto, se obtenían vía fermentación (Rhem y Reed, 1983).

Se han realizado muchos esfuerzos para elucidar los fundamentos bioquímicos y microbiológicos del proceso, así como para encontrar vías para optimizarlo. El hallazgo más relevante fue el hecho que el ácido cítrico se obtiene como resultado del metabolismo primario de *A. niger*, donde la reacción clave es la condensación del acetyl – CoA y el oxalacetato ambos formados a partir del piruvato obtenido de la glicólisis, al inicio del ciclo de Krebs (Rhem y Reed, 1983).

Originalmente la fermentación de ácido cítrico se llevaba a cabo en cultivo en superficie llamada también fermentación en estado sólido. La introducción de un proceso de fermentación sumergida con respecto a los procesos tradicionales de fermentación en superficie representó grandes mejorías (Bleyer, 1924). Sin embargo, la aplicación industrial del proceso sumergido no se inició hasta los años 50.

En 1944, Szucs, demostró que la fermentación sumergida era posible en un medio conteniendo una fuente de fósforo no asimilable, hecho que le permitió diseñar un proceso en dos etapas, una primera conteniendo fósforo para asegurar un correcto desarrollo del micelio; y una segunda, en ausencia del fósforo para producir el ácido cítrico.

Shu y Jonson en 1947, mejoraron el método, logrando los dos objetivos en una sola etapa, determinando que el balance de Zn, Mn, y fosfato son los elementos más críticos en la fermentación sumergida.

Para poder hacer viable el proceso sumergido, era necesario encontrar sustratos económicos como melazas de caña o remolacha, almidón o jarabes de glucosa. Múltiples autores realizaron investigaciones en este sentido (Shu, 1948a; Schweiger y Snell, 1951; Moyer, 1953).

En los años 60, nuevos estudios se realizaron demostrando la posibilidad de utilizar n - alcanos como fuente de carbono para el proceso a partir de levaduras, proceso que dejó de ser viable rápidamente. Entre las levaduras productoras de ácido cítrico se encuentran *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*. Una de las desventajas de este proceso es la elevada producción de ácido isocítrico que difícilmente se separa del ácido cítrico (Papagianni, 2007).

Actualmente se puede decir que muchas compañías multinacionales, han adquirido el “*Know How*” de la operación de cultivos sumergidos con ventajas muy específicas. La experiencia adquirida en el sector industrial se mantiene como un secreto. En general, el éxito del proceso fermentativo depende no solo de tener una cepa adecuada sino también del control riguroso de las condiciones óptimas requeridas.

El ácido cítrico, en condiciones naturales no puede ser producido como metabolito primario en altas cantidades. Por lo tanto cualquier excreción elevada se interpreta como el resultado de una irregularidad metabólica causada genéticamente o de un desbalance metabólico severo, que puede obedecer también a condiciones ambientales.

A pesar de una larga y exitosa historia de producción de ácido cítrico no existe una única explicación para las bases bioquímicas que expliquen en forma consistente el comportamiento de la fermentación. Adicionalmente, los estudios científicos, utilizan cepas de baja o moderada sobreproducción o condiciones no óptimas de la fermentación para la acumulación de cítrico. Esto hace muy difícil la comparación de datos y ha afectado adversamente los prospectos para crear una imagen real del estado actual de la fermentación comercial del ácido cítrico (Papagianni, 2007).

1.1.1 El actor principal del proceso: *Aspergillus niger*

Muchos organismos pueden producir ácido cítrico, sin embargo, *A. niger*, es el principal microorganismo utilizado en la producción industrial (Soccol *et al.*, 2006; Papagianni, 2007; Rywinska *et al.*, 2009). Dentro del género *Aspergillus* se agrupan hongos filamentosos que han sido reclasificados y actualmente pertenecen al grupo de los Ascomicetos (Lutzoni *et al.*, 2004). Su reproducción es asexual exclusivamente por conidios o pueden presentar fragmentación del micelio, forman conidios expuestas sobre la superficie del micelio, normalmente agrupados sobre una cabezuela (http://www.doctorfungus.org/thefunghi/Aspergillus_spp.htm, 2004).

Para poder realizar una descripción de las colonias de *A. niger*, múltiples autores coinciden en que la composición del sustrato, la temperatura de incubación, las condiciones de iluminación, y la edad del cultivo deben ser especificadas. En medio CYA, Czapeck Yeast Extract, las colonias del género *Aspergillus* tienen textura que va desde suave hasta polvorosa. El color de la superficie de la colonia depende de la especie; en *A. niger*, es de color negro y el reverso entre blanco y amarillo (Raper KB y Fennel DI, 1965).

Las características macroscópicas que normalmente se especifican al hacer un proceso de identificación son las siguientes:

- El color de las partes aéreas incluyendo el micelio vegetativo, cabezas conidiales.
- La pigmentación del medio basal así como del sustrato permiten realizar confirmaciones.
- La tasa del crecimiento colonial y el diámetro alcanzado en un tiempo particular y en un medio específico es característico de una especie.
- El borde de la colonia puede ser grueso y afilado, delgado y difuso, liso y entero o irregular, sumergido o aéreo (Raper KB y Fennel DI, 1965).

La identificación microscópica del género *Aspergillus* está basada en características similares existentes en todas las especies y en características específicas presentes en ciertas especies. Entre las comunes a todas las especies se encuentran:

Las especies del género *Aspergillus* están conformadas por hifas hialinas septadas. *Aspergillus niger* en particular presenta conidióforos largos, lisos, incoloros o de color café, con fialides bi-seriadas y conidios redondos. La cabeza conidial, su color, forma, tamaño y organización de las partes de la cabeza conidial es característico de cada especie. Las cabezas de *A. niger* son más largas, radiadas y negras, amarillosas – cafesosas (Figura 1-1. Izq G).

El "foot Cell", la primera indicación del desarrollo de la estructura conidial en *A. niger* es el alargamiento de ciertas células en el micelio y subsecuente desarrollo de una pared muy gruesa. Cada una de estas células produce un conidióforo como una ramificación perpendicular al largo eje de la célula. El "foot cell" normalmente se vuelve curvado y torcido con la edad y su conexión con las hifas vegetativas puede volverse difícil de determinar. Puede estar sumergido en el sustrato ó levantarse de la hifa aérea. La

presencia de “*foot cell*”, es fuerte evidencia que el aislamiento obtenido corresponde a una especie del género *Aspergillus* (Figura 1-1. Izq A).

La ramificación erecta perpendicular que parte desde el “*foot Cell*” y finalmente produce en su extremo final la cabeza conidial se conoce como conidióforo o tallo. En la mayoría de las especies de *Aspergillus*, los conidióforos son individuales y cada uno porta una única cabeza conidial. El conidióforo puede ser septado o no; pueden ser luminosos o tener colores llamativos desde verdes, pasando por amarillos y marrón o la pigmentación puede estar confinada a la pared o alguna porción de ella. La pigmentación, es una característica inherente de cada especie y puede reflejar la capacidad de absorción de algún pigmento de una fuente externa. En *Aspergillus niger*, la pigmentación del conidióforo es progresiva desde la vesícula hacia la base y resulta de la absorción de un pigmento soluble llamado aspergillina (Figura 1-1. Izq B).

El conidióforo se alarga para formar una estructura elíptica, globosa y hemisférica llamada vesícula, la cual provee gran superficie para la adherencia de las esporas. En pasos posteriores la perforación de la vesícula se produce por la formación del esterigma. Las vesículas pueden ser hialinas o pigmentadas (Figura 1-1. Izq C, D, E1 y E2). Existen dos capas de células derivadas de la vesícula, la primera llamada profiálides (uni-seriadas) y la segunda fiálides (Figura 1-1. Izq F y G). Los conidios de la mayoría de especies de *Aspergillus* son uninucleadas (Raper KB y Fennel DI, 1965).

Figura 1-1: .Morfología microscópica de hongos pertenecientes al género *Aspergillus*. Izquierda. Desarrollo del aparato conidial en *A. niger* A: Foot Cell B. Desarrollo del conidióforo C y D: Desarrollo de la vesícula. E1 y E2: Vesícula y sterigmata. F: Desarrollo avanzado del esterigma. G: Cabeza conidial joven mostrando esterigma secundario con cadenas de conidias. Derecha: A: Aparato conidial de *A. niveo glaucus* con una sola serie de esterigma. B: Aparato conidial de *A. versicolor*. mostrando 2 series de esterigma. Tomado de Raper KB y Fennel DI, 1965; Abarca L, 2000; Lutzoni *et al*, 2004.

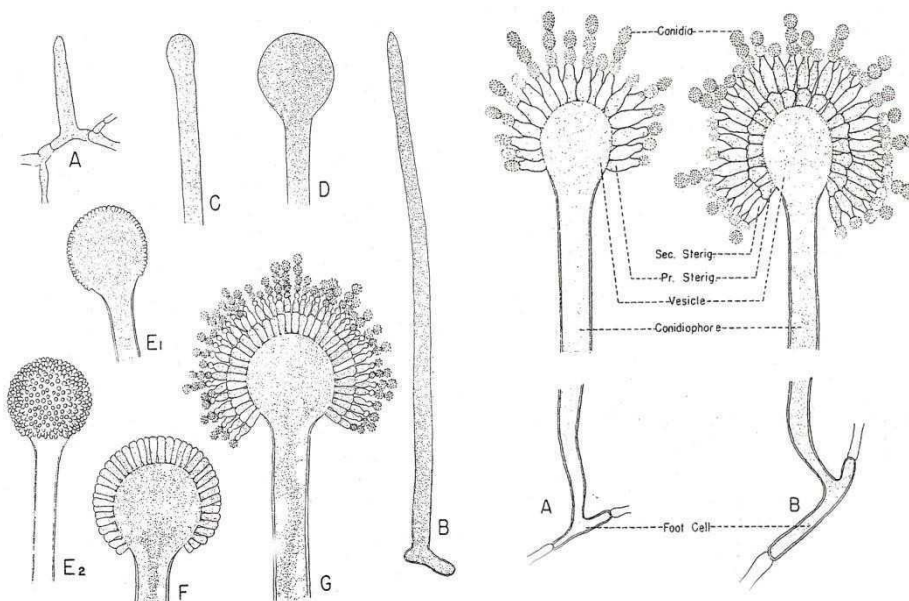


Figura 1-2: Fotografía de *Aspergillus niger* al microscopio electrónico. Fuente: <http://kacatko.files.wordpress.com/2008/11/asexual-structures-of-aspergillus-niger.jpg>

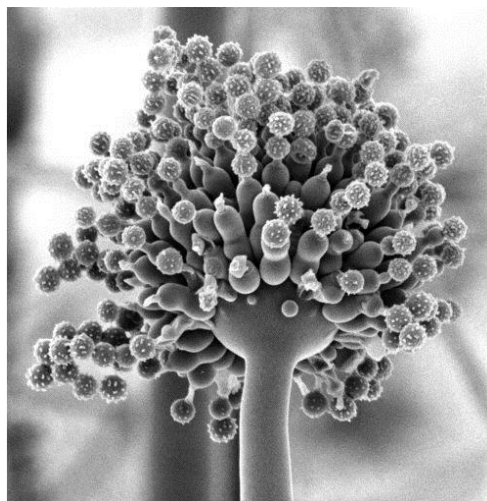
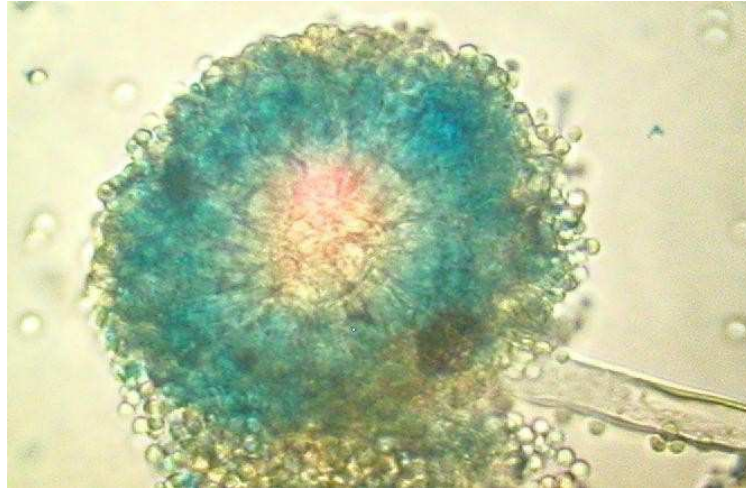


Figura 1-3: Fotografía al microscopio óptico. Aumento 400X, Conidióforo de *Aspergillus niger*, cepa en estudio. Imagen no publicada (Gómez, 2011).



§ Caracterización molecular.

La micología, estudio de los hongos, tradicionalmente ha sido una subdisciplina de la botánica, pero análisis filogenéticos para ADN ribosomal y genes que codifican para proteínas, han demostrado que los hongos están más cerca de los animales que de la plantas (Lutzoni *et al*, 2004).

El hongo *Aspergillus niger* es ampliamente explotado por fermentación industrial para la producción de enzimas y ácido cítrico. El genoma de la cepa CBS 513.88, ancestro de una cepa productora de enzimas, fue secuenciado por la empresa DSM y sus resultados publicados en 2007. Su genoma está compuesto por un total de 33.9 megabases (Pel, J. H *et al*, 2007).

A partir de la caracterización molecular se realizó el árbol filogenético encontrando que *A. niger* está ampliamente relacionado con *A. terreus* y *A. oryzae* y separado de *A. fumigatus* y *A. clavatus* quienes tienen genomas más pequeños (29-30Mb) (Pel, J. H et al, 2007).

Segmentos grandes del genoma de *A. niger* muestran alta conservación en el orden de los genes con respecto a otras especies del género, sin embargo, dentro de esas regiones, se observan numerosos re-arreglos intra- cromosómicos y micro-inversiones. La extremada flexibilidad en su metabolismo y la alta versatilidad nutricional, fue confirmada por la presencia de varias clases de transportadores, 461 genes se encontraron relacionados con el transporte de un elevado número de sustratos algunos de los cuales, trabajan como sensores de nutrientes (Pel, J. H et al, 2007).

A partir de la construcción de las rutas metabólicas los autores investigaron por qué *A. niger* es un eficiente productor de ácidos orgánicos. Lo que se explica por el hallazgo de numerosas enzimas involucradas en la formación del principal precursor del citrato el oxaloacetato. En total se encontraron 2 *piruvato carboxilasas* (una citoplasmática y una mitocondrial), 4 *malatos deshidrogenasas* (3 citoplasmáticas y una mitocondrial), además se encontró un transportador mitocondrial de oxaloacetato, 4 *citrato sintasas* (una citosólica y tres mitocondriales). También se encontró redundancia de la enzima *aconitasa*. Adicionalmente se encontraron tres transportadores de ácido cítrico en la membrana citosólica (Pel, J. H et al, 2007).

Flipphi et al., 2009, estudiaron la genómica y bases evolutivas de la versatilidad de las especies del género *Aspergillus*. Anotaron 155 genes por genoma que incluyen genes de la glicólisis, pentosas fosfatos, y ciclo de Krebs entre otros, detectando que las cepas de este género tienen refuerzos en muchas áreas de su metabolismo primario generados por duplicación transferencia horizontal de genes.

Andersen *et al*, 2011 realizaron un estudio genómico comparativo de una cepa de *A. niger* productora de ácido cítrico ATCC1015 y de una cepa productora de enzimas CBS que deriva de la cepa NRRL 3122 con el objeto de elucidar las diferencias genéticas responsables de las diferencias en el fenotipo. Cabe notar, que la cepa ATCC1015 muestra una producción de ácido cítrico modesta con respecto a los rendimientos industrialmente obtenidos (Andersen *et al*, 2011).

El estudio reveló un total de 396 y 510 genes únicos en las cepas CBA 513.88 y ATCC1015 respectivamente. Examinando los genes que solo están presentes en la cepa ATCC1015, se encontraron cuatro poliquetidos sintasas sugiriendo que esta cepa produce metabolitos secundarios únicos. Adicionalmente, se encontró mayor expresión de la vía oxidativa en esta cepa, mientras que en la cepa CBS 523.88 la glicólisis y el ciclo de ácidos tricarboxílicos se encuentra sobre regulada (Andersen *et al*, 2011).

En general en el estudio, se observó alta similitud a nivel de cromosomas y en el orden de los genes entre las dos cepas, adicionalmente se observaron muchas inserciones y deleciones por encima de 200Kb (Andersen *et al*, 2011).

Condiciones para la fermentación

El mecanismo bioquímico a través del cual *A. niger* acumula ácido cítrico ha atraído mucho interés. Desde los años 30s, varias explicaciones se han propuesto. El ácido cítrico solo se acumula cuando varios nutrientes se encuentran a alta concentración (azúcar, acidez y oxígeno disuelto) y otros, se encuentran en condiciones sub-óptimas (elementos traza, nitrógeno y fosfato); observación que realizaron Shu y Johnson (1948). Papagianni, 2007, en acuerdo con reportes anteriores, comenta que son muchos los eventos bioquímicos que contribuyen en conjunto a esta sobre-producción y que dada su naturaleza bioquímica, es imposible valorar la influencia de factores individuales sin tener en cuenta la influencia de los otros.

§ En cuanto a los nutrientes.

Fuente de Carbono. De acuerdo a Kubicek y Rohr (1989) la sacarosa es el sustrato preferencial dado la existencia de una invertasa extracelular activa a bajos pH, la cual rápidamente hidroliza la sacarosa. La preferencia de la sacarosa sobre la glucosa y fructosa también fue registrada por Xu *et al.*, 1989. Entre otros sustratos utilizados están las melazas y en algunos casos la fructosa y/o glucosa (Bizukojc M., Ledakowicz S. 2004). Además de la fuente de carbono, la concentración de este nutriente es crítica para la producción de ácido cítrico. Una alta concentración de azúcar incrementa la actividad de algunas enzimas glicolíticas y sobretodo, de la importante enzima *piruvato carboxilasa* que promueve la síntesis de oxalacetato necesario para el ciclo de Krebs. Honeker *et al.*, 1989, mencionan que la concentración óptima de sacarosa se encuentra entre 14 y 22%.

pH del caldo: El pH es importante primero, porque las esporas requieren un pH relativamente alto para germinar (3-5); y segundo, porque mantener un pH bajo favorece el proceso de la fermentación. El pH óptimo para la fermentación se encuentra entre 1.7 y 2.0, valor que favorece la producción de ácido cítrico y que permite controlar poblaciones contaminantes y la producción de otros metabolitos como el ácido oxálico y glucónico que tienden a acumularse a pH superiores (Sassi *et al.*, 1991). De acuerdo con Papagianni, 1995, incrementar el pH a 4.5 durante la fase de producción podría reducir el rendimiento de la fermentación en 80% y afectar negativamente la morfología del microorganismo.

Aireación. El proceso de obtención de ácido cítrico es estrictamente aerobio, el oxígeno suministrado mantiene activa la vía metabólica. La producción se suspende por la ausencia de oxígeno por unos pocos minutos y en algunos casos no se reestablece completamente después de recuperar la aireación (Rhem y Reed, 1983; Yigitoglu, 1992).

Limitación de Nitrógeno y Fosfatos. El nitrógeno, es importante para la formación de la biomasa y para el control del pH. Fisiológicamente los compuestos de amonio son los preferidos, debido a que durante su consumo, el pH del medio disminuye, pre-requisito para la producción de ácido cítrico (Mattey, 1992). Sephard, 1963, obtuvo buenos resultados cuando se adicionó amonio a la fermentación en el momento en decrecimiento de la tasa de producción, explicable probablemente por el efecto regulador del amonio en la acumulación del ácido cítrico.

Los registros concernientes al efecto limitante de nitrógeno y fosfato son contradictorios. De acuerdo con Shu & Johnson (1948) los fosfatos son limitantes para la producción de ácido cítrico. Sin embargo, cuando los metales trazas o menores no son limitantes, incrementar la concentración de fosfatos puede resultar en reacciones colaterales e incremento de la biomasa, con detrimento de la producción de ácido cítrico (Papagianni *et al*, 1999 a,b,c).

Elementos trazas o menores. Tomlinson 1950, encontró que el Fe, Cu, Mn y Zn, en concentraciones muy bajas y controladas, son esenciales para una óptima acumulación de ácido cítrico, hecho reportado anteriormente por Mattey (1992). Shu y Johnson, 1948, demostraron que la producción de ácido cítrico se ve drásticamente afectada por altas concentraciones de Mn. Scheiweiger, 1961, registró que el efecto negativo del hierro se puede controlar con altas concentraciones de cobre, este último también controla el exceso de Mn (Rhem y Reed, 1983).

La deficiencia de Mn ocasiona reducción de la actividad de algunas enzimas de la vía anabólica de las pentosas fosfato y concentra la actividad en el ciclo de ácidos tricarbónicos, hecho favorable al proceso industrial. Adicionalmente resulta en daños en el anabolismo, entre los cuales se destaca la generación de un pool de iones amonio como resultado de la degradación proteica, esta alta concentración de amonio

intracelular es un potente regulador de la *fosfofructokinasa*, ya que la libera de la inhibición por citrato (Rhem y Reed, 1983).

El cobre, se utiliza para controlar la morfología. Si se utiliza en exceso, inhibe completamente el crecimiento y genera una estructura peletizada muy densa, la cual es improductiva. Tsekova *et al.*, 2000, demostraron que el cobre no sólo inhibe el crecimiento sino también la producción de ácido cítrico, por inhibición de enzimas como la *aconitasa* e *isocitrato deshidrogenasa*. Observaron que el contenido de ADN y proteínas decrecía mientras que los lípidos y polisacáridos aumentaban por efecto de este elemento. Neitik *et al.*, 1997, también demostraron que altos niveles de cobre pueden inhibir el transporte de citrato.

El hierro y el manganeso, en exceso, por su parte tienen efectos completamente contrarios al presentado por el cobre. Siendo activadores del crecimiento, ocasionan elongación de hifas y finalmente un caldo espeso donde la transferencia de oxígeno es ineficiente y ocasiona baja acumulación de ácido cítrico. Neitik *et al.*, 1997, demostraron que la excreción del citrato al exterior de la célula sólo puede demostrarse previo cultivo de *A niger* en condiciones deficientes de Mn, esta deficiencia como requerimiento para la acumulación de ácido cítrico está ampliamente documentada (Rhem y Reed, 1983).

§ En cuanto al hongo.

Cambios en Morfología. Aunque se ha establecido que existe una estrecha relación entre la morfología del hongo y la productividad en ácido cítrico (Papagianni *et al.*, 1994, 1998, 1999a,c); no existe un acuerdo acerca de si la morfología más adecuada es la filamentosa o la peletizada, morfologías ambas que dependen de condiciones de cultivo y genotipo de la cepa.

Varios autores han demostrado la superioridad de la estructura pelletizada (Takahashi *et al.*, 1958 y Schweiger y Snell, 1951). Estos últimos, demostraron la necesidad de formación de agregados compactos o pellets (< 5mm de diámetro). En contraste, Moyer (1953), concluyó que la formación de pellets es indeseable para el proceso.

Las principales condiciones de cultivo que afectan la morfología son la agitación, el pH, la tasa de crecimiento, factores nutricionales y la concentración de inóculo. La agitación intensa se relaciona con el desarrollo de filamentos altamente ramificados, delgados, cortos, y muy productivos, aunque puede generar fragmentación. El pH bajo, además de mantener activas enzimas determinantes para el proceso, mantiene una morfología adecuada. Desde el punto de vista nutricional, sólo se ha demostrado la influencia del Mn en la morfología, Kissler *et al.*, 1980. La omisión de Mn, induce la presencia de esporas hinchadas e hifas bulbosas. La presencia por su parte, conduce a la pérdida de polaridad de las hifas, incrementa la ramificación y la síntesis de quitina, observaciones corroboradas por Papagianni en 1995.

Bioquímica de la producción del ácido cítrico

Las rutas metabólicas utilizadas por *Aspergillus niger* para la producción de ácido cítrico a partir de sacarosa son la Glicólisis o vía Embden Meyerhof Parnas y el Ciclo de Ácidos Tricarboxílicos ó Ciclo de Krebs.

La sacarosa, es inicialmente hidrolizada por un *invertasa* extracelular activa a bajo pH generando una molécula de glucosa y una de fructosa las cuales son asimiladas por el microorganismo (Boddy *et al.*, 1993) (Rubio y Maldonado, 1995).

La glicólisis, vía degradativa que se lleva a cabo en el citosol celular, consiste en la degradación de la glucosa o glucosa 1-fosfato en ácido pirúvico. Transformación que se

da en dos etapas: en la primera, la molécula de glucosa de seis carbonos, se transforma en dos moléculas de tres carbonos; en la segunda, las moléculas de tres carbonos se transforman en ácido pirúvico, ATP y NADH. El balance energético neto de la glicólisis es la producción de 2ATP por cada mol de glucosa (4ATP producidos y 2 ATP consumidos) (Stryer L, 1995; Alvares-Vasquez *et al.*, 2000 y Peksell *et al.*, 2002).

En presencia de oxígeno, el ácido pirúvico proveniente de la glicólisis se oxida totalmente en la matriz mitocondrial hasta liberar CO₂ a través del ciclo de Krebs. Como oxidantes actúan coenzimas que a su vez son reducidas. El hidrógeno unido a las coenzimas, es transferido en la segunda fase al oxígeno molecular, con formación de agua. El ciclo es la vía final para la oxidación de moléculas combustibles como los azúcares y suministra intermediarios diferentes para la biosíntesis (Crueguer, 1989). El balance energético neto del ciclo de Krebs y la glicólisis es la formación de 38ATP (2ATP producidos en glicólisis y 36 ATP producidos en ciclo de Krebs) (Stryer L, 1995) (Figura 1-4).

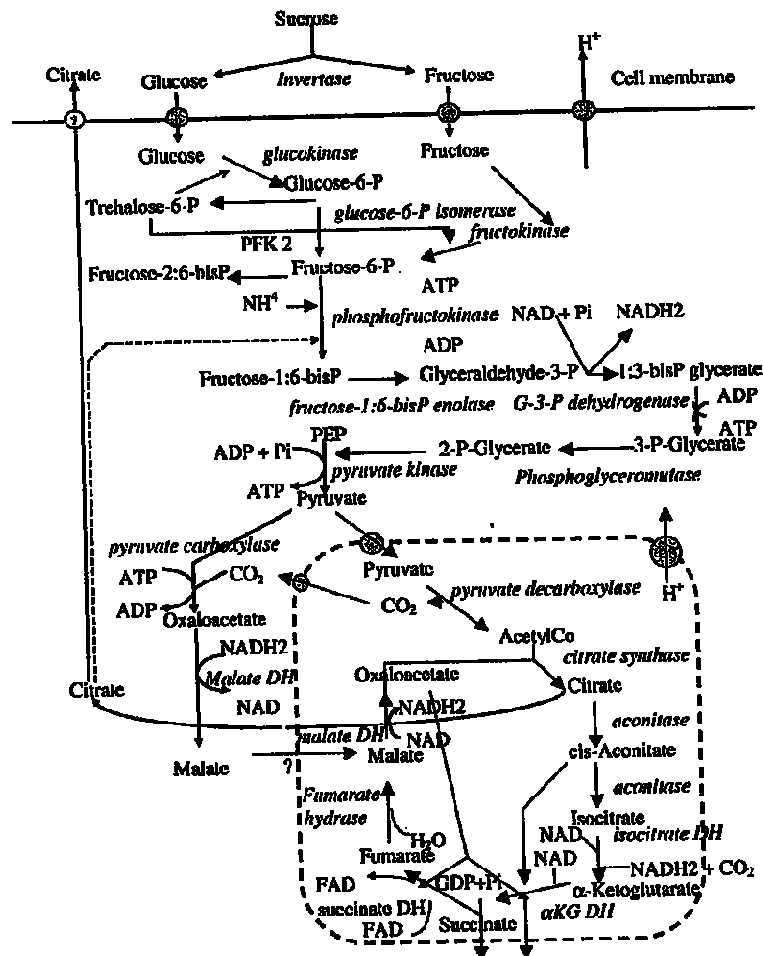
Como se puede observar, la producción de ácido cítrico ocurre en las primeras etapas del ciclo de Krebs. Aunque numerosos trabajos han registrado como etapa determinante para su acumulación, la inhibición de las enzimas que permiten su degradación (*aconitasa* o *isocitrato deshidrogenada*) (Kubicek y Rohr, 1989; Rohr, 1996), existen sólidas evidencias de la realización del ciclo total durante el proceso de fermentación. Ahmed *et al.*, 1972 demostraron la presencia de un set de enzimas completo requeridas para el ciclo; adicionalmente, Jernejc *et al.*, 1992, demostraron un incremento en el nivel de proteína celular; ambas observaciones sugieren que el ciclo se encuentra activo durante el proceso de producción de ácido cítrico.

Una hipótesis para la acumulación de ácido cítrico, está asociada con la actividad de un transportador, con alta afinidad por citrato, que compite con la enzima *aconitasa*. El transportador, bombea el citrato por fuera de la mitocondria sin la necesidad de inhibir ninguna enzima del ciclo de Krebs, en los mamíferos se sabe que este transportador está igualmente asociado al transporte de malato (Kubicek, 1988 y Karaffa *et al.*, 2003).

Torres *et al.*, 1994a demostraron que existen tres etapas de control determinantes en la producción de ácido cítrico, todas ellas blancos importantes para el mejoramiento de cepas (Karaffa *et al.*, 2003).

- **Toma y fosforilación de las hexosas:** Existen 2 transportadores de glucosa, sin embargo, su papel no está claro. Uno de los transportadores, de baja afinidad, se encuentra activo en condiciones de alta concentración de azúcar como las utilizadas para la producción de cítrico. La toma de la glucosa no se inhibe ni siquiera en condiciones de alta concentración de cítrico en el medio, pero las permeasas sí (Torres *et al.*, 1996 a). Al parecer, en esta condición la entrada de la glucosa se da por difusión pasiva.

Figura 1-4: Rutas metabólicas utilizadas para la producción de ácido cítrico, glicólisis y ciclo de Krebs. Tomado textualmente de Papagianni, 2007.



- **Excreción de ácido cítrico de la mitocondria al citosol:** Como se mencionó anteriormente, la excreción del cítrico de la mitocondria ocurre gracias a la existencia de un transportador de tricarboxilato, la excreción está adicionalmente acoplada a la entrada de malato, hecho que se ha soportado en la observación de un incremento en la concentración de malato previo a la acumulación de ácido cítrico (Evans *et al.*, 1983).

- **Excreción del ácido cítrico del citosol al exterior:** Ocurre en condiciones de una alta concentración de citrato dentro de las células, por lo que requiere ATP. El proceso requiere adicionalmente de una permeasa, que se incrementa, según estudios realizados en cultivos del hongo bajo condiciones de deficiencia de manganeso (Netik *et al.*, 1997; Madigan *et al.*, 2000).

El Fósforo y el potasio, elementos claves del proceso.

Una visión cronológica sobre el conocimiento de este proceso productivo, permite conocer que Perquin (1938) realizó un estudio de la producción de ácido cítrico en frascos agitados utilizando *A. niger* y desarrolló el concepto del sobre-flujo del ácido cítrico como resultado de la deficiencia de fosfatos. Existe una patente basada en esta observación (Szucs, 1944).

Posteriormente se estableció que la concentración de fósforo está regulada por la presencia de los metales iónicos como hierro, cobre, zinc y manganeso. En condiciones donde los metales no pueden ser totalmente controlados, como por ejemplo, en sustratos como melazas, es aconsejable trabajar con bajos niveles de fosfatos. En estas condiciones, un incremento en los fosfatos puede generar la formación de azúcares ácidos infermentables (Martin & Steel, 1954), otras reacciones colaterales e incremento de biomasa (Papagianni *et al.*, 1999a,b,c).

El efecto del KCl y NaCl fue estudiado por Allaway & Jennings, 1970, quienes encontraron que el crecimiento se puede reducir entre 40 y 25% en presencia de 200Mm de NaCl y KCl. Los iones de sodio inhibieron la absorción de la glucosa y su catabolismo. Al mismo tiempo, se observó excreción de K del micelio hacia el medio. Esta inhibición de absorción de la glucosa se contrarrestó con la adición de cloruro de calcio, el cual redujo también la pérdida de potasio.

En condiciones ideales para la producción de ácido cítrico, de nitrógeno limitante, se favorece la formación de pellets en estos hongos filamentosos (Braun y Vecht-Lifshitz, 1991). Por el contrario, el exceso de fosfatos, afecta negativamente la formación de pellets y estimula el crecimiento hifal (Kantz *et al.*, 1972).

Papagianni, 1995, 1999a, en un reactor tubular, encontró una relación cuantitativa entre la concentración de fosfato en el medio, la morfología de *Aspergillus niger* y la producción de ácido cítrico. Pequeños aumentos en la concentración de fosfato y potasio (KH_2PO_4) conllevaron a decrecimiento de la productividad en ácido cítrico, mientras la biomasa se dobló. Los cambios en la morfología observados fueron drásticos: aumento de la frecuencia de ramificación y de la longitud de las hifas, generando impacto negativo en la viscosidad del medio y concentración de oxígeno disuelto.

Se ha sugerido que la homeóstasis del pH intracelular en estos hongos filamentosos se logra por la operación paralela de una ATPasa y un sistema de toma de protones de alta afinidad (simporte) para potasio (Hesse *et al.*, 2002).

Actualmente se tiene plenamente establecido que la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* depende de la presencia de nutrientes como el nitrógeno, el fósforo, el potasio y otras sales (Jianlong y Pig, 1998; Wen y Chen, 2001; Jin Woo Kim, 2004). Nutrientes esenciales como N, P, K y Na deben ser proveídos en cantidades óptimas

para maximizar la producción de ácido cítrico y controlar el crecimiento micelial de *Aspergillus niger*. Distintos investigadores han corroborado que la producción de ácido cítrico es función de la suplementación del medio con glucosa, N, P. El nitrógeno y el P son esenciales dado que representan el 12.5% y 0.75% respectivamente de la biomasa del hongo en base seca (Kim *et al.*, 2006). El exceso de nitrógeno y potasio, promueven el crecimiento desviando la fuente de carbono hacia la producción de biomasa y energía y restringiendo la producción de ácido cítrico (Pintado *et al.*, 1998; Niamul *et al.*, 2009).

Papagianni en el 2007, describe la bioquímica de la producción del ácido cítrico. En esta descripción se destacan varias fosforilaciones de sustrato y oxidativas ambas dependientes de P, al igual que la vía pentosas fosfatos para fabricación de ADN y ARN donde igualmente está involucrado el P. Las siguientes enzimas de las rutas glicolítica y ciclo de Krebs requieren como co-factor el potasio: *piruvato kinasas*, *piruvato carboxilasa*, *citrato sintasa* (Rhem y Redd, 1983).

Optimización de la producción

La optimización de la producción de ácido cítrico se ha emprendido bajo diferentes estrategias que incluyen el mejoramiento de cepas y optimización de la formulación de nutrientes.

Mejoramiento de cepas

Muy pocas industrias utilizan en sus procesos productivos cepas silvestres aisladas directamente de la naturaleza, normalmente se acude a la utilización de mutantes o cepas recombinantes obtenidas por ingeniería genética. El objetivo principal del mejoramiento de cepas está dirigido a acortar los ciclos de fermentación, incrementar la productividad y mejorar los rendimientos del proceso. Es preciso anotar, que una elevada acumulación de ácido cítrico, genera condiciones de cultivo drásticas como bajo

pH y alta acidez, por lo cual es importante que la sensibilidad de las cepas a éstas condiciones se reduzca concomitantemente con mejoras en productividad y eficiencia (Gómez, 2004).

Pocos registros de mejoramiento de cepas para la producción industrial de ácido cítrico aparecen en la literatura, sin embargo, numerosas investigaciones de mutación y selección ó recombinación han sido realizadas de manera exitosa pero que no han sido publicadas dado que constituyen “*know how*” de las empresas y les permiten mantener su competitividad (Gómez, 2004).

§ **Mutación y selección.**

Las mutaciones pueden ocurrir *in vivo* de una manera espontánea. Sin embargo, debido a su baja frecuencia no se considera como práctica efectiva aislar mutantes espontáneos para el desarrollo de cepas industriales (Crueguer, 1989) y se acude entonces a la inducción con la utilización de agentes mutagénicos.

Los agentes mutagénicos más ampliamente utilizados para hongos son la luz ultra violeta, el ácido nitroso y la nitroquinolona, su uso incrementa considerablemente la frecuencia de mutación. Las mutaciones útiles en el mejoramiento de cepas microbianas son principalmente mutaciones puntuales, mutaciones cromosómicas pueden ocurrir pero son de menor significancia.

Altas dosis del agente mutagénico incrementan la probabilidad de obtener más de una mutación al tiempo en el mismo genoma, lo que puede resultar en el incremento de producción de ácido cítrico y a la vez, en una disminución de la viabilidad de la cepa. Para minimizar la probabilidad de obtener características indeseadas, es necesario optimizar el proceso hasta el punto de obtener una elevada frecuencia de mutación y viabilidad de la cepa resultante (Crueguer, 1989).

Las cepas mutantes deben ser preservadas adecuadamente para evitar el decaimiento ó pérdida de la característica de interés. Dado que el decaimiento se da normalmente durante las etapas vegetativas, la mejor forma de preservar las cepas mejoradas es bajo la forma de esporas o conidiosporas.

H. Ikram Ul *et al.*, 2004, realizaron ensayos de producción de ácido cítrico a partir de melazas de caña con mutantes seleccionados *de A. niger*. Después de realizar una mutación con luz ultra violeta a una suspensión conidial, tres variantes se seleccionaron por presentar la mejor productividad, los cuales fueron mejorados por posterior mutación, con N-metil N-nitro N- nitroso guanidina (MNNG). A partir de ésta segunda mutación, variantes resistentes a la 2, 3 deoxy D- glucosa se seleccionaron como los más productivos con melazas pre-tratadas con ferrocianuro de potasio y ácido sulfúrico.

Estudios similares fueron realizados y registrados por Lofty *et al.*, 2007, quienes obtuvieron cepas sobre-productoras de ácido cítrico, las cuales se probaron con diversas fuentes alternativas de nitrógeno y carbono derivadas de desechos industriales.

§ Ingeniería genética.

Las técnicas de mejoramiento anteriormente descritas, son procesos de ensayo y error que involucran laboriosos programas de selección y en los cuales en la mayoría de los casos, se desconoce el mecanismo particularmente afectado. Por el contrario, la ingeniería genética realiza una aproximación más racional y permite la manipulación de etapas específicas de la ruta bioquímica definida (Kristiansen *et al.*, 2002).

Los registros del uso de las técnicas de ADN recombinante en *A. niger* son relativamente recientes (Buxton *et al.*, 1985 ; y Kelly y Hye, 1985). La transformación de *Candida lipolytica* es muy posible, sin embargo no existen reportes en donde esta cepa se transforme para mejorar su producción de ácido cítrico (Davidow *et al.*, 1985).

Diferentes protocolos de transformación de *A. niger* se han registrado, el más utilizado involucra el polietilenglicol como mediador de la captura DNA por parte de protoplastos, seguido de una regeneración en un medio adecuado y selectivo. Este ADN ya sea lineal o circular se integra posteriormente al genoma. La integración puede ocurrir en el locus homólogo o en otro loci. Múltiples copias del gene introducido pueden obtenerse dependiendo del número de copias en el sitio de integración. Nielsen *et al.*, 2008, insertaron genes involucrados en la vía reductiva del ciclo de Krebs en *Aspergillus niger*. Muchos genes individuales así como diferentes combinaciones fueron evaluados: *malato deshidrogenasa (mdh2)* de *Saccharomyces cerevisiae*, *fumarasas (Fum1s y FumRs)* de *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizopus oryzae*. Todos los transformantes presentaron rendimiento y productividad en ácido cítrico superior a las cepas de origen.

Estudio de la formulación de nutrientes.

Son múltiples las investigaciones que se encuentran con respecto al estudio de la formulación de nutrientes para la fermentación de ácido cítrico. Sin embargo, la mayoría de ellos están enfocados a la utilización de sub-productos o residuos agroindustriales ya que el costo de sustrato tiene un impacto significativo en el costo de producción.

Kim *et al.*, 2006, evaluaron la optimización de la formulación de nutrientes para la producción de ácido cítrico por fermentación en estado sólido utilizando una cepa de *A. niger* NRRL 567 crecida en turba suplementada con glucosa. Las variables evaluadas fueron la concentración de nitrógeno, fósforo, glucosa y NaCl. Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando un diseño de tratamientos punto central a partir del cuál

produjeron una ecuación polinómica de segundo orden para predecir la concentración de ácido cítrico como una función de las variables evaluadas.

Imandi *et al.*, 2007, optimizaron los componentes del medio para la producción de ácido cítrico por fermentación sumergida con una cepa de levadura de *Yarrowia lipolytica* NCIM3589 a partir de glicerol, un sub-producto de la producción de biodiesel, utilizando un diseño experimental Doehlert. Las variables estudiadas fueron la concentración de glicerol (20-80g/L), extracto de levadura (0.1-0.5g/L) y cloruro de sodio (10-20g/L). Para analizar los datos utilizaron la metodología de análisis de superficie de respuesta la cuál permite rápida y eficientemente acercarse al óptimo.

Imandi *et al.*, 2008, aplicaron diseños experimentales para optimizar los componentes del medio para la producción de ácido cítrico a partir de residuos de piña. El trabajo se realizó utilizando la cepa de levadura de *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 en fermentación en estado sólido. Utilizando el diseño de tratamientos de Plackett-Burman las variables de extracto de levadura, el contenido de humedad, KH_2PO_4 y Na_2HPO_4 fueron identificadas como las variables que más influyen la producción de cítrico y fueron por lo tanto subsecuentemente optimizadas utilizando un diseño de punto central.

Niamul *et al.*, 2009, realizaron una optimización secuencial basada en un diseño de un factor al tiempo utilizando residuos vegetales como sustrato de la fermentación sólida encontrando como factores más importantes la concentración de sustrato y la presencia de minerales como Zn, Cu, Mn y Mg los cuales fueron posteriormente optimizados utilizando un diseño de punto central y la metodología de superficie de respuesta.

2.METODOLOGÍA

Con el propósito de cumplir con los objetivos propuestos se diseñaron tres ensayos que buscaban probar las hipótesis planteadas. El ensayo 1, se diseñó con el objeto de probar la hipótesis que el K y el P son elementos fundamentales y determinantes de los resultados de la fermentación. Los ensayos 2 y 3, se diseñaron para demostrar que un incremento en la concentración de K y una reducción de P, en una formulación base, generan un aumento significativo en el rendimiento y productividad de la fermentación de ácido cítrico.

Los tres ensayos tuvieron en común el tipo y concentración de sustrato, la formulación de base (Ca, Mg, Cu, Fe, Zn, Mn) y fuente de nitrógeno (urea y sulfato de amonio), el pH, la agitación, la concentración de inóculo, el volumen y el tiempo de fermentación. Las variables de respuesta analizadas fueron la morfología fúngica y biomasa generada (g/L) y para el ensayo 1; y la productividad (g/Lxh) y el rendimiento (%) de la fermentación de ácido cítrico para los tres los ensayos.

La unidad experimental consistió en un erlenmeyer de 250mL de capacidad con tres baffles en el fondo conteniendo 30mL de medio cultivo y una suspensión de esporas como inóculo.

Ensayo 1.

En el ensayo 1 se evaluó el efecto de la ausencia y presencia del P y el K (individualmente y en conjunto), sobre la morfología de la cepa seleccionada y su producción de ácido cítrico.

Diseño Experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones. La estructura del diseño de los tratamientos fue multifactorial completo con dos factores (fósforo y potasio) y dos niveles (2^2) (Tabla 2-1).

Tabla 2-1: Tratamientos para evaluar el efecto de ausencia y presencia de P y K sobre la morfología de la cepa en estudio y su producción de ácido cítrico.

Tratamiento	Fósforo (P) (ppm)	Potasio (K)(ppm)
1	0	0
2	0	271
3	329	0
4*	329	271

**Tratamiento 4: Nivel estándar para pruebas de laboratorio en frascos agitados.*

Análisis de la información.

Para el análisis de la información se utilizó el paquete estadístico Minitab versión 15 (2008). Las variables de respuesta obtenidas a partir de los resultados obtenidos en cada tratamiento propuesto fueron analizadas utilizando gráficos de contorno y superficie, gráficos de efectos principales e interacciones. Adicionalmente se realizó un análisis de varianza para evaluar los efectos de los niveles de fósforo y potasio y su interacción.

Montaje de las fermentaciones.

§ Preparación de sustrato.

El sustrato utilizado en las fermentaciones fue sacarosa de caña azúcar a una concentración de 250 g/L. La solución de azúcar previamente diluída se decationizó a través de una resina catiónica (referencia Lewatit Mono Plus S100 de Lanxess) con la de la cual se retiraron los cationes presentes. La solución decationizada, se esterilizó en autoclave durante 5min a 121°C y 15 libras de presión.

§ Preparación de inóculo.

El microorganismo utilizado en la presente investigación fue una cepa de *Aspergillus niger* mejorada por mutación con luz ultravioleta (Lámpara UVG-54 de 254nm, 3min de exposición) y seleccionada por su elevada producción de ácido cítrico en comparación con su parental (cepa mejorada por 45 años), se utilizó como sustrato la sacarosa de caña. La cepa fue mantenida en silica gel. Los cultivos de trabajo fueron preparados en Agar Sabouraud a partir de la cepa preservada y fueron incubados por 7 días a 30°C antes de su utilización. Las esporas fueron recuperadas y contadas en un contador de partículas HIAC 8000. A partir de los recuentos, se prepararon suspensiones con una concentración fija de 4×10^7 sp/mL con el objeto de tener poblaciones similares en todas las fermentaciones. 0.3mL de la suspensión de esporas,

es decir 10% del volumen total, fueron utilizados como inóculo para cada una de las fermentaciones.

§ **Condiciones y medio de producción.**

Las diferentes fermentaciones se realizaron en un agitador orbital a 225 RPM ubicado en un cuarto con temperatura y humedad controlada (34,5 +/-0.5°C y 60-70%). El medio en el cual se realizaron las diferentes fermentaciones además de tener sacarosa como fuente de carbono, fue suplementado con micro-nutrientes (Cu, Zn, Fe, Mn) y macro-nutrientes (Ca, Mg, K & P) del orden de partes por millón, adicionalmente contiene urea y fosfato de amonio como fuente de nitrógeno. El pH inicial del medio se ajustó a un valor alrededor de 3.0. Las fermentaciones se dejaron corriendo durante 143h. A cada erlenmeyer o fermentación se le adicionaron 29.7ml del medio de cultivo.

§ **Técnicas Analíticas.**

Una vez finalizada la fermentación, es decir después de 143h, los erlenmeyers fueron retirados del agitador orbital y su contenido procesado. El volumen de total y de biomasa fue medido después de permitir la sedimentación de las muestra por 15 min en tubos de centrífuga graduados. El sobrenadante, se filtró utilizando filtros Whatman de 0.45µ referencia 69702504. El filtrado obtenido se utilizó para medir el pH, la producción de ácido cítrico por titulación ácido –base; la concentración de azúcar por Brix. La biomasa se midió por peso seco (g/l).

Figura 2-1: Agitador Orbital. Cuarto con temperatura (34.5°C) y humedad relativa (60-70%) controladas.



§ Cálculo de las variables de respuesta.

La productividad de la fermentación de ácido cítrico (g/Lxh), se calculó dividiendo la concentración de ácido cítrico obtenida (g/L) sobre el tiempo de fermentación (h). El rendimiento de la fermentación (%) por su parte, se calculó dividiendo la cantidad de ácido cítrico obtenida en la fermentación (g) sobre la cantidad de sustrato (g) y se expresó en porcentaje (%).

Ensayo 2.

Se evaluaron cinco tratamientos resultantes de combinaciones de P & K que surgieron a partir de resultados preliminares (ver tabla 1) obtenidos al utilizar los niveles de frascos agitados y de planta piloto. Adicionalmente, se incluyeron niveles intermedios (Tabla 2-2).

Diseño Experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones. La estructura del diseño de los tratamientos fue multifactorial completo aumentado, con dos factores (fósforo y potasio) y dos niveles más un punto central ($2^2 + PC$).

Tabla 2-2: Tratamientos para determinar los niveles adecuados de P y K para la fermentación de ácido cítrico.

Tratamiento	Fósforo (P) (ppm)	Potasio (K) (ppm)
1	329	208
2	329	271
3	430	208
4	430	271
5	380	240

Tratamiento 2: K alto y P bajo estándar para frascos agitados. Tratamiento 3: K bajo y P alto estándar para planta piloto. Unidades codificadas Bajo: -1, Medio: 0, Alto: +1.

El análisis de la información, así como el montaje de las fermentaciones incluida la preparación de sustrato y de inóculo, las condiciones de cultivo, el medio de producción y las técnicas analíticas utilizadas para este ensayo fueron las mismas descritas para el ensayo 1 en los literales 2.1.3.

Modelo estadístico.

El siguiente modelo estadístico se ajusta bien a los ensayos dos y tres:

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + K_j + (P \times K)_{ij} + E_{ijk}$$

Y_{ijk} : Variable de respuesta para nivel de fósforo i, nivel de potasio j, repetición K.

μ : Media general.

P_i : Nivel de fósforo i.

K_j : Nivel de potasio j.

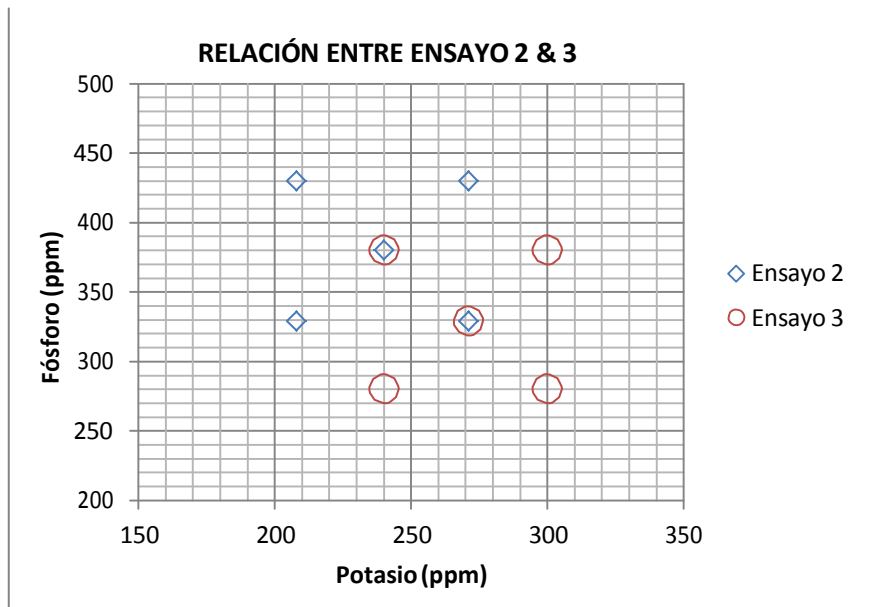
$(P \times K)_{ij}$: Interacción fósforo i por potasio j.

E_{ijk} : Error experimental fósforo i, potasio j, réplica k.

Ensayo 3.

El nuevo ensayo pretendió comprobar si continuar reduciendo el P y aumentando el K por encima de los niveles evaluados en el ensayo 2, continuaría mostrando la misma tendencia en la productividad y rendimiento de la fermentación de ácido cítrico. Se retomaron algunas combinaciones evaluadas en el ensayo 2. La relación entre los ensayos 2 y 3, se muestra en la figura 2-2.

Figura 2-2: Relación entre ensayos 2 y 3.



Diseño Experimental.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones. La estructura del diseño de los tratamientos fue multifactorial completo aumentado, con dos factores (fósforo y potasio) y dos niveles más un punto central ($2^2 + PC$).

Tabla 2-3: Matriz de combinaciones evaluadas en el Ensayo 3.

Tratamiento	Potasio (K) (ppm)	Fósforo (P) (ppm)
1	240	280
2	300	280
3	240	380
4	300	380
5	271	329

K alto y P bajo estándar para frascos agitados. K bajo y P alto estándar para planta piloto. Unidades codificadas Bajo: -1, Medio: 0, Alto: +1.

El análisis de la información, así como el montaje de las fermentaciones incluida la preparación de sustrato, de inóculo, las condiciones de cultivo, el medio de producción y las técnicas analíticas utilizadas para este ensayo, son las mismas descritas para el ensayo 1. El modelo estadístico planteado para el ensayo 2 también se ajusta a este ensayo.

3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 Ensayo 1.

El análisis de varianza muestra que los nutrientes P y K individuales y en interacción tuvieron influencia altamente significativa ($p \leq 0.01$) – Tabla 3 -1 - sobre los resultados obtenidos en la fermentación de ácido cítrico en las variables rendimiento (%), productividad (g/l x h) y biomasa fúngica (g/l) - Anexo A.

Tabla 3-1: Ensayo 1. Análisis de Varianza para rendimiento (%), productividad (g/L*h) y biomasa (g/L).

Fuente	GL	Rendimiento (%)		Productividad (g/Lxh)		Biomasa (g/L)	
		CM	p	CM	p	CM	p
P	1	2580.16	0.0001 ^a	0.85800	0.0001 ^a	178.79	0.0001 ^a
K	1	4071.56	0.0001 ^a	1.32667	0.0001 ^a	206.62	0.0001 ^a
P x K	1	2705.40	0.0001 ^a	0.89107	0.0001 ^a	172.36	0.0001 ^a

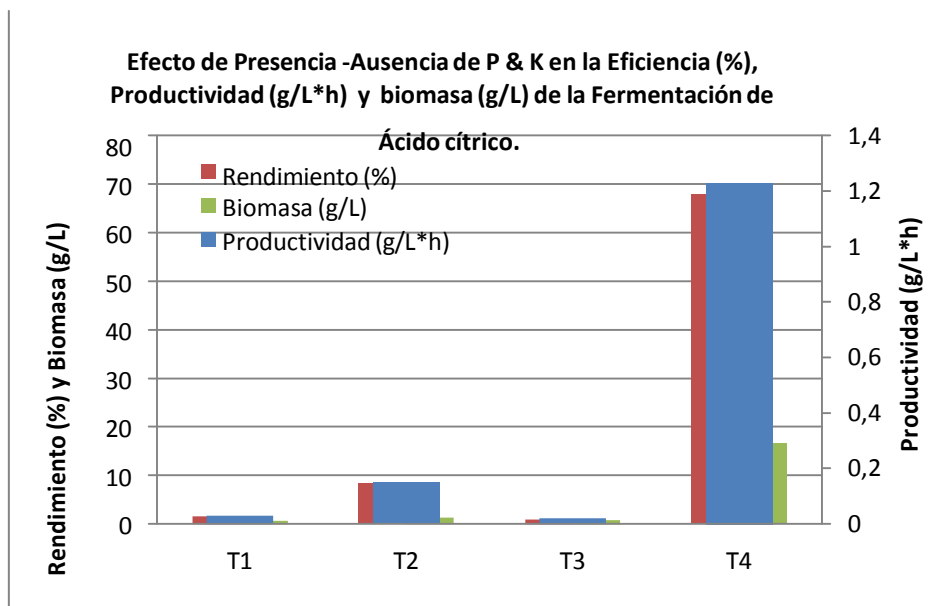
a. Altamente significativo a $p (\alpha \leq 0.01)$.

El alto coeficiente de correlación entre las diferentes variables de respuesta, en todos los casos, demuestra estrecha asociación entre ellas, es decir que si una se incrementa, la otra también (Figura 3-1, Anexo A).

Análisis del rendimiento.

Un coeficiente de variación bajo (<5%) en esa variable, excepto en el caso del tratamiento 3, muestra un adecuado control de las condiciones ambientales durante el ensayo. Con base en los valores p (Tabla 3-1), se concluye que los efectos principales de P y K son altamente significativos sobre el rendimiento y que existe interacción entre los factores.

Figura 3-1: Ensayo 1. Rendimiento (%), biomasa (g/L) y productividad (g/L*h) en la fermentación de ácido Cítrico en ausencia y /o presencia de P y K individualmente y en conjunto.



Los efectos del fósforo (P) y del potasio (K) son positivos, lo que indica que al pasar del nivel bajo (ausencia) al alto (presencia), el rendimiento de la fermentación se incrementa drásticamente como lo confirma la Figura 3-2 de efectos principales. Adicionalmente, se representa la interacción de los factores con la intersección de las dos líneas (Figura 3-3). La figura 3-4 de análisis de contorno muestra que el rendimiento (%) de la fermentación de ácido cítrico aumenta a medida que los niveles de Fósforo y Potasio aumentan.

Figura 3-2: Ensayo 1. Efectos principales rendimiento de la fermentación.

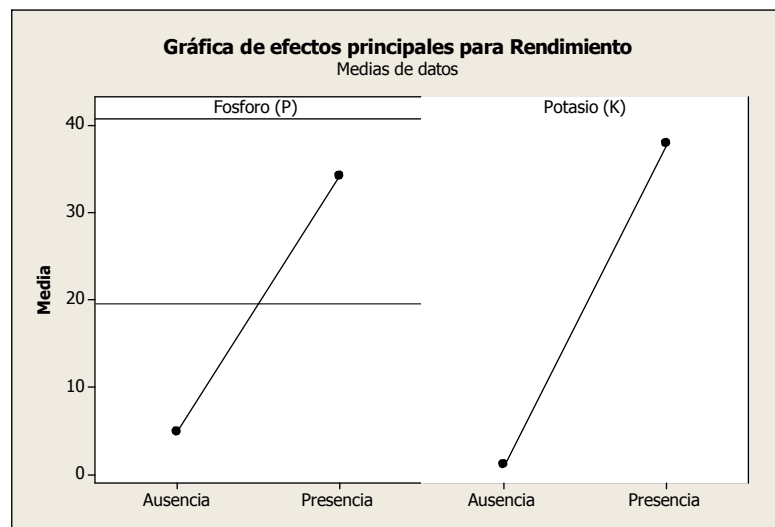


Figura 3-3: Ensayo 1. Interacción para el rendimiento de la fermentación.

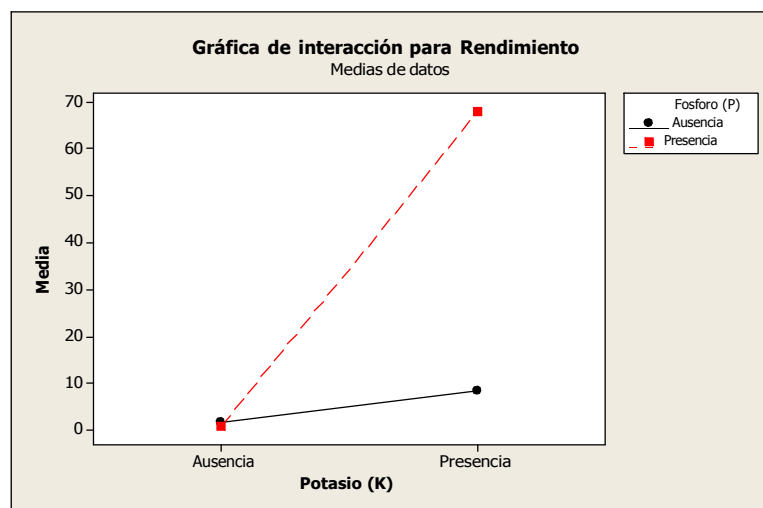
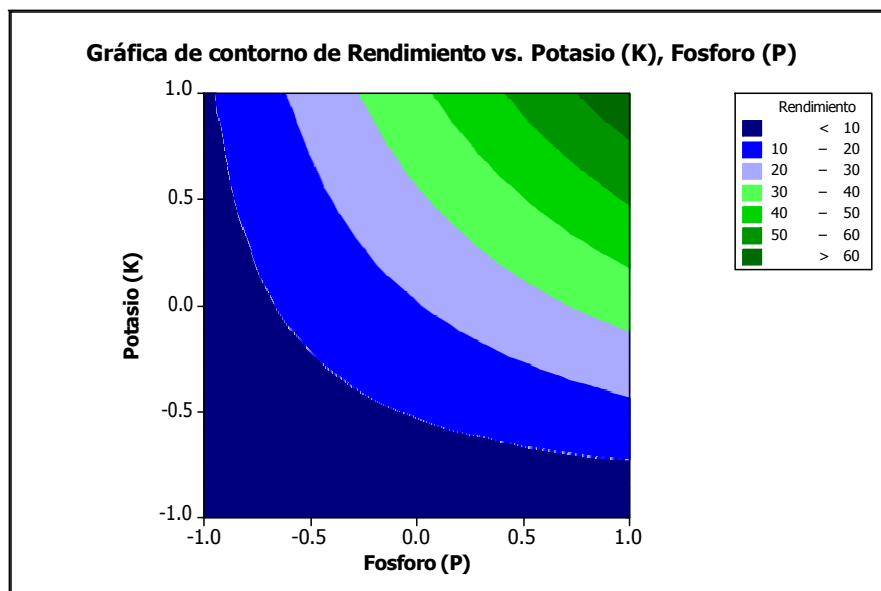


Figura 3-4: Ensayo 1. Contorno para el rendimiento de la fermentación.

Análisis de Productividad.

El coeficiente de variación de la productividad obtenida muestra adecuado control de las condiciones de evaluación y valores muy similares entre réplicas (Anexo A).

Con base en los valores p (Tabla 3-1), se concluye que los efectos principales son estadísticamente significativos y que existe interacción altamente significativa entre los factores (p valor < 0.01). Es decir que, los niveles de fósforo y potasio influyen en la productividad (g/L*h) de la fermentación del ácido cítrico de la misma forma que influyen en el rendimiento (%).

Se observa adicionalmente, cómo el efecto de los factores de fósforo (P) y potasio (K) es positivo, lo que sugiere que al incrementarlos del nivel bajo (ausencia) al alto (presencia), la productividad en la fermentación se incrementa y, por lo tanto, ambos nutrientes son fundamentales en la productividad, lo cual se corrobora con las figuras 3-5 y 3-7 de efectos principales y de contorno, respectivamente.

En la interacción K x P (Figura 3-6) se observa que el efecto del potasio es pequeño cuando hay ausencia de fósforo, y los mejores resultados en productividad en la fermentación de ácido cítrico, se obtienen en presencia de ambos nutrientes.

Figura 3-5: Ensayo1. Efectos principales para la Productividad (g/L*h) de la fermentación.

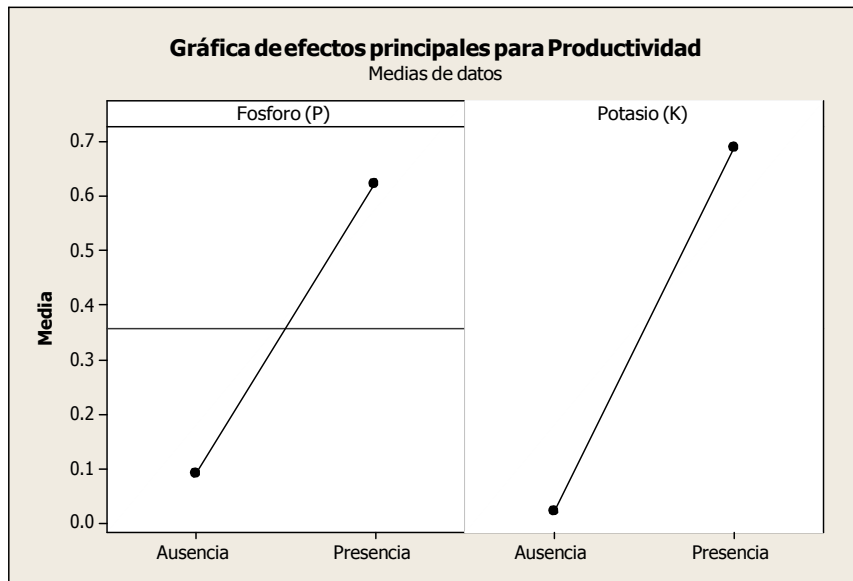


Figura 3-6: Ensayo1. Interacción para la Productividad (g/L*h) de la fermentación.

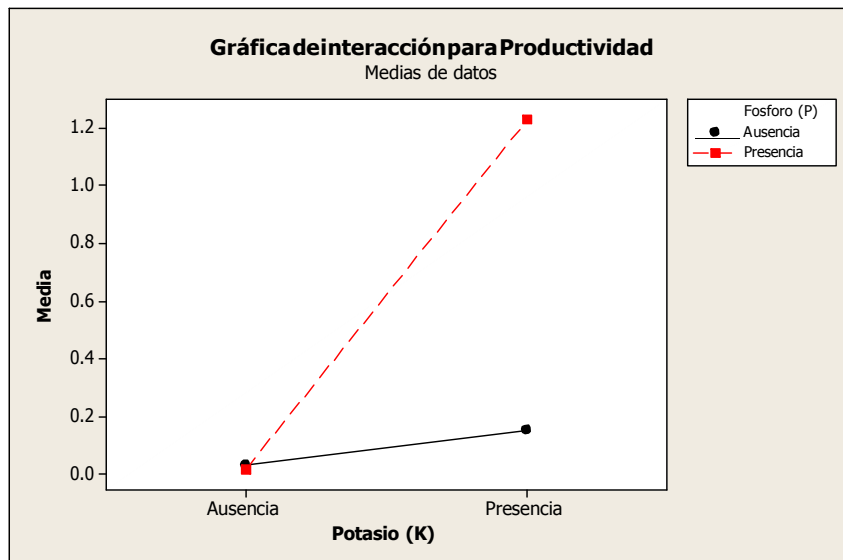
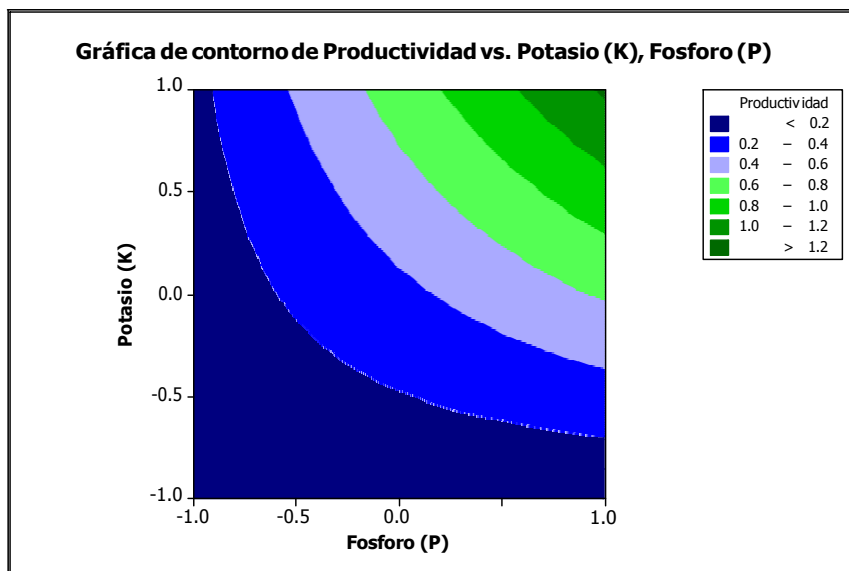


Figura 3-7: Ensayo1. Contorno para la productividad (g/Lxh) de la fermentación.

Análisis de *Aspergillus niger*

§ Biomasa fúngica.

De acuerdo con los valores de p , se observa como el efecto de los factores de fósforo (P) y potasio (K) es estadísticamente significativo y positivo; lo que sugiere que incrementar del nivel bajo (ausencia) al alto (presencia), la biomasa fúngica formada durante la fermentación sufre un incremento como sucede con la productividad y el rendimiento, analizados con anterioridad. Adicionalmente, existe interacción altamente significativa entre los factores (p valor < 0.01), es decir los niveles de fósforo y potasio influyen directamente en la formación biomasa fúngica durante la fermentación del ácido cítrico.

Tanto en la figura de efectos principales (Figura 3-8) como la de contorno (Figura 3-10) se muestra que el nivel de fósforo (P) y el de potasio (K) ejercen un efecto positivo sobre la formación de biomasa fúngica.

En la interacción K x P (Figura 3-9), se observa que el efecto del K sobre la formación de biomasa fúngica es pequeño cuando hay ausencia de fósforo y se incrementa en presencia de ambos nutrientes.

Figura 3-8: Ensayo 1. Efectos principales para Biomasa (g/L) de la fermentación.

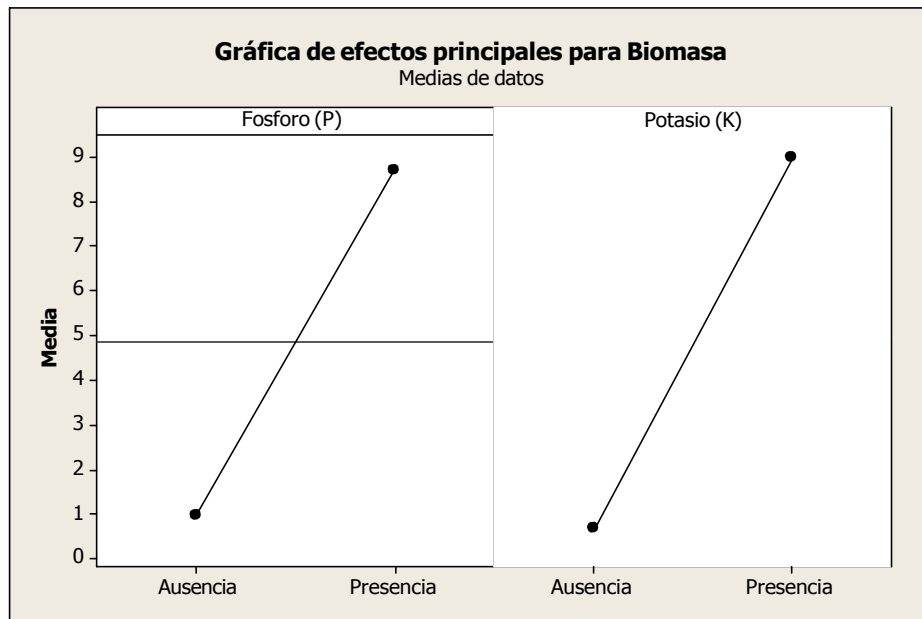


Figura 3-9: Ensayo 1. Interacción para Biomasa (g/L) de la fermentación.

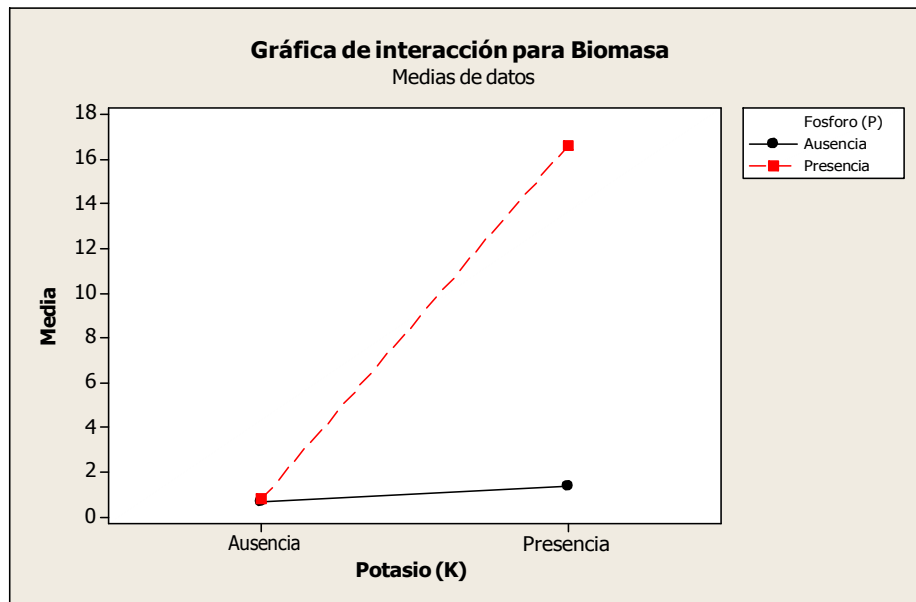
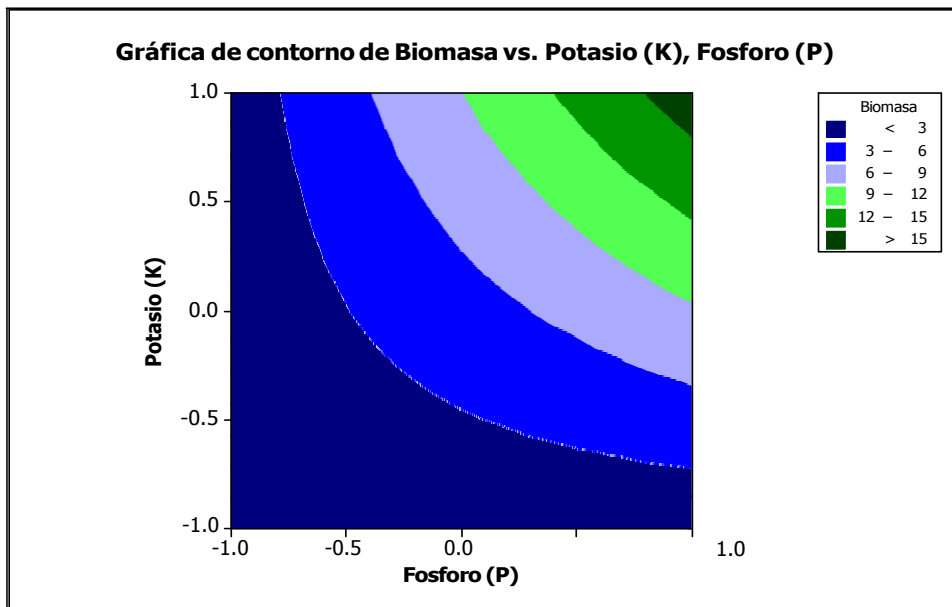


Figura 3-10: Ensayo 1. Contorno para la Biomasa (g/L) en la fermentación.



§ Morfología fúngica

La ausencia o presencia de P y K tienen marcada influencia en la morfología del hongo. Como se puede observar en microscopía óptica (400x), la ausencia de P y K predispone a la formación de un pellet disperso y difuso, con hifas extremadamente largas, que se entrecruzan (Figura 3-11a), mientras que la presencia de P y ausencia de K (Figura 3-11c) llevan a que se forme un pellet muy grande, las hifas se agrupan más densamente, sin embargo, el efecto de no tener K lleva a la formación de hifas quebradizas (observación de la autora en otras investigaciones).

La ausencia de P y presencia de K generan pellets compactos, pero pequeños con hifas medianas, menos densas (Figura 3-11b). En la presencia de ambos nutrientes (en la formulación del tratamiento 4) se observa un pellet grande, más definido y redondo e individualidad muy definida, con hifas muy cortas y sus puntas redondeadas (Figura 3-11d).

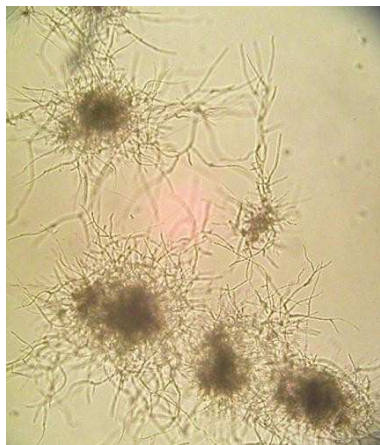
Esta morfología se considera como la más apropiada para la producción de ácido cítrico y corrobora que cuando los dos elementos, P y K, están presentes al tiempo (tratamiento 4), se logra la condición ideal, de conformidad con la experimentación cotidiana en la producción industrial y las observaciones de diferentes investigadores.

Papagianni en el año 2007 investigó la relación entre la morfología del hongo y la productividad en la fermentación de ácido cítrico en cultivos sumergidos. En esta búsqueda, registró los desacuerdos que existen acerca de si la morfología peletizada y/o la filamentosa es la más deseable para la producción de ácido cítrico. Sus principales hallazgos son recopilados a continuación y comparados con los resultados obtenidos en el ensayo1:

La morfología ideal para *A. niger* fue descrita por primera vez por Snell y Schweiger (1951): "*Ramificaciones hifales cortas, hinchadas con puntas redondeadas*"; similar a la

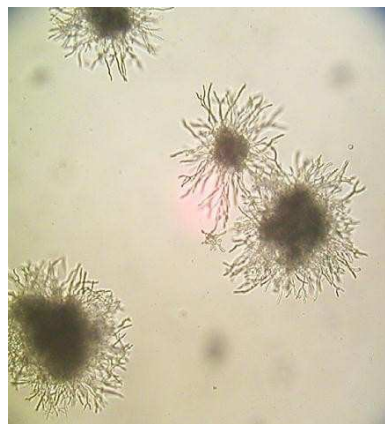
observada en el tratamiento 4 de la presente investigación. En cultivos sumergidos, la morfología del hongo varía desde pellets hasta filamentos libres dependiendo de las condiciones de cultivo y del genotipo de la cepa.

Figura 3-11: Ensayo 1. Pellets de *Aspergillus niger* formados en las formulaciones evaluadas en los cuatro tratamientos. Microscopía óptica, aumento 400x.



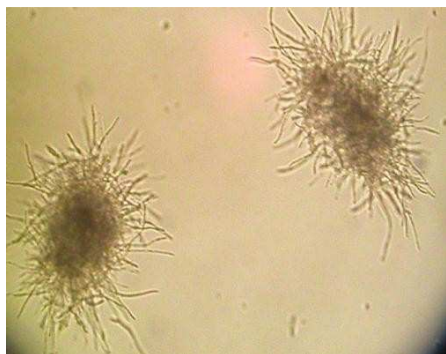
a. Tratamiento 1.

Ausencia P, Ausencia K.



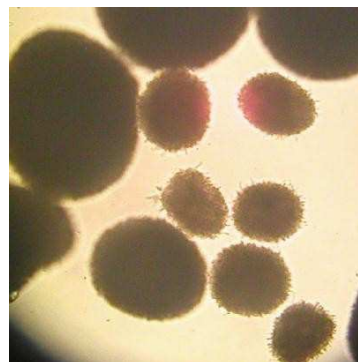
b. Tratamiento 2.

Ausencia P, Presencia K.



c. Tratamiento 3.

Presencia P, Ausencia K.



d. Tratamiento 4.

Presencia P, Presencia K.

Snell y Schweiger (1951) encontraron que la formación de agregados compactos ó pellets de 0.5 mm (500 μ) diámetro son requisito para la producción de ácido cítrico, tamaño que coincide con el obtenido en el tratamiento 4 de esta investigación y en muestras finales de fermentación (75 μ a 24h, 350 μ a 72h y 500 μ a partir de las 100h).

Takahashi *et al.*, 1958, también encontraron que en el crecimiento peletizado es superior la acumulación de ácidos en comparación con la presencia de filamentos difusos. En contraste, Moyer (1953) sostiene que la formación del pellets es indeseable para la producción de cítrico. Papagianni *et al.*, 1994, 1998 y 1999a,c; mediante estudios de imágenes encontraron alta relación entre la morfología y la productividad de la fermentación en diferentes tipos de bio-reactores en los cuales las cepas crecían en "clumps", definidos como agrupaciones en partículas estables o filamentos interconectados con un núcleo pequeño.

La interpretación de los resultados obtenidos por diferentes autores llevan a pensar que además de los factores nutricionales, otras condiciones tienen influencia en la morfología del hongo en cultivos sumergidos, entre ellos, la agitación, el pH del medio, la concentración de inóculo y la cepa fungosa utilizada.

La agitación está asociada con el desarrollo de filamentos cortos, delgados y altamente ramificados que conllevan sobreproducción de ácido cítrico. Sin embargo, podría causar rompimiento de los filamentos. Las fracciones de micelio que son más susceptibles de ruptura son fragmentos viejos con alto número de vacuolas, fragmentos que son inactivos (Papagianni *et al.*, 1999c).

De acuerdo con Kristiansen *et al.*, 2002, un beneficio importante de tener una morfología de pellets compactos, es una mejor reología (Reología Newtoniana) del medio de cultivo. La menor viscosidad del medio hace que sea más fácil mezclar, resultando esto en una mayor tensión de oxígeno disuelto.

Tener una aireación eficiente es muy importante para evitar reducción de la productividad por decrecimiento de la tensión superficial de oxígeno disuelto. Adicionalmente, la morfología compacta, ocasiona que el crecimiento celular sólo se dé en la superficie del pellet donde el contacto e intercambio con el oxígeno y otros nutrientes, ocurre de manera eficiente. La fracción interior del pellet, se encuentra en condiciones muy diferentes y gradualmente se muere por la limitada transferencia de masa.

El oxígeno actúa como un regulador directo de la acumulación de ácido cítrico y se puede favorecer incrementando la tensión de oxígeno disuelto en el medio de fermentación. Bajos niveles de oxígeno disuelto ocurren con morfologías no peletizadas. Aunque no parece existir relación directa entre la morfología y el oxígeno disuelto, se ha observado mayor producción de ácido cítrico cuando se tiene una morfología peletizada y se incrementa la concentración de oxígeno disuelto en cada etapa del proceso (Kristiansen *et al.*, 2002).

De acuerdo con Dai *et al.*, 2004, la morfología de hongos filamentosos en procesos fermentativos es crítica para la máxima obtención de producto. La morfología óptima para la producción de ácidos orgánicos difiere entre hongos, pero los pellets pequeños usualmente están correlacionados con procesos fúngicos eficientes. La morfología peletizada es importante para una máxima producción no sólo de ácido cítrico por *A. niger*, sino también de ácido itacónico por *A. terreus*, pravastatina precursor de la penicilina por *Penicillium* entre otros.

La habilidad de obtener y mantener una morfología particular es uno de los parámetros claves en el desarrollo de fermentaciones fúngicas. La determinación de condiciones como la agitación, la concentración de oxígeno disuelto, la concentración de sustrato, la concentraciones de P, N y micronutrientes, el pH, y la concentración de inóculo, tiene un efecto morfológico diferente en cada hongo (Dai *et al.*, 2004).

La adopción de una morfología de pellets fungosos pequeños (<1mm o 1000μ de diámetro), reduce la limitación por transferencia de masa en las fermentaciones sumergidas. En estos tamaños decrece la viscosidad del medio de cultivo lo que a su vez incrementa la eficiencia de la agitación o mezclado y por tanto mejora la transferencia de masa (Serizawa *et al.*, 1997 y Dai *et al.*, 2004).

Michel *et al.*, 1992 y Dai *et al.*, 2004, mostraron que la concentración de oxígeno cae rápidamente en la superficie de los pellets, estudio que demuestra que existe un límite máximo de tamaño de pellets asociado a alta productividad en procesos aeróbicos.

Yigitoglu (1992), destaca algunos beneficios adicionales al tener una morfología peletizada en vez de filamentosa como, por ejemplo, la disminución de crecimiento en la pared y la mejor eficiencia en la filtración de la biomasa en las etapas subsiguientes de la fermentación.

La revisión anterior da soporte teórico y experimental de que la morfología de *A.niger* peletizada con hifa corta y con tamaño promedio de 500μ, obtenida en el tratamiento 4 del ensayo 1 de la presente investigación. Esta morfología se obtiene en presencia de la formulación de base en la cual, el P y K combinados, tienen influencia altamente significativa, no sólo en la presentación de estas características fenológicas sino también en el rendimiento y productividad del proceso de producción de ácido cítrico, en conjunto.

Los factores nutricionales son de extrema importancia en la acumulación del ácido cítrico, porque para maximizar esta acumulación, el crecimiento debe restringirse. El exceso de fosfatos y/o fuente de fósforo por ejemplo, reduce la formación del pellets e induce una morfología filamentosa y excesiva formación de biomasa deletérea para maximizar la producción de cítrico.

Ensayo 2.

El análisis de varianza del ensayo 2 (Tabla 3-2) sólo arroja diferencias altamente significativas para los niveles de K planteados en esta fase, tanto en productividad (g/l/h) como en rendimiento (%). Los resultados promedio de cada tratamiento evaluado así como los coeficientes de variación obtenidos se presentan en el Anexo B. El coeficiente de variación bajo y menor al 0.5%, demuestra un adecuado control en las condiciones del ensayo.

Tabla 3-2: Ensayo 2. Análisis de Varianza para la productividad (g/lxh) y rendimiento (%) de ácido cítrico.

Término	Productividad (g/L*h)			Rendimiento (%)	
	GL	CM	p	CM	p
P	1	0.0005070	0.4600	1.04430000	0.5671
K	1	0.0203363	0.0007 ^a	60.8400333	0.0011 ^a
P x K	1	0.0307200	0.0878	11.1747000	0.0816
Punto Central	1	0.0028843	0.09670	1.466406667	0.4991

a. Altamente significativa a $p (\alpha \leq 0.01)$.

Los mejores resultados en términos de rendimiento y productividad de la fermentación, se obtuvieron con el nivel catalogado como alto de K (271ppm) y bajo de P (329ppm), dentro de los niveles evaluados en este ensayo, lo que está acorde con la hipótesis planteada. Aunque sólo el efecto del K muestra alta significancia, los incrementos obtenidos en términos de rendimiento y productividad de la fermentación son

representativos y generan ahorros potenciales importantes, como se discute con posterioridad (numeral 3.2.4).

En el análisis de los efectos principales (K y P), sólo el primero es estadísticamente significativos (p valor < 0.05) y no hay interacción estadísticamente significativa entre los factores K y P ($p > 0.05$). Es decir, que los niveles de fósforo y potasio influyen de manera directa en la productividad y rendimiento de la fermentación del ácido cítrico pero en forma independiente.

El coeficiente de correlación (R_c) entre rendimiento (%) y productividad ($g/L \cdot h$) fue de 0.216, el cual es bajo y no significativo e indica que las variables de rendimiento y productividad se comportan como independientes en el presente ensayo.

En los niveles de P y K evaluados en este ensayo, la morfología observada, es similar a la obtenida en el tratamiento 4 del ensayo 1.

Análisis de Productividad.

La figura 3-12 de efectos principales indica que el nivel de K y de P ejercen efecto en la productividad de la fermentación de ácido cítrico. Sin embargo, el P no es estadísticamente significativo, lo que se confirma con la ligera pendiente de la variable. En cambio, se observa que al pasar de un nivel denominado bajo en K a uno alto se incrementa la productividad considerablemente.

En la figura 3-13, la interacción K x P sobre la productividad de la fermentación es independiente el P del nivel de potasio, obteniéndose mayor productividad, cuando el K se encuentra en un nivel alto. El gráfico de Pareto (Figura 3-14) confirma que

únicamente la variable K tiene efecto estadísticamente significativo sobre la productividad de ácido cítrico.

Figura 3-12: Ensayo 2. Efectos principales para la productividad de la fermentación.

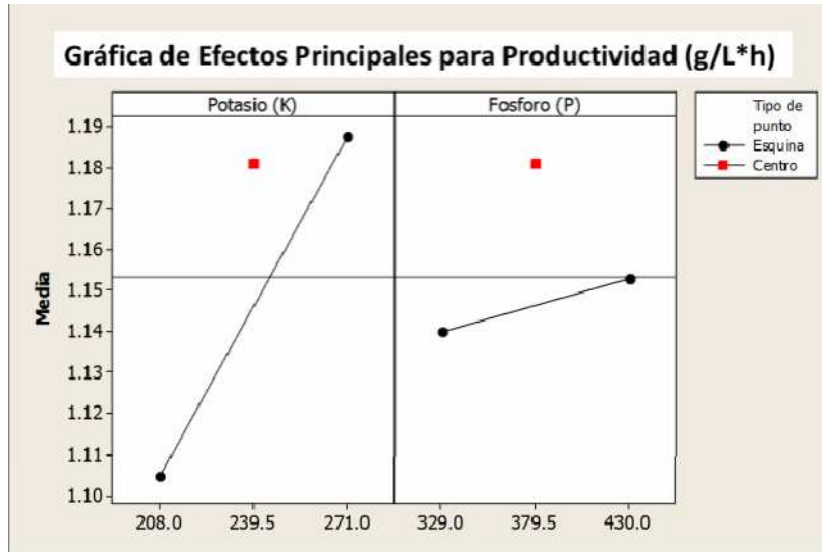


Figura 3-13: Ensayo 2. Interacción para Productividad (g/Lxh) en la fermentación.

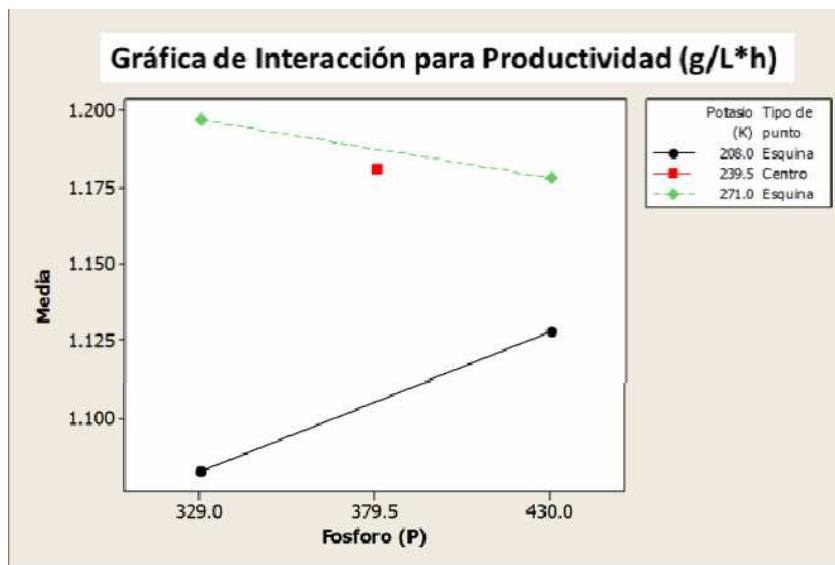
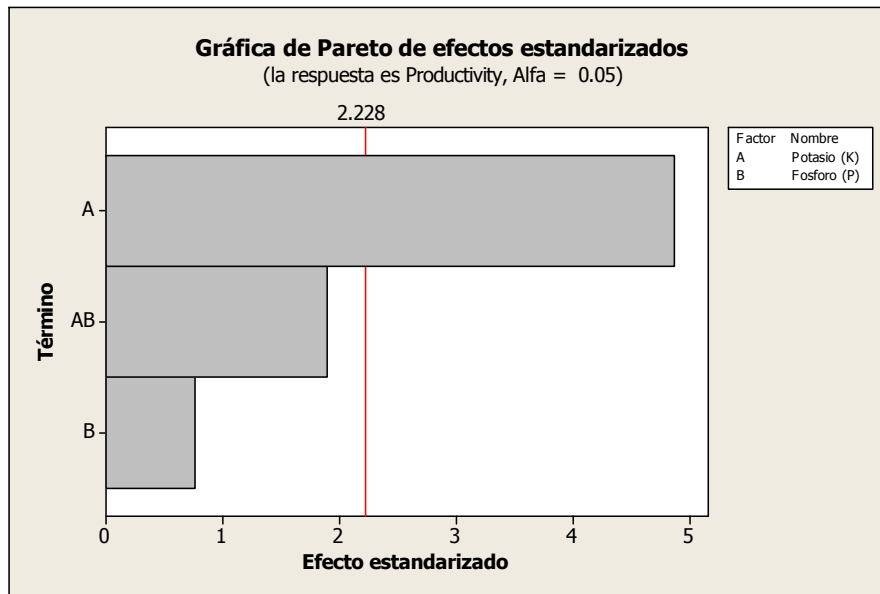


Figura 3-14: Ensayo 2. Gráfica de Pareto para Productividad (g/Lxh) de la fermentación.



Análisis del Rendimiento.

La figura 3-15, de efectos principales, indica que el nivel de potasio (K) tiene efecto positivo sobre el rendimiento de la fermentación de ácido cítrico, es decir que pasar del nivel denominado bajo (208 ppm) al alto (271ppm) ocasiona un incremento de esta variable. Por su parte, el efecto del fósforo es contrario, al pasar de un nivel bajo (329ppm) a alto (430 ppm) el rendimiento se reduce y se favorece la formación de biomasa.

En la interacción K x P (Figura 3-16), se observa que el efecto del nivel del P sobre el rendimiento de la fermentación es independiente del nivel K. La gráfica de Pareto (Figura

3-17) confirma que únicamente el efecto de variar el factor K es estadísticamente significativo.

Figura 3-15: Ensayo 2. Efectos principales para el rendimiento de la fermentación.

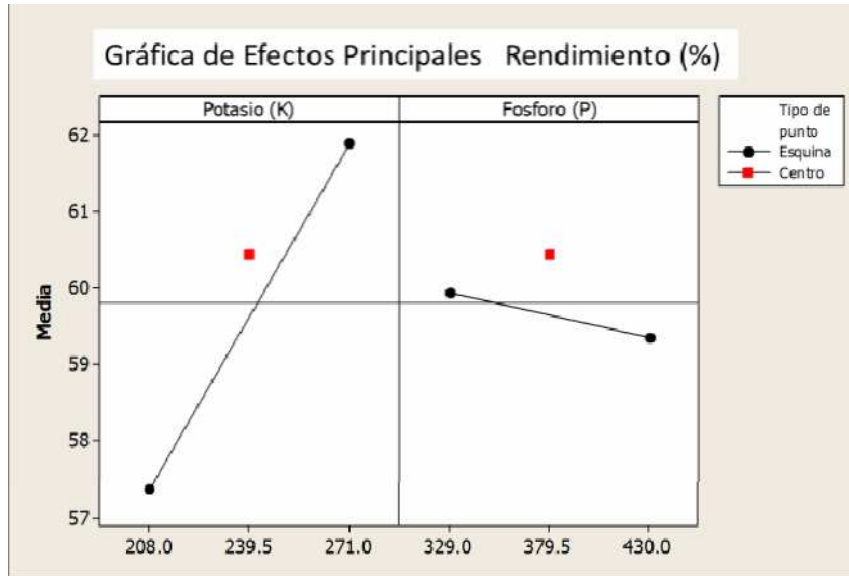


Figura 3-16: Ensayo 2. Interacción para Rendimiento (%) en la fermentación.

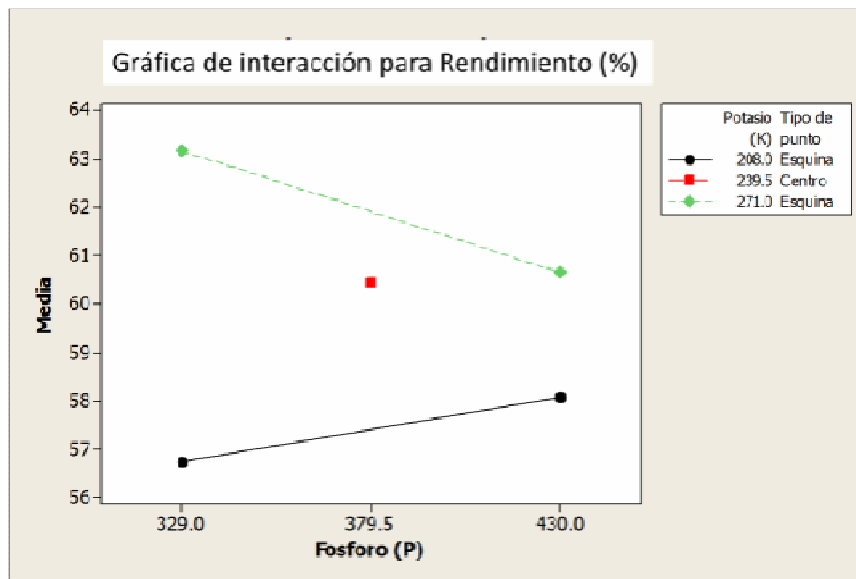
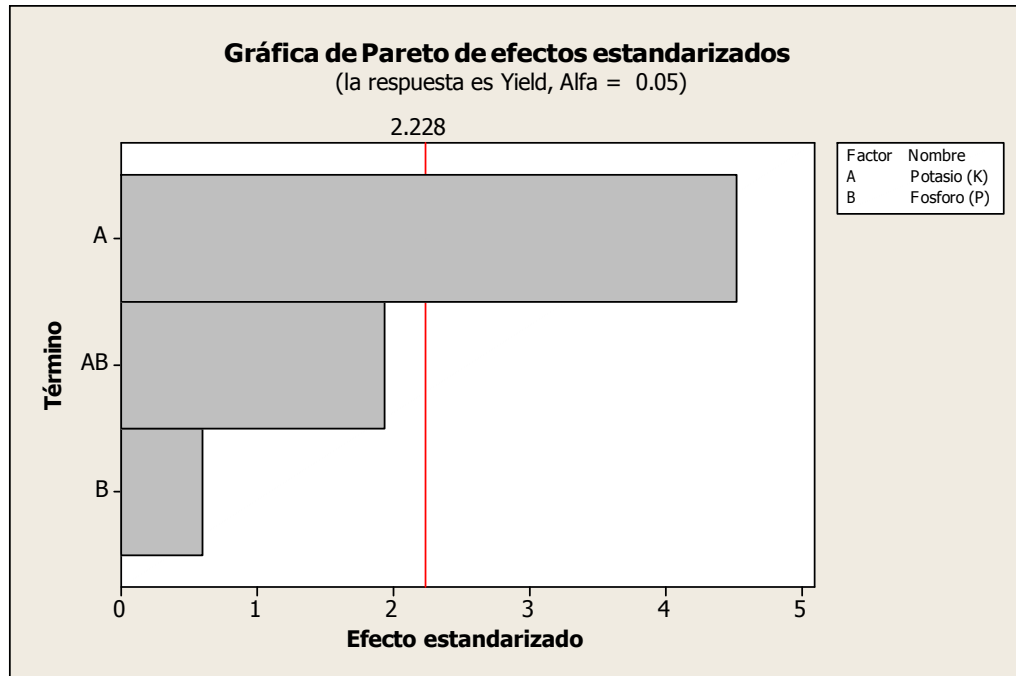


Figura 3-17: Ensayo 2. Gráfica de Pareto para el Rendimiento (%) en la fermentación.



Modelo de Regresión.

A partir de los coeficientes de regresión de superficie de respuesta para las variables de productividad (g/Lxh) y rendimiento (%) obtenidos (Tabla 3-3) y del modelo presentado en la metodología, se obtienen ecuaciones que permiten predecir la respuesta ante variaciones de P y K, dentro del rango de evaluación y para la cepa en estudio.

Tabla 3-3:Ensayo 2. Coeficientes de regresión y nivel de significancia (p) para el modelo de superficie de respuesta.

Término	Productividad(g/L*h)		Rendimiento (%)	
	Coeficiente	p	Coeficiente	p
Constante	1.14633	0.000 ^a	59.6517	0.000 ^a
P	0.00650	0.460	-0.2950	0.567
K	0.04117	0.001 ^a	2.2517	0.001 ^a
P x K	-0.01600	0.088	-0.9650	0.082
Punto central	0.03467	0.097	0.7817	0.499

a. Significante a p ($\alpha \leq 0.05$).

Modelo para estimar la productividad:

$$Y = 1.14633 + (0.04117 \times K) + (0.0065 \times P) - (0.016 \times P \times K) + (0.03467 \times P_{cp} \times K_{cp})$$

$$R^2 = 0.9199$$

Modelo para estimar el rendimiento:

$$Y = 59.65170 - (0.2950 \times P) + (2.2517 \times K) - (0.9650 \times P \times K) + (0.7817 \times P_{cp} \times K_{cp})$$

$$R^2 = 0.5206$$

Los valores estimados utilizando las ecuaciones obtenidas así como los valores experimentales se resumen en la tabla 3-4. La correlación entre los valores experimentales y los estimados es mejor cuando el valor de R se encuentra más cerca de 1. En este experimento, el valor de R fue de 0.9591 y 0.7215 para la productividad y el rendimiento respectivamente. Demostrando alto grado de correlación entre los valores experimentales y estimados para la variable de rendimiento.

El valor de R^2 , coeficiente de determinación, indica que el 91.99% de las variables evaluadas para el caso de la productividad y 51.06% en el caso del rendimiento contribuyen positivamente a la respuesta, también es una medida del ajuste del modelo y se puede decir que el 8.01% de la variación total para la productividad de la fermentación y el 48.94% de la variación total para el rendimiento no se explican con el modelo.

Tabla 3-4: Ensayo2. Productividad (g/L x h) y Rendimiento (%) de la fermentación de ácido cítrico. Valores experimentales vs valores estimados.

P (ppm)	Unidad codificada	K (ppm)	Unidad codificada	Productividad (g/Lxh) Experimental	Productividad (g/Lxh) Estimada ¹	Rendimiento (%) Experimental	Rendimiento (%) Estimado ¹
329	-1	208	-1	1.11	1.08	57.01	56.7
430	1	271	1	1.18	1.18	60.64	60.7
329	-1	271	1	1.20	1.19	63.20	62.2
430	1	208	-1	1.13	1.13	58.10	60.6
380	0	240	0	1.18	1.18	60.43	59.6

Evaluación económica.

La mejor de las formulaciones evaluadas en el ensayo 2, resulta de la combinación de K alto (271ppm) y P bajo (329 ppm). Aunque, como se mencionó anteriormente, sólo la variación del K resultó ser significativo, el incremento obtenido en el rendimiento y productividad de la fermentación de ácido cítrico genera ahorros potenciales importantes.

A partir de los resultados obtenidos con la mejor formulación del ensayo 2 (tratamiento 2), se calcularon los ahorros potenciales con respecto a la formulación estándar para planta piloto (Tabla 3-5).

Tabla 3-5: Ensayo 2. Ahorros potenciales al incrementar el K y reducir el P.

Tratamiento	Rendimiento (%)	Aumento (%)	Ahorros (U\$/año)+	Productividad (g/L*h)	Aumento (%)	Ahorros (U\$/año)+
T2 (K 270-P329ppm)	63.2	8.8	2'480.026	1.20	6.2	3'303.360
T3 (k208-P430ppm)	58.1	----	----	1.13	---	---

T2: Estándar para frascos agitados, T3: Estándar para planta piloto. + Ahorros por azúcar dejada de consumir calculados utilizando un precio promedio 612.15U\$/ton y una base de producción 31044 ton ACA/año. ++Ahorros por cítrico de más producido al año utilizando un precio promedio de venta 1800U\$/ton.

En el ensayo 2 al evaluar otros niveles adicionales de K y P a los evaluados en el ensayo 1, incrementando y/o disminuyéndolos con relación a los utilizados inicialmente, se logra demostrar que el nivel de P de 329 ppm (ensayo 1) es adecuado al igual que el K, tanto para la obtención de los mejores rendimientos y productividad entre las combinaciones evaluadas.

Ensayo 3.

Es de recordar que con este ensayo se busca comprobar si se mantiene la tendencia en los resultados al aumentar el K y reducir el P con respecto a los niveles evaluados en el ensayo 2.

El análisis de varianza (Tabla 3-6) sólo muestra diferencias significativas en productividad y rendimiento de ácido cítrico en el caso del P (p valor < 0.05). Al igual que en los anteriores ensayos se observan coeficientes de variación bajos excepto para el tratamiento 2, lo cual indica adecuado control de las condiciones de ambientales a lo largo del ensayo y de la presente investigación.

Tabla 3-6: Ensayo 3. Análisis de Varianza para la productividad (g/Lxh) y rendimiento (%).

Término	Productividad (g/L*h)			Rendimiento (%)	
	GL	CM	p	CM	p
P	1	0.03339075	0.0165 ^a	80.5490083	0.0224 ^a
K	1	0.00630208	0.2398	15.2100083	0.2681
P x K	1	0.00678100	0.2230	27.1000000	0.1486
Punto Central	1	0.00499290	0.2190	18.9300000	0.2200

a. Significante a p ($\alpha \leq 0.05$).

La ausencia de interacción entre P y K en los niveles evaluados, señala la importancia en la fermentación de cada uno de ellos, en forma independiente. Las gráficas de Pareto (Figura 3-20 y 3-23) corroboran que, en los niveles utilizados, únicamente el P tiene efecto estadísticamente significativo.

En términos generales se observa que la mejor combinación de las evaluadas en este ensayo, fue cuando se incrementa el K de 271 ppm (ensayos 1 y 2) a 300 ppm y el P, de 329 (ensayos 1 y 2) a 380 ppm, combinación en la cual se obtiene la mejor expresión de rendimiento y productividad.

El coeficiente de correlación entre rendimiento (%) y productividad (g/l*h) fue de 0,995 lo cual refleja una elevada asociación de las variables. Dado que el coeficiente de correlación tabulado ($R_t = 0.878$) es menor que el calculado se acepta la H_a de que existe correlación entre las variables.

En los niveles de P y K evaluados en el presente ensayo, la morfología observada es similar a la obtenida en el tratamiento 4 del ensayo 1 y en todos los tratamientos evaluados del ensayo 2.

Análisis de la Productividad.

El análisis de efectos principales (Figura 3-18) indica que el K en los niveles evaluados en este ensayo, ejerce efecto en la productividad pero en sentido opuesto al observado en los ensayos 1 y 2, mientras que en el P se conserva la tendencia.

Aunque el efecto del K no es estadísticamente significativo, se observa que al pasar de un nivel bajo P (280ppm) a uno alto (380ppm) se incrementa la productividad de manera sustancial pasando de 1,193 y 1,098 g/l x h a 1,249 y 1,25 g/l x h para los niveles bajo y alto de potasio, respectivamente, Tabla 3-7.

Tabla 3-7: Resultados promedio y coeficientes de variación del Ensayo 3.

Tratamiento	Rendimiento (%)		Productividad (g/L*h)	
	Media	CV (%)	Media	CV (%)
1 (K 240ppm - P 280ppm)	62.20	2.1	1.193	1.7
2 (K 300ppm - P 280ppm)	56.95	12.6	1.098	12.0
3 (K 240ppm - P 380ppm)	64.38	1.9	1.249	1.9
4 (K 300ppm - P 380ppm)	65.14	1.1	1.250	3.2
5 (K 271ppm - P 329ppm)	59.36	0.9	1.151	0.9

A pesar de la intersección de las líneas en la interacción P x K, se observa en el análisis de varianza que ésta no es estadísticamente significativa (Figura 3-19). En este ensayo, en los niveles utilizados de los dos nutrientes, el efecto del P sobre la productividad es independiente de los niveles de K.

Figura 3-18: Ensayo 3.Efectos principales para la Productividad (g/L*h) de la fermentación.

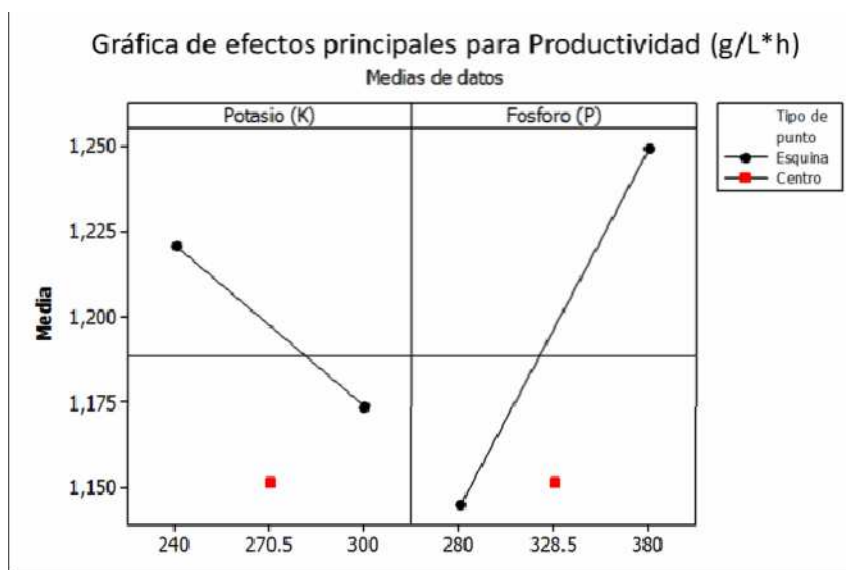


Figura 3-19: Ensayo 3. Interacción para la Productividad (g/L*h) de la fermentación.

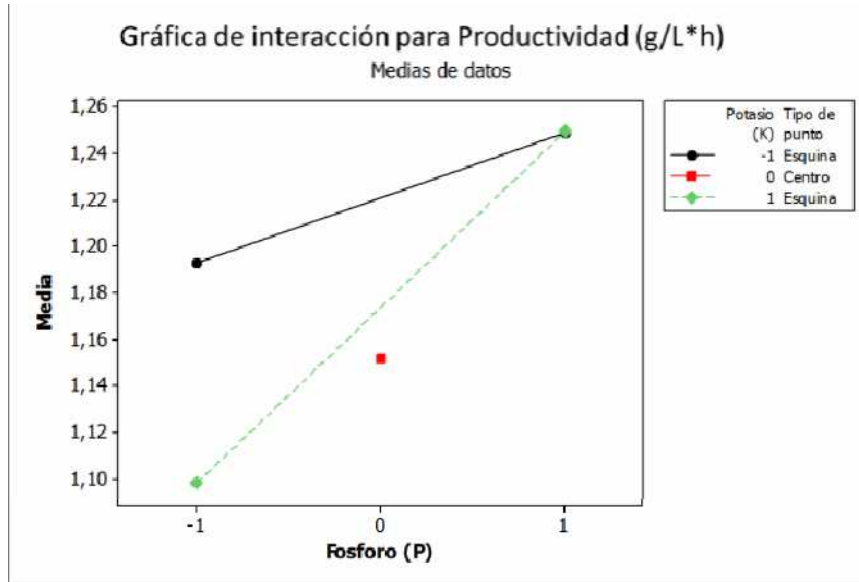
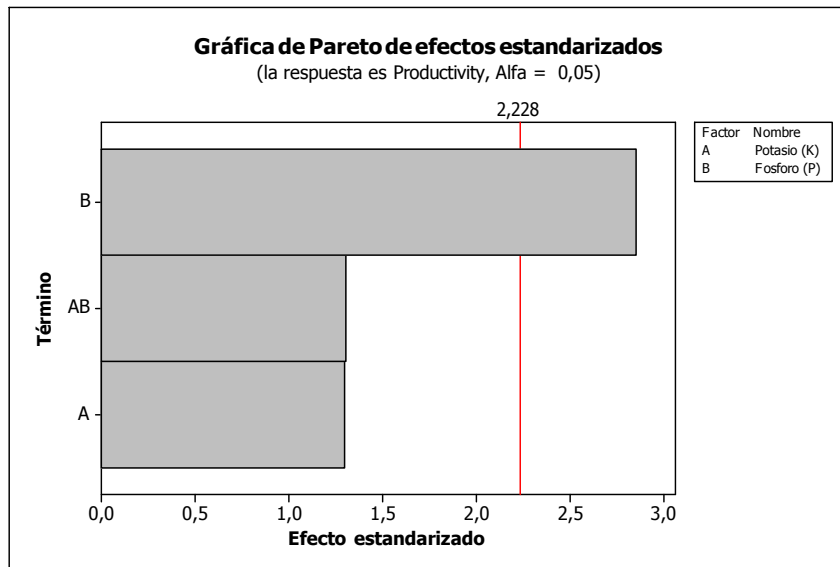


Figura 3-20: Ensayo 3. Gráfico de Pareto para la Productividad (g/L*h) de la fermentación.



Análisis de rendimiento.

La gráfica de efectos principales indica que tanto el nivel de potasio (K) como el de fósforo (P) ejercen efecto sobre el rendimiento de la fermentación; sin embargo el efecto presentado es en sentido contrario (Figura 3-21).

Aunque el efecto del potasio (K) no es significativo, se observa que al pasar del nivel bajo al alto de fósforo se incrementa el rendimiento en 3.5 y 14.4% respectivamente para los niveles bajo y alto de potasio lo cual representa ahorros significativos como se presenta en el literal 3.3.4.

En la gráfica de interacción K x P (Figura 3-22) se observa que el efecto del fósforo (P) sobre el rendimiento es independiente de los niveles que se tengan de potasio, obteniéndose mejores resultados, es decir mayor rendimiento en la fermentación de ácido cítrico cuando el fósforo se encuentra en un nivel alto. Aunque se observa intersección de las dos líneas, lo que indica que hay interacción, ésta no es estadísticamente significativa.

Figura 3-21: Ensayo 3.Efectos principales para el Rendimiento (%) de la fermentación.

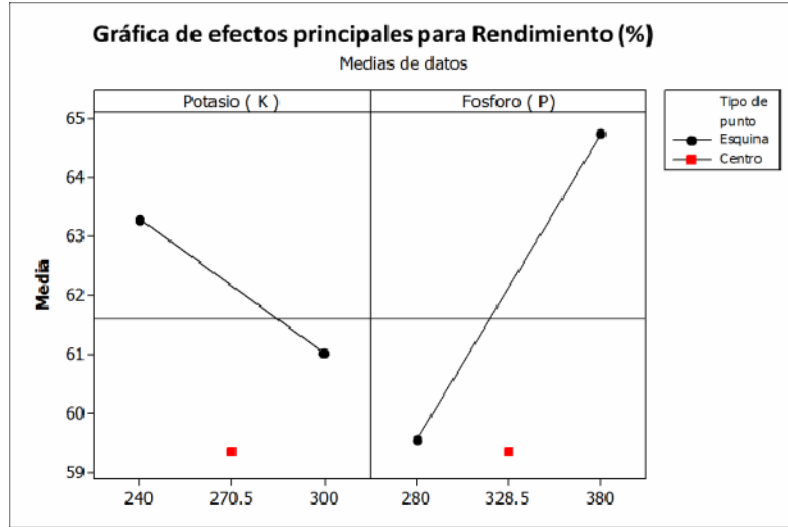


Figura 3-22: Ensayo 3.Interacción para el Rendimiento (%) de la fermentación.

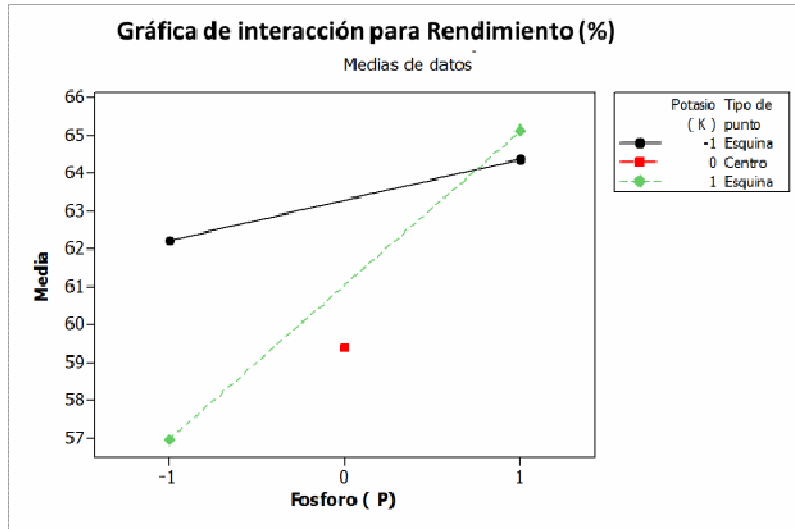
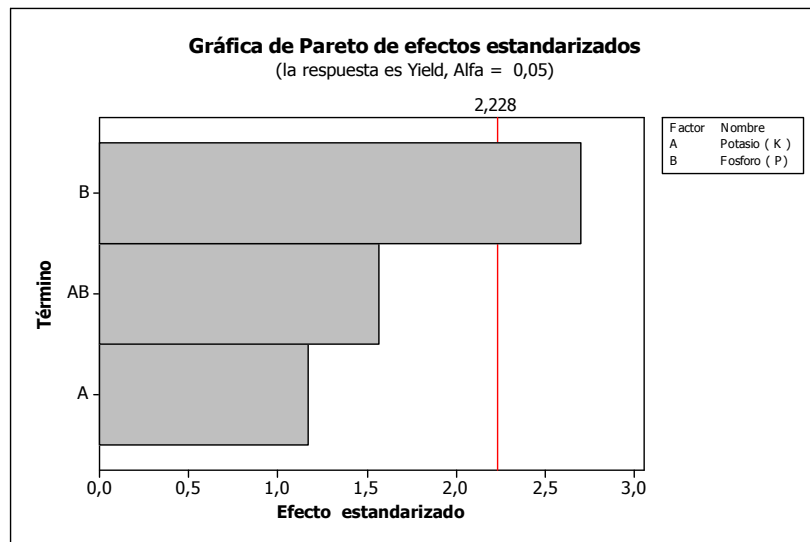


Figura 3-23: Ensayo 3.Gráfico de Pareto para el Rendimiento (%) de la fermentación.



Modelo de Regresión.

A partir de los coeficientes de regresión estimados para productividad (g/lxh) y rendimiento (%) de la fermentación (Tabla 3-8) y del modelo presentado en la metodología se obtienen ecuaciones que permiten estimar las variables de respuesta ante variaciones en el P y K dentro del rango en evaluación y para la cepa en estudio.

Tabla 3-8: Ensayo 3. Coeficientes de regresión y nivel de significancia (p) para el modelo de superficie de respuesta.

Término	Productividad (g/L*h)		Rendimiento (%)	
	Coeficiente	p	Coeficiente	p
Constante	1.19752	0.000 ^a	62.168	0.000 ^a
P	0.05200	0.017 ^a	2.591	0.022 ^a
K	- 0.02361	0.226	- 1.126	0.269
P x K	0.02377	0.223	1.503	0.149
Punto Central	- 0.04561	0.291	- 2.809	0.220

a. Significante a p ($\alpha \leq 0.05$).

Modelo para estimar la productividad:

$$Y = 1.19752 + (0.052 \times P) - (0.02361 \times K) + (0.02377 \times P \times K) - (0.04561 \times P_{pc} \times K_{pc})$$

$$R^2 = 0.8845$$

Modelo para estimar el rendimiento:

$$Y = 62.168 + (2.591 \times P) - (1.125 \times K) + (1.503 \times P \times K) - (2.809 \times P_{pc} \times K_{pc})$$

$$R^2 = 0.8433$$

Los valores estimados utilizando las ecuaciones obtenidas así como los valores experimentales se resumen en la tabla 3-9. La correlación entre los valores experimentales y los estimados es mejor cuando el valor de R se encuentra más cerca de 1. En este experimento, el valor de R fue de 0.94 y 0.92 para la productividad y el rendimiento respectivamente. Demostrando alto grado de correlación entre los valores experimentales y estimados para ambas variables de respuesta.

El valor de R^2 , coeficiente de determinación, indica que el 88.45% de las variables evaluadas para el caso de la productividad y 84.33% en el caso del rendimiento contribuyen positivamente a la respuesta, también es una medida del ajuste del modelo y se puede decir que el 11.55% de la variación total obtenida para la productividad de la fermentación y el 15.67% de la variación total para el rendimiento no se explican con el modelo.

Tabla 3-9: Ensayo 3. Productividad (g/Lxh) y rendimiento (%) de la fermentación de ácido cítrico. Valores experimentales vs valores estimados.

P (ppm)	Unidad codificada	K (ppm)	Unidad codificada	Productividad (g/Lxh) Experimental	Productividad (g/Lxh) Estimado ¹	Rendimiento (%) Experimental	Rendimiento (%) Estimado ¹
280	-1	240	-1	1.193	1.1929	62.20	62.205
380	1	300	1	1.250	1.2497	65.14	65.139
280	-1	300	1	1.098	1.0981	56.95	56.945
380	1	300	-1	1.249	1.2490	64.38	64.38
329	0	271	0	1.151	1.19752	59.36	62.168

Evaluación económica

La mejor de las formulaciones evaluadas, resultó ser la combinación de K alto y P alto que en este caso corresponden a concentraciones de 300 y 380 ppm respectivamente, lo que no está acorde con la hipótesis propuesta de que al aumentar el potasio y reducir el fósforo con respecto a la formulación de base, los resultados mejoran.

A partir de los resultados obtenidos con la mejor formulación, se calcularon los ahorros potenciales por incremento en rendimiento y productividad con respecto a la mejor formulación obtenida en el ensayo 2, que en el ensayo actual corresponde a la formulación o tratamiento 5.

Tabla 3-10: Ahorros potenciales por mejorar el rendimiento y productividad de la fermentación con la mejor combinación del Ensayo 3 y la mejor del Ensayo 2.

Tratamiento	Rendimiento (%)	Incremento (%)	Ahorros (U\$/año)+	Productividad (g/L*h)	Incremento (%)	Ahorros (U\$/año)++
T4 (K 300- P 380 ppm)	65.14	9.7	2'736.581	1.250	8.6	4'577.780
T5 (K270-P 329ppm)	59.36	---	---	1.151	---	---

T4: Mejor tratamiento en ensayo 3. T5: Mejor tratamiento en ensayo 2 (T2 en Ensayo 2 y T5 en Ensayo 3). +Ahorros por azúcar que se dejó de consumir calculados utilizando un precio promedio de 612.15U\$/ton azúcar y una base de producción de ácido cítrico de 31044 ton ACA/año. ++Ahorros por cítrico de más producido al año utilizando un precio promedio de venta 1800U\$/ton.

Los ahorros potenciales obtenidos con la mejor formulación evaluada y la cepa en estudio en el presente ensayo como en el ensayo 2, están acorde con lo reportado por Parekh *et al*, 2000, quienes explican las razones y los beneficios de mejorar las cepas. Ellos mencionan que la economía de las fermentaciones se maneja a través de las ganancias del producto en el mercado, donde el costo por unidad de producto es un factor clave.

Doran (1995), registró también que a través de los mejoramientos en el diseño de los fermentadores puede generar una reducción de los costos de fermentación, manufactura, y costos de capital; sin embargo, Stanbury *et al*, en el mismo año, aseguraron que los mejoramientos en las cepas ofrecen la mejor oportunidad de reducción de costos sin inversión de capital. Esto se logra cuando una cepa, puede

sintetizar una mayor proporción de producto utilizando la misma cantidad de sustrato; es decir mejorando el rendimiento de la cepa, o cuando la cepa es capaz de producir la misma o mayor cantidad de producto en menos tiempo (mejorando la productividad). Otra alternativa, se presenta cuándo se encuentran cepas que pueden utilizar de manera eficiente y productiva sustratos o desechos mucho menos costosos que los sustratos tradicionales.

Comparación de resultados con otras investigaciones.

Los resultados obtenidos en la presente investigación son válidos para hacer más rentable el proceso en términos de rendimiento y productividad que se espera, se expresen en últimas en las condiciones económicas concomitantes, dentro de las condiciones tecnológicas y ambientales en las cuales fue planteada.

Entre los factores que han sido estudiados como fundamentales para los resultados que se obtienen, algunos se relacionan con condiciones de obtención y de cultivo como: procedencia de cepas, tratamiento al cual han sido sometidos, medios de cultivo utilizados, entre otros.

Como referente de lo afirmado, a continuación se presenta un ejemplo de estudios de fermentación de ácido cítrico utilizando diferentes cepas de *A. niger* con sacarosa o sustratos compuestos por las mismas unidades monoméricas.

En la tabla 3-11 se presenta una comparación de los resultados de la presente investigación con los registrados por Lofty *et al.*, 2007, quienes usaron una cepa de *Aspergillus niger* silvestre directamente aislada del suelo y cepas derivadas obtenidas por

mutación con luz UV. Esta metodología fue utilizada para la obtención de la cepa utilizada en estudio y su parental, la cual ha sido mejorada por más de 45 años.

Tabla 3-11: Comparación de condiciones en la presente investigación y usadas por Lofty *et al*, 2007.

Cepa	Sustrato	Formulación	Tiempo (h)	Agitación (rpm)	Temperatura (°C)
<i>Aspergillus niger</i> UMIP2564*	Melaza 160g/L	Medio basal (Khan <i>et al</i> , 1970)	152	300	30
W5 Mutante derivado UMIP2564*					
<i>Aspergillus niger</i> **	Sacarosa 250g/L	Descrito en literal 6.1.3.3.	144	225	34,5

*Aislamiento silvestre de suelo en Egipto y Mutante derivado (Lofty *et al*, 2007). **Cepa en estudio, mejorada por más de 45 años. Mejor formulación de la presente investigación tratamiento 4 del ensayo 3.

Se observa en los resultados (Tabla 3-12) cómo la cepa utilizada en el presente estudio obtiene mayor producción de ácido cítrico (+78,7%), mayor rendimiento y productividad (+8.6 y +89% respectivamente), que la mejor cepa obtenida y reportada por Lofty *et al.*, 2007.

Tabla 3-12: Comparación de resultados obtenidos en la presente investigación y por Lofty *et al.*, 2007.

Cepa	Acido cítrico (g/L)	Rendimiento (%)	Productividad (g/L*h)
<i>Aspergillus niger</i> UMIP2564*	30	19	0.197
W5Mutante derivado UMIP2564	100	60	0.659
<i>Aspergillus niger</i> A**	178,7	65.2	1.250

*Aislamiento silvestre de suelo en Egipto y Mutante derivado (Lofty *et al.*, 2007). **Cepa en estudio, mejorada por más de 45 años. Mejor formulación de la presente investigación tratamiento 4 del ensayo 3.

Como se puede observar en la Tabla 3-11 hay diferencias tanto en el tipo como en la concentración de sustrato y algunas condiciones de fermentación. Existen registros en los cuales se presentan el efecto negativo sobre el rendimiento de la fermentación, debido a iones metálicos contenidos en las melazas, sustrato utilizado por Lofty *et al.*, una razón que podría explicar las diferencias observadas con respecto a los resultados obtenidos en esta investigación (Yigitoglu, 1992).

Peksel y Kubicek, en 2003, estudiaron el efecto de la concentración de sacarosa durante la acumulación de ácido cítrico por *Aspergillus niger* ATCC11414, cepa de colección que no ha sido objeto de mejoramiento. Los mejores resultados, 10.7% y 16% en rendimiento, 0.21 y 0.22g/Lxh en productividad los obtuvieron con las más altas concentraciones de sacarosa 140 y 100g/L respectivamente, lo cual se explica por la presencia de más sustrato disponible. Sin embargo, estos resultados son muy bajos en comparación con los obtenidos en la presente investigación (rendimiento 56%-66% y productividad 1.0-1.3 g/l x h).

Papagianni (2007), ha enfatizado en la dificultad de lograr una comparación de datos, debido a diferentes situaciones: condiciones subóptimas, cepas de colección de baja

producción en comparación con cepas industriales, lo cual no refleja la realidad de la fermentación industrial. A estos factores, se suma el hecho de que las industrias no están interesadas en publicar sus resultados por un lado por considerarlo *Know How* y adicionalmente, como estrategia de competitividad.

Aunque existen innumerables estudios científicos recientes, éstos se enfocan en la utilización de sustratos alternativos a la sacarosa, considerada la fuente de carbono preferencial para el hongo *Aspergillus niger*, como por ejemplo, diversos residuos agroindustriales y glicerol subproducto de la producción de biodiesel. Adicionalmente, en algunos casos, usan otros microorganismos como la levadura *Yarrowia lipolytica*, se acude a la fermentación en estado sólido en vez de fermentación sumergida, bioreactores agitados en vez de frascos agitados, entre otros (Kim *et al.*, 2006, Nielsen J. y Jongh de W.A. 2007, Imandi *et al.*, 2007, Levinson *et al.*, 2007, Imandi *et al.*, 2008 y Niamul *et al.*, 2009).

Nielsen *et al.*, 2008, publicaron resultados de producción de cepas derivadas *Aspergillus niger* A742 con incrementada producción de cítrico, lograda por inserción de genes que codifican para *malato deshidrogenasa*, *fumarasas* y *fumarato reductasas*, las cuales se compararon con la cepa silvestre *A. niger* N402.

La producción fue evaluada en bioreactores agitados de 5L y utilizando como sustrato glucosa a 50g/L, agitación de 150-500rpm y un pH de 5. La cepa mejorada más eficiente generó una concentración de 20g/L de ácido cítrico y 5g/L de ácido oxálico con glucosa residual de 10g/L en 204h de fermentación, comparado con la cepa silvestre que no produjo cítrico en estas condiciones.

Experiencias en el proceso han mostrado que el ácido oxálico es un subproducto indeseable, que se obtiene cuando la fermentación se inicia a pH elevados. Su producción, genera una reducción en el rendimiento en ácido cítrico. Tanto la cepa

utilizada en esta investigación como su parental no producen ácido oxálico (oxálico negativo) aún en pH elevados, característica resultante de un programa de mejoramiento que tiene impacto positivo en el rendimiento en ácido cítrico (experiencias de la autora, 2012).

Nielsen *et al.*, 2008, también evaluaron la producción de ácido cítrico en frascos agitados con 100g/L de glucosa, obteniendo 7g/L en 60h vs 4.5g/L de la cepa silvestre, resultados bajos si se comparan con los encontrados en la presente investigación de 178,7g/L en 143h con una concentración de sacarosa de 250g/L.

Yigitoglu (1992) ha señalado que el mejoramiento de cepas por mutación para lograr altos rendimientos, es un objetivo continuo en la procesos industriales y su importancia ha sido ampliamente demostrada en microorganismos cómo *Penicillium chrysogenum* para la producción de antibióticos, pero que, en forma inexplicable pocos trabajos han sido publicados para la producción de ácido cítrico, probablemente porque como se había dicho anteriormente, las compañías quieren guardar en secreto sus métodos más exitosos.

Aunque la mutación constituye un acercamiento que puede resultar en cambios inesperados, es una herramienta que ha demostrado ser exitosa y esa es la razón para que se continúe utilizando aún en la era de biotecnología de punta, la cual hacia el futuro inmediato puede generar respuestas complementarias para su utilización.

La tendencia actual en el mundo, es utilizar estrategias combinadas de técnicas clásicas, moleculares y de ingeniería bioquímica con el objetivo de obtener un efecto sinérgico en los procesos de mejoramiento (Bailey, 1998).

Existen múltiples investigaciones de optimización de la formulación de nutrientes para la fermentación de ácido cítrico los cuales en su mayoría están enfocados al uso de sub-productos o residuos agroindustriales que constituyen sustratos menos costosos en los cuales se han utilizados metodologías similares y /o comunes a las utilizadas en la presente investigación.

Kim *et al.*, 2006, optimización la concentración de glucosa y de nutrientes como nitrógeno, fósforo y cloruro de sodio para la producción de ácido cítrico por fermentación en estado sólido utilizando una cepa de *A. niger* NRRL 567 crecida en turba. Los resultados obtenidos fueron analizados y produjeron una ecuación polinómica de segundo orden que permite predecir la concentración de ácido cítrico en función de las variables evaluadas con un R^2 de 0.99 y 0.97 para 48 y 72h de fermentación. La concentración inicial de glucosa y de N mostraron tener un efecto significativo positivo y negativo en la producción de ácido cítrico respectivamente, mientras que el P tienen un efecto positivo limitado comparado con los resultados de la presente investigación (Ensayo 3) donde el efecto del P mostró ser significativo y positivo. El cloruro de sodio, por su parte, no fue significativo.

Imandi *et al.*, 2007, optimizaron los componentes del medio para la producción de ácido cítrico por fermentación sumergida con una cepa de levadura de *Yarrowia lipolytica* NCIM3589 a partir de glicerol. Las variables estudiadas fueron la concentración de glicerol (20-80g/L), extracto de levadura (0.1-0.5g/L) y cloruro de sodio (10-20g/L). Para analizar los datos utilizaron la metodología de análisis de superficie de respuesta, metodología utilizada en la presente investigación. Obtuvieron una concentración máxima de 77.399 g/l de ácido cítrico con las condiciones óptimas, concentración inferior a la registrada en el curso de este estudio.

Imandi *et al.*, 2008, optimizaron los componentes del medio para la producción de ácido cítrico en estado sólido, a partir de residuos de piña utilizando y con una cepa de levadura *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. Las variables extracto de levadura, contenido

de humedad, KH_2PO_4 y Na_2HPO_4 fueron identificadas como las que más influyen la producción de cítrico presentándose interacción significativa entre ellas y fueron por lo tanto subsecuentemente optimizadas.

Se deben incluir tantos capítulos como se requieran; sin embargo, se recomienda que la tesis o trabajo de investigación tenga un mínimo 3 capítulos y máximo de 6 capítulos (incluyendo las conclusiones).

4. Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

- Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que el P y K son nutrientes fundamentales y determinantes para el rendimiento y productividad de la fermentación de ácido cítrico, así como para la producción de biomasa y expresión morfológica conveniente de la cepa de *Aspergillus niger* utilizada en estos ensayos.
- La presencia de P y K en niveles adecuados dentro de una formulación de base, está asociada con la formación de la biomasa necesaria y de una morfología fúngica adecuada para este proceso fermentativo, constituida por pellets compactos con hifas cortas que tiene ventajas en la reología del medio permitiendo la adecuada aireación, transferencia de oxígeno y mezcla completa del cultivo.
- En los ensayos 1 y 2 hubo coincidencia en los niveles de K y P (271 ppm y 329 ppm, respectivamente) que propiciaron el mejor rendimiento y productividad en el proceso de fermentación. Sin embargo, en el ensayo 3 el incremento en K a 300ppm y en P a 380ppm bajo las mismas condiciones y en presencia de una formulación de base, ocasionó aumentos significativos en el rendimiento y productividad que representan ahorros potenciales de alrededor de 7'313.000 U\$ / año. La morfología de los pellets y biomasa fúngica se mantuvo similar en estos niveles de nutrientes.
-
-

-
-
- A partir de los resultados obtenidos en los ensayos 2 y 3 se obtuvo un modelo de regresión de superficie de respuesta tanto para el rendimiento como para la productividad de la fermentación de ácido cítrico que permite predecir resultados dentro del rango de evaluación. Se presentó buena correlación entre los valores experimentales y los estimados, y se corroboró un adecuado ajuste del modelo a través del coeficiente de determinación indicando que un alto porcentaje de la variación obtenida se explica bien a través del modelo en la mayoría de los casos.

- Las distintas condiciones tecnológicas y ambientales en las cuales se han realizado las investigaciones concordantes con los objetivos del presente trabajo, dificultan la comparación de resultados, como ha sido reconocido por otros autores. Sin embargo, el conocimiento generado en esta investigación es importante económicamente y es una tecnología aplicable para las condiciones establecidas en la industria financiadora de este proyecto.

Recomendaciones

- Se hace importante validar los resultados obtenidos a mayor escala (planta piloto), antes de evaluarlos a nivel industrial, esto con el objeto de garantizar el logro de los resultados y maximizar los ahorros potenciales estimados.
- Para nuevos estudios a escala de frascos agitados se recomienda evaluar todas las combinaciones posibles en el mismo ensayo e incluir combinaciones con valores intermedios.
- La mejor formulación de las evaluadas en la presente investigación, debe validarse para todas las cepas derivadas de la cepa en estudio utilizada en la presente investigación.

A. Anexo: Resultados promedio, coeficientes de variación y de correlación ensayo 1

Tratamiento	Rendimiento (%)		Productividad (g/L*h)		Biomasa (g/L)	
	Media	CV (%)	Media	CV (%)	Media	CV (%)
1 (K 0ppm-P 0ppm)	1.59	3.14	0.003	0	0.6	18
2 (K 271ppm-P 0ppm)	8.4	0.95	0.15	0	1.3	5.4
3 (K 0ppm- P 329ppm)	0.9	8.9	0.02	0	0.8	8.8
4 (K 271ppm-P 329ppm)	67.8	1.55	1.23	2.20	16.6	5.2

Coeficientes de correlación Ensayo 1.

Variables	Coeficiente de correlación R ²
Rendimiento (%) vs Productividad (g/Lxh)	0.9997
Rendimiento (%) vs Biomasa (g/L)	0.9974
Productividad (g/Lxh) vs Biomasa(g/L)	0.9971

B. Anexo: Resultados promedio y coeficientes de variación ensayo 2

Tratamiento	Rendimiento (%)		Productividad (g/L*h)	
	Media	CV (%)	Media	CV (%)
1 (K 208ppm - P 329ppm)	57.0	1.3	1.11	0.9
2 (K 271ppm - P 329ppm)	63.2	4.7	1.20	2.5
3 (K 208ppm - P 430ppm)	58.1	3.3	1.13	2.7
4 (K 271ppm - P 430ppm)	50.6	2.1	1.18	1.7
5 (K 240ppm - P 380ppm)	60.4	2.1	1.18	0.0

Bibliografía

AHMED, S.A., SMITH, J.E. and ANDERSON, J.A. 1972. Mitochondrial activity during citric acid production by *Aspergillus niger*. Trans Br Micol Soc. 59: 51-61.

ABARCA, L. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. Rev. Iberoam. Micol. 17:S79-S84.

ALVAREZ-VAQUEZ, F., GONZALEZ-ALCO, C., and TORRES, N.V. 2000. Metabolism of citric acid production by *Aspergillus niger*: model definition, steady state analysis and constrained optimization of citric acid production rate. Biotechnol. Bioeng. 70:82-108.

ALLAWAY, A.E., and JENNINGS, D.H. 1970. The influence of cations on glucose transport and metabolism by *A. niger*. New Phytologist. 69:581-593.

ANDERSEN, M. R., SALAZAR, M.P, SCHAAP, J.P., VAN DE VONDERVOORT, P.J.I., CULLEY, D., THYKAER, J. et al. 2011. Comparative genomics of citric acid producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme – producing CBS 513.88. Genome Research. 21 (6): 885-897.

BAILEY, J.E. 1998. Mathematical modeling and analysis in biochemical engineering: past accomplishments and future opportunities. Biotechnol Prog 14:8-20.

BETANCOURT, A.L. 2003. Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por fermentación en cultivo líquido. Trabajo dirigido de grado. Universidad Nacional de Colombia. Sede Manizales.

BIZUKOJC, M., and LEDAKOWICZ, S. 2004. The kinetics of simultaneous glucose and fructose uptake and product formation by *Aspergillus niger* in citric acid fermentation. *Process Biochemistry*. 39: 2261-2268.

BLEYER, B. 1924. German Patent 439 729.

BRAUN, S. and VECHT –LIFSHITZ, S.E. 1991. Mycelial morphology and metabolite production. *Trends Biotechnol.* 9:63-8.

BUXTON, F.P., GWYMN, D.I. and DAVIES, R.W. 1985. Transformation of *Aspergillus niger* using the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene*. 37:207-214.

BODDY, L.M., BERGES, T., BARREAU, C., VAINSTAIN, M.H., JOBSON, M.J., BALANCE, D.J., and PEBERDY, J.F. 1993. Purification and characterization of an *Aspergillus niger* invertase and its DNA sequence. *Current Genetics*. 24:60-66.

CHRISTENSEN, B. and NIELSEN, J. 1999. Isotopomer analysis using GC-MS. *Mateb Eng.* 1: 282-290.

CRUEGER, W. and **CRUEGER**, A. 1989. Biotechnology: A textbook of industrial Microbiology Second Edition. Ed Thomas D. Brock p134.

CCM International Market research report, 2006.

DAI, Z., **MAO**, X., **MAGNUSON**, J.K. and **LASURE**, L. 2004. Identification of genes associated with morphology in *Aspergillus niger* by using suppression subtractive hybridization. Applied and environmental Microbiology. Volume 70, 4:2474-2485.

DAVIDOW, L.S., **APOSTOLAKOS**, D., **O'DONNELL**, M.M., **PROCTOR**, A.R., **OGRYDZIAK**, D.M. and **WING**, R.A. 1985. Integrative transformation of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Current genetics. 10: 39-48.

DORAN, P. 1995. Reactor engineering. Bioprocess engineering principles. Academic press London. 333-391.

EVANS, C.T, **SCRAGG** A.H. and **RATLEDGE**, C. 1983. A comparative study of citrate efflux from mitochondria of oleaginous and non oleaginous yeasts. Eur J Biochem. 130: 195- 204.

FLIPPHI, M., **SUN**, J., **ROBELLET**, X., **KARAFFA**, L., **FEKETE**, E. **ZENG**, A.P. and **KUBICEK**, P.C. 2009. Biodiversity and evolution of primary carbon metabolism in *Aspergillus nidulans* and other *Aspergillus* spp. Fungal genetics and biology. 46: 519-544.

GÓMEZ, A.L. 2004. Mejoramiento de cepas para la producción industrial de ácido cítrico. Monografía. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.

HESSE, S.J.A., RUIJTER, G.J.G., DIJKEMA, C. and VISSER, J. 2002. Intracellular pH homeostasis in the filamentous fungi *Aspergillus niger*. Eur. Journal Biochemistry. 269: 3485-3494.

HONOKER, S., BISPING, B., YANG, Z., and REHM, H.J. 1989. Influence of sucrose concentration and phosphate limitation on citric acid production by immobilized cells of *Aspergillus niger*. Appl Microbiol Biotechnol. 31: 17-24.

IKRAM, H., Ali, S., QADEER, M.A. and IGBAL. 2004. Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from canne molasses. Bioresources Technol. 93 (2); 125-30.

IMANDI, S.B., BANDARU, V.V.R., SOMALANKA, S.R., and GARAPATI, H. R. 2007. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from glycerol using Doehlert experimental design. Enzyme and Microbial Technology. 40: 1367-1372.

IMANDI, S.B., BANDARU, V.V.R., SOMALANKA, S.R., GARAPATI, H. R. and BANDARU, S.R. 2008. Application of statistical experimental designs for the optimization of medium constituents for the production of citric acid from pineapple waste. Bioresource Technology. 99: 4445 – 4450.

JERNEJC, K., PERDIH, A. and CIMERMAN, A. 1992. Biochemical composition of *Aspergillus niger* mycelium grown in citric acid productive and non productive conditions. J Biotechnol. 25: 341-8.

JIN WOO KIM. 2004. Optimization of citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL567 in various fermentation systems Biosystems engineering Mac Donald campus Quebec Canada.

JIANLONG, W. and **PING, L.** 1998. Phytate as a stimulator of citric acid production by *Aspergillus niger*. Proc Biochem. 33: 313-316.

JONGH de W.A. and **NIELSEN, J.** 2008. Enhanced citrate production through gene insertion in *Aspergillus niger*. Metabolic engineering. 10: 87-96.

KANTZ, D., **GOLDSTEIN, D.** and **ROSENBERGGER, R.F.** 1972. Model for branch initiation in *Aspergillus nidulans* based on measurements of growth parameters. J. bacteriolo. 109: 1097-1100.

KARAFFA, L. and **KUBICECK, P.C.** 2003. *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box? Applied Microbiolo. Biotechnol. 61: 189-196.

KELLY, W. 1988. Biotechnology for engineers Biological Systems Processes. p219.

KELLY, J.M. and **HYE, M.J.** 1985. Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. EMBO Journal. 4: 475-479.

KHAN, M.A.A., HASSAIN, M.M., KHALIQUE, M.A. and RAHMAN, M.A. 1970. Studies on methods of citric acid fermentation from molasses by *Aspergillus niger*. Pak J Sci. Ind. 13: 439-444.

KIM, J.W., BARRINGTON, S. and SHEPPARD, B. 2006. Nutrient optimization for the production of citric acid by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown on peat moss enriched with glucose. Process biochemistry. 41 :1253-1260.

KISSER, M., KUBICEK, C.P., ROHR, M. 1980. Influence of manganese and cell wall composition of *Aspergillus niger* during citric acid fermentation. Arch. Microbiol. 128: 26-33.

KRISTIANSEN, B., MATTEY, M. and LINDEN, J. 2002. Citric Acid Biotechnology. Taylor and Francis ed. 152p.

KUBICEK, C.P. and ROHR, M. 1989. Citric acid Fermentation. Cri Rev Biotechnol. 4 : 331-373.

KUBICEK, C.P., SCHREFERL-KUNAR, G., WOHRER, W. and ROHR, M. 1988. Evidence for a cytoplasmatic pathway of oxalate biosynthesis in *Aspergillus niger*. Appl Environ Microbiol. 54: 633-7.

LEVINSON, W.E., KURTZMAN, C.P. and KUO, M.T. 2007. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. Enzyme and Microbial Technology. 41, 292-295.

LOFTY, W.A., GHANEM, M.K. and HELOW, E.R. 2007. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: mutagenesis and cost reduction studies. *Bioresource Technology*. 98: 3464-3469.

LUTZONI, F., KAUFF, F., COX, C.J., McLAUGHLIN, D., CELIO, G., DENTINGER, B., PADAMSEE., M. et al. 2004. Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American journal of botany*. 91 (10): 1446-1480.

MADIGAN, M., MARTINKO, J. and PARKER, J. 2000. *Brock Biology of Microorganisms*. 9th ed. Southern Illinois University Carbondale.

MALVEDA, M.P., JANSHEKAR, H., and INOBUCHI, Y. 2009. Chemical economic Handbook Marketing Research Report SRI consulting.

MARTIN, S.M., STEEL, R., and LENTZ, C.P. 1954. A standard inoculum for citric acid production in submerged culture. *Can J Microbiol* . 1: 150-7.

MATTEY, M. 1992. The production of organic acid. *Crit. Rev. Biotechnol*. 12: 87-132.

MICHEL, F.C., GRULKE, E.A. Jr. and REDDY, C.A. 1992. Determination of the respiration kinetics for mycelial pellets of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and environmental Microbiology*. 58:1740-1745.

MOYER, A.J. 1953. Effect of alcohols on the mycological production of citric acid surface and submerged culture. Nature of the alcohol effect. *Appli. Microbiol.* 1(1): 1-6.

NETIK, A., **TORRES**, N.V., **RIOL**, J.M. and **KUBICEK**, C.P. 1997. Uptake and export of citric acid by *Aspergillus* is reciprocally regulated by manganese ions. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 1326: 287-294.

NIAMUL, M.D., **ALAM**, Z., **MUYIBI**, A.S., **JAMAL**, P. and **AL MAMUN**, A. 2009. Improvement of production of citric acid from oil palm empty fruit bunches: optimization of media by statistical experimental designs. *Bioresource Technology.* 100: 3113-3120.

NIELSEN, J. and **JONGH**, de W.A. 2008. Enhanced citrate production through gene insertion in *Aspergillus niger*. *Metabolic Engineering.* 10: 87-96.

PAPAGIANNI, M. 2007. Review: Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances* 25: 244-263.

PAPAGIANNI, M., **MATTEY**, M., **BEROVIC**, M. and **KRISTIANSEN**, B. 1999a. *Aspergillus niger* morphology and citric acid production in submerged batch fermentation: effect of culture pH, phosphate and Mn levels. *Food Biotechnology.* 37: 165-171.

PAPAGIANNI, M., **MATTEY**, M. and **KRISTIANSEN**, B. 1999b. Hyphal vacuolation and fragmentation in feed batch culture of *Aspergillus niger* and its relation to citric acid production. *Process Biochem.* 35: 359-66.

PAPAGIANNI, M., MATTEY, M., and KRISTIANSEN, B. 1999c. The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* in batch and fed batch culture. *Enzyme microbiology Technology* 25: 710-717.

PAPAGIANNI, M., MATTEY, M. and KRISTIANSEN, B. 1998. Citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* as functions of the mixing intensity in a stirred tank and a tubular loop bioreactor. *Biochem Eng J.* 2: 197-205.

PAPAGIANNI, M. 1995. Morphology and citric acid production of *Aspergillus niger* in submerged fermentation. PhD thesis University of Strathclyde.

PAPAGIANNI, M., MATTEY, M. and KRISTIANSEN, B. 1994. Morphology and citric acid production of *Aspergillus niger* PM1. *Biotechnol letter.* 16: 929-34.

PAREKH, S., VINCI, V.A. and STROBEL, R.J. 2000. Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Applied Microbiology Biotechnology.* 54: 287-301.

PEKSEL, A., and KUBICEK, C. 2003. Effects of sucrose concentration during citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. *Turk Journal of Chemistry.* 27, 581-590.

PEKSEL, A., TORRES, N.V., LIU, J., JUNEAU, G. and KUBICEK, C.P. 2002. ¹³C-NMR analysis of glucose metabolism during citric acid production by *Aspergillus niger*. *Appl. Microb Biotechnol.* 58:157-63.

PEL, J. H., WINDE, H.J., ARCHER, D.B., HOFMAN,G., SHCAAP, P., TURNER, G., VRIES, R.P. et al. 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 523.88. Nature Biotechnology. Volume 25. Number 2.

PINTADO, J., TORRADO, A., GONZALEZ, M.P. and MURADO, M.A. 1998. Optimization of nutrient concentration for citric acid production by solid state culture of *A. niger* on polyurethane foam. Enzyme Micro Technol. 23: 149-156.

RAPER, K.B. y FENNEL, D.I. 1965. The genus *Aspergilli*. New york, Williams & Wilkins.

REHM, H.J., and REE, G. 1983. Biotechnology. Ed. Dellweg.H. Volume 3.

RUBIO, M.C., and MALDONADO, M.C. 1995. Purification and characterization of an *Aspergillus niger* invertase and its DNA sequence. Current Microbiology. 31:80-83.

ROHR, M., KUBICEK, C.P. and KOMINEK, J. 1996. Citric acid. In Rehm H.J., Reed. G (eds) Products of primary metabolism. (Biotechnology, vol 6) Verlag Chemie. Weinheim.

RYWINSKA, A., RYNOWICZ, W., ZARAWSKA, B. y SKRZYPINSKI, A. 2010. Comparison of citric acid production from glycerol and glucose by different strains of *Yarrowia lipolytica*. World J. Microbio. Biotechnol. 20: 1217-1224.

SASSI, G., RUGGERI, B., SPECCHIA,V. and GIANETTO, A. 1991. Citric acid production by *Aspergillus niger* with banana extract. Biores. Technol. 37: 259-269.

SEPHARD, M. W. 1963. US Patent 3 083 144.

SEREZAWA, N., HOSOBUCHI, M. and YOSHIKAWA, H. 1997. Biochemical and fermentation technological approaches to production of pravastatin a HMG-CoA reductase inhibitor. *Drugs Pharmaceutical Sciences*. Marcel Dekker, New York. 119-804.

SHU, P. and JOHNSON, M.J. 1948a. J Bacteriol Citric acid production by submerged fermentation with *Aspergillus niger*. *Ind. Eng. Chem.* 40:1202-1205.

SHU, P. and JOHNSON, M.J. 1948b. The interdependence of medium constituents in citric acid production by submerged fermentation. *J. Bacteriol.* 54: 161-167.

SOCOL, C.R., VANDERBERGHE, L.P.S., RODRIGUES, C. and PANDEY, A. 2006. New perspectives for citric acid production and applications. *Food technol biotechnol.* 44: 141-149.

STRYER, L. 1995. *Bioquímica*. 4 ta edición. Editorial Reverté.

SCHWEIGER, L.B. and SNELL, R.L. 1951. Citric acid by fermentation. British Patent 653, 808. *Chem Abstract.* 45: 8719a.

SANBURY, P.F., WHITAKER, A. and HALL, S.J. 1995. *Fermentation economics. Principles of fermentation technology.* 2nd ed. Pergamon press. Oxford. pp331-341.

SZUCS, J. 1944. Us Patent 2 353 771.

TAKAHASHI, J., YAMADA, K. and ASAI, T. 1958. Studies on the effect of some physical conditions on the submerged mold culture. Part II. The process of pellet formation of *Aspergillus niger* under the shaking culture, and the effect of inoculation size on the shape of the pellet. J Agri Chem Society. 32: 501-6.

TOMLINSON, N., CAMPBELL, J.J.R. and TRUSSELL, J. 1950. Bacteriology. 59, 217.

TORRES, N. 1994a. Modelling approach to control of carbohydrate metabolism during citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. I. Model definition and stability of the steady state. Biotechnol Bioeng 44: 104-111.

TORRES, N., RIOL - CIMAS, J. M., WOLSSCHEK, M. and KUBICEK, C.P. 1996a. Glucose transport by *Aspergillus niger*: the low affinity carrier is only formed during growth on high glucose concentrations. Appl Microbiol Bioechnol. 44:790-794.

TSEKOVA, A., DENTCHEV, D. and TODOROVA. 2000. Effect of cadmium and copper on the production of the citric acid by *A. niger*. Folia Microbiol. 45(4): 331-334.

WAKSMAN, S.A. and KAROW. 1946. E.O. US patent 2 394 031.

WEN, Z.Y. y **CHEN, F.** 2001. Application of statistically –based experimental designs for the optimization of eicosapentaenoic acid production by the Diatom *Nitzschia laevis*. *Biotechnol. Bioeng.* 75: 159-169.

XU, B.D., MADRIT, C., ROHR, M. and KUBICEK, C.P. 1989. The influence of type and concentration of carbon source on the production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 30: 553-8.

YIGITOGU, M. 1992. Production of citric acid by fungi. *Journal of Islamic Academy of Sciences.* 5:2, 100-1061.

http://www.doctorfungus.org/thefunqi/Aspergillus_spp.htm, **2004.**