

Evaluación de la viabilidad para producir
ácido cítrico mediante
la fermentación de
Aspergillus niger salvaje
en una solución azucarada



Biología aplicada en la obtención de ácido cítrico por fermentación de azúcar por parte del moho del género *Aspergillus* de fuente ambiental

Biotechnology Applied to the Production of Citric Acid Through Sugar Fermentation by Aspergillus Mold from an Environmental Source

RESUMEN

El ácido cítrico es una de las materias primas de gran utilidad en la industria de alimentos y en otras industrias que requieran un ácido orgánico. Este compuesto se obtiene en cantidades industriales por medio de fermentación de hidratos de carbono como melazas y otros productos ricos en hidratos de carbono. El presente trabajo tiene la finalidad de obtención de ácido cítrico por medio de fermentación por medio de mohos del género *Aspergillus* aislada de un medio de cultivo de control ambiental.

Luego del aislamiento e identificación del moho del género *Aspergillus* por microscopía óptica, fue inoculado en una solución azucarada que incluye sales de fosfato. Luego de dos meses se esterilizó y filtró el cultivo, se realizaron pruebas de acidez y se separó el ácido carboxílico por métodos clásicos de precipitación y se caracterizó el producto por pruebas orgánicas clásicas, espectroscopia infrarroja y microscopía óptica teniendo un rendimiento de 15%. Este trabajo es el primer trabajo en Tecsup.

Este artículo comprueba la importancia del estudio y análisis del consumo de combustible en relación con el accionamiento mecánico y electrónico del motor diésel modelo C9, mediante el uso de un dinamómetro de pruebas. En conclusión, esta herramienta permite verificar cómo el consumo de combustible guarda relación directa con los diferentes regímenes de velocidad, además de otros parámetros como las temperaturas y presiones del motor.

ABSTRACT

Citric acid is a highly useful raw material in the food industry and other industries requiring an organic acid. This compound is produced on an industrial scale through the fermentation of carbohydrates such as molasses and other carbohydrate-rich products. The present study aims to obtain citric acid through fermentation using Aspergillus molds isolated from an environmental control culture medium.

After isolating and identifying the Aspergillus mold via optical microscopy, it was inoculated into a sugar solution containing phosphate salts. After two months, the culture was sterilized and filtered, acidity tests were performed, and the carboxylic acid was separated using classical precipitation methods. The product was then characterized using classical organic tests, infrared spectroscopy, and optical microscopy, achieving a 15% yield. This study represents the first work of its kind conducted at Tecsup.



Palabras Claves

Melazas, mohos, ácido cítrico, biotecnología.

Key words

Molasses, molds, citric acid, biotechnology.

INTRODUCCIÓN

El ácido cítrico es un aditivo muy usado en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética por sus propiedades conservantes y antioxidantes. La demanda global de este compuesto crece constantemente, generando interés en métodos de producción más eficientes y sostenibles. Tradicionalmente, se ha producido mediante procesos químicos de alto costo y considerable impacto ambiental, lo que ha impulsado la búsqueda de alternativas biotecnológicas para su fabricación.

Carl Scheele fue un químico farmacéutico sueco que a finales del siglo XVIII, descubrió no solo ácido cítrico sino también otros ácidos orgánicos de frutas y bayas, desarrollando técnicas de aislamiento y purificación. (Sverberg G, 2012).

Scheele desarrollo una técnica que le permitió aislar del jugo de limón en 1784 cristales de ácido cítrico. (Di Lorenzo ,2022).

La obtención de ácido cítrico a nivel industrial se inició extrayéndolo del jugo de limón, Esto evidentemente elevaba el precio del ácido cítrico.

En el siglo XIX el botánico alemán Wermer en 1893 encontró la factibilidad de obtener ácido cítrico a través de la fermentación del azúcar que contenían sales inorgánicas. (Lende et al 2021).

En 1917 James Currie y Charles Thom descubrieron que el *Aspergillus niger* fermentaba azúcar produciendo ácido cítrico. A partir de 1923, los laboratorios Pfizer patentó el proceso de fermentación Currie-Thom (Ksiasek, 2024)

Según (Martin E., 1953) comenta que en Hawaii se obtenía ácido cítrico a partir de restos de piña.

Este estudio tiene como objetivo evaluar la viabilidad de producir ácido cítrico mediante la fermentación de *Aspergillus niger* salvaje en una solución azucarada. Específicamente, se busca lo siguiente:

- Identificar las condiciones óptimas de fermentación, incluyendo temperatura y pH.
- Caracterizar el ácido cítrico mediante espectroscopia infrarroja.

FUNDAMENTOS

Los hongos constituyen un grupo diverso de organismos mohos, zetas y levaduras, Se estimó para el 2014, alrededor de 100000 especies de hongos. Los hongos se clasificaron como talofitas en el antiguo sistema de clasificación de Van Tieghem para los vegetales (Vidal, 1938) como organismos vegetales que no realizaban fotosíntesis. La mayoría son microscópicos y terrestres. Parasitan plantas y provocan enfermedades en animales y en humanos (Madigan et al , 2015), invaden alimentos generando descomposición de ellos. Sin embargo, se les emplea en procesos fermentativos industriales muy importantes como en la fabricación del vino, la cerveza, fabricación de salsa de soya, obtención de aminoácidos como el glutamato monosódico empleado como un saborizante, entre otros. Los mohos son quimiorganotrofos es decir por medio de enzimas digieren compuestos complejos

como polisacáridos, son en su mayoría aerobios es decir necesitan presencia de oxígeno. Los hongos en general son pluricelulares y forman verdaderos entramados filamentosos llamados hifas. Las hifas visibles se denomina micelio este presenta ramas aéreas que se les llama conidios que son esporas que realizan la función de reproducción.

Dentro de los mohos la especie *Aspergillus niger* es un moho que contamina alimentos. Crece generando unas masas aterciopeladas oscuras. Estos mohos se emplean en la producción de ácido cítrico.

El *Aspergillus niger* se ha utilizado tradicionalmente en cepas específicas debido a su robusta capacidad para metabolizar sustratos como soluciones azucaradas y convertirlos en ácido cítrico (Martin E, 1953). El ácido cítrico según la nomenclatura IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry (ácido 2-hidroxiopropano -1, 2,3 tricarboxílico) es un ácido alfa hidroxipolicarboxílico que se encuentra en frutas cítricas como el limón, naranja pero también en otras frutas.

Monrroy et al reportaron obtener ácido cítrico por fermentaciones residuos y cascaras de *Musa paradisiaca* (plátano) como una alternativa sostenible de procesamiento de residuos vegetales.

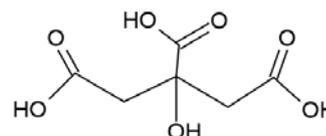


Figura 1. Estructura química del ácido cítrico

Fuente: Elaboración propia

El ácido cítrico que se obtiene hoy en día por fermentación de azúcares como la glucosa .Desde 1930 se iniciaron estudios sobre su biosíntesis en el moho de *Aspergillus*, se sabe que el proceso es a nivel mitocondrial del moho. La fermentación se efectúa la vía de la glucólisis y la vía de las pentosas a nivel mitocondrial donde está presente la enzima citrato sintasa la que cataliza la síntesis de ácido cítrico. Estudios previos destacan la importancia de controlar condiciones de fermentación como pH, temperatura y concentración de nutrientes entre los que destacan algunos cationes como ion Cu^{2+} , Fe^{3+} ; Zn^{2+} ; para maximizar el rendimiento y la pureza del producto final. Además, la genética y capacidad de adaptación de las cepas de *Aspergillus niger* han sido áreas clave de investigación para mejorar la eficiencia y estabilidad de la producción industrial del ácido cítrico.

Este estudio se centra en la fermentación de una solución azucarada mediante *Aspergillus niger* salvaje para obtener ácido cítrico. La investigación parte de la premisa de que las cepas salvajes pueden presentar variabilidad genética, lo que podría mejorar la producción de ácido cítrico en comparación con cepas comerciales. No obstante, se reconocen ciertas limitaciones, como la necesidad de optimizar las condiciones de fermentación para maximizar el rendimiento y mantener la calidad del producto. También es fundamental caracterizar las cepas salvajes y evaluar su estabilidad y capacidad de producción a largo plazo, aspectos críticos que este estudio abordará.

METODOLOGÍA

Se aisló de un medio de cultivo una parte de la colonia de moho para su caracterización. Empleamos la metodología (Frazier, 1992) para el reconocimiento del moho basado en la forma de hifa, color de hifas y del micelio y en la cabeza esporal empleando como instrumento un microscopio óptico.

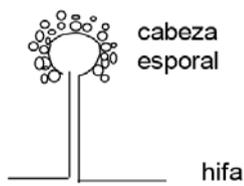


Figura 2. Esquema de un moho de *Aspergillus* partes para su identificación

Fuente: Elaboración propia

Este estudio se realizó con el objetivo de obtener ácido cítrico mediante la fermentación con *Aspergillus niger*. Para ello, se siguieron los siguientes pasos:

1. PREPARACIÓN DE MEDIOS Y SEMBRADO DE PLACAS

Se prepararon placas de cultivo con agar Saboureaud como agente gelificante. Luego, *Aspergillus niger* fue inoculado del ambiente en estas placas y se incubó en condiciones controladas para asegurar un crecimiento óptimo, obteniendo así una cepa salvaje de *Aspergillus*.

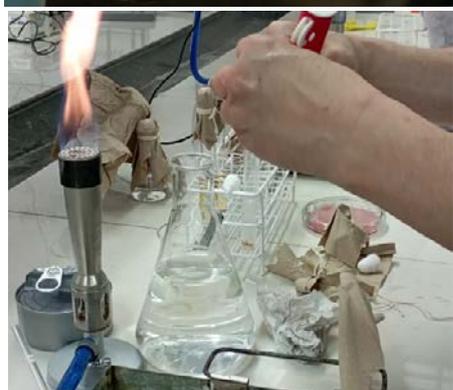
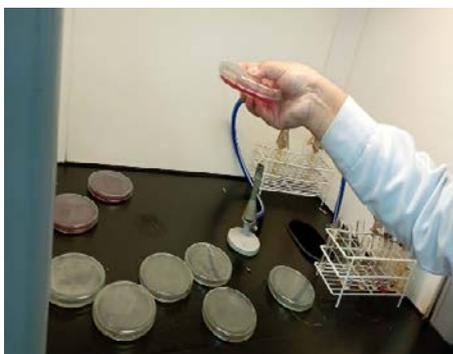


Figura 3. Preparación del agar y vaciado de placas

Fuente: Elaboración propia.



Figura 4. Sembrado de placas del ambiente

Fuente: Elaboración propia.



Figura 5. *Aspergillus* cepa salvaje en la placa

Fuente: Elaboración propia.



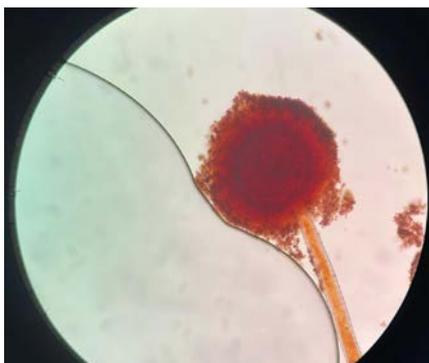


Figura 6. Moho del género *Aspergillus* en el microscopio óptico 400x tinción con solución de Lugol

Fuente: Elaboración propia.

Nota. se observó las hifas y los conidióforos característicos del *Aspergillus niger*.

2. ELABORACIÓN DEL LICOR MEZCLA

Tras 15 días, al obtener colonias adecuadas de *Aspergillus niger*, se procedió a preparar el licor mezcla, utilizando azúcar como principal fuente de carbono.

Este licor mezcla contenía los siguientes componentes:

Tabla 1
Composición del licor madre

Composición	g/L
Sacarosa	140
Nitrato de amonio	2,23
Ortofosfato dipotásico	1
Sulfato de magnesio	0,23
Compuesto de Cu y Fe	

Fuente: Elaboración propia.

Nota. Las concentraciones de estos componentes se ajustaron para maximizar la producción de ácido cítrico.

3. FERMENTACIÓN

El licor mezcla se sometió a fermentación durante dos meses, asegurando la esterilidad del medio se dio permitió el ingreso de aire la para la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger*.



Figura 7. Licor mezcla inoculado con el hongo

Fuente: Elaboración propia.

Nota. Se monitorean cada cuatro días el pH y la temperatura.

4. OBTENCIÓN DEL ÁCIDO CÍTRICO

Al finalizar de la fermentación, el licor mezcla fue llevado a autoclave para ser esterilizado para la extracción del ácido cítrico de *Aspergillus niger*.



Figura 8. Muestra llevada a la autoclave

Fuente: Elaboración propia.

Posteriormente, para precipitar el ácido cítrico, se saturó la solución en ebullición con carbonato de calcio en polvo fino, agitando continuamente y dejando reposar la mezcla varias horas para formar citrato de calcio. Luego, se filtró y se lavó el citrato de calcio repetidamente con agua destilada. Posteriormente, el citrato de calcio se disolvió en ácido sulfúrico 5 M, generando sulfato de calcio insoluble y ácido cítrico en solución. Tras filtrar el sulfato de calcio, la solución de ácido cítrico se enfrió para favorecer la cristalización, y finalmente se obtuvo cristales de ácido cítrico.



Figura 9. Cristales de ácido cítrico formados

Fuente: Elaboración propia.

Nota. La solución se enfrió en una refrigeradora a 5 grados por 12 horas.

RESULTADOS

Se realizó un proceso de fermentación para obtener ácido cítrico, durante el cual la temperatura promedio fue de 19,6 °C.

Asimismo, en todos los experimentos se observó una reducción gradual del pH (Fig. 10), lo que indicó la producción del ácido en base al tiempo en días.

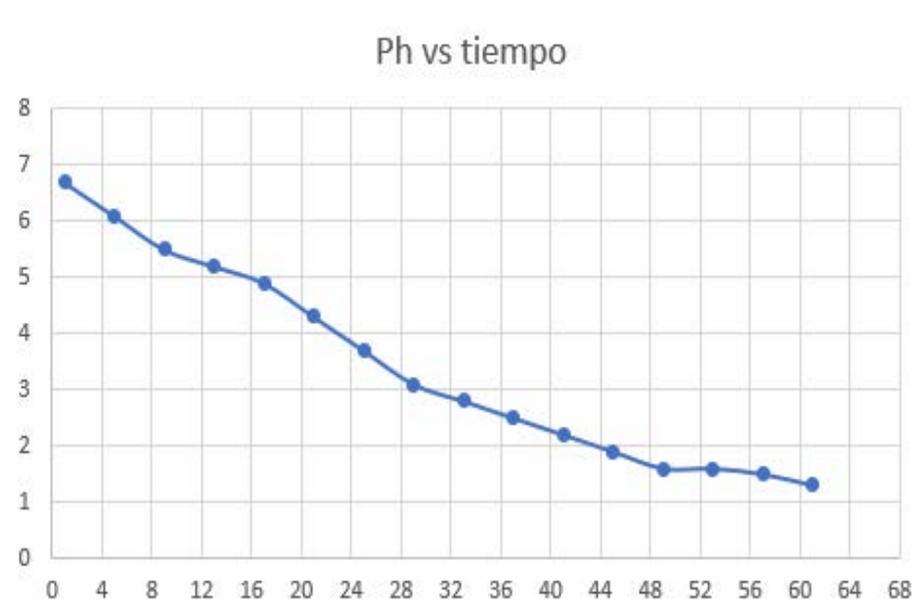


Figura 10. Gráfica de pH vs. Tiempo en días

Fuente: Elaboración propia.

CARACTERIZACIÓN EL ÁCIDO CÍTRICO

Para caracterizar el ácido cítrico obtenido, se utilizó espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) con un espectrofotómetro Shimadzu. Los resultados de FTIR

mostraron picos característicos que confirmaron la presencia de ácido cítrico.

A continuación, se describe los picos relevantes observados en el espectro FTIR:

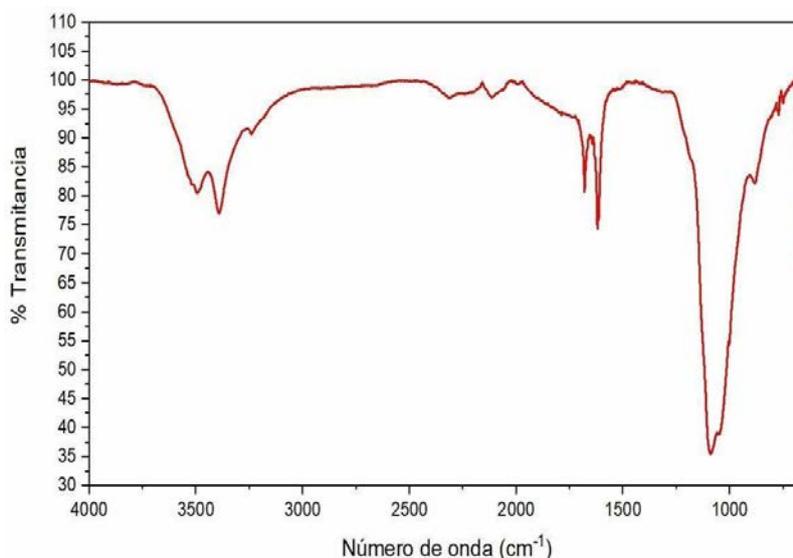


Figura 11. Espectro del ácido cítrico

Fuente: Elaboración propia.

Nota: 3500-3200 cm⁻¹: Banda ancha que representa la vibración de los grupos O-H. 1750-1700 cm⁻¹: Pico agudo que representa la vibración del grupo C=O. 1300-1000 cm⁻¹: Varios picos que representan las vibraciones de los grupos C-O

HALLAZGOS RELEVANTES

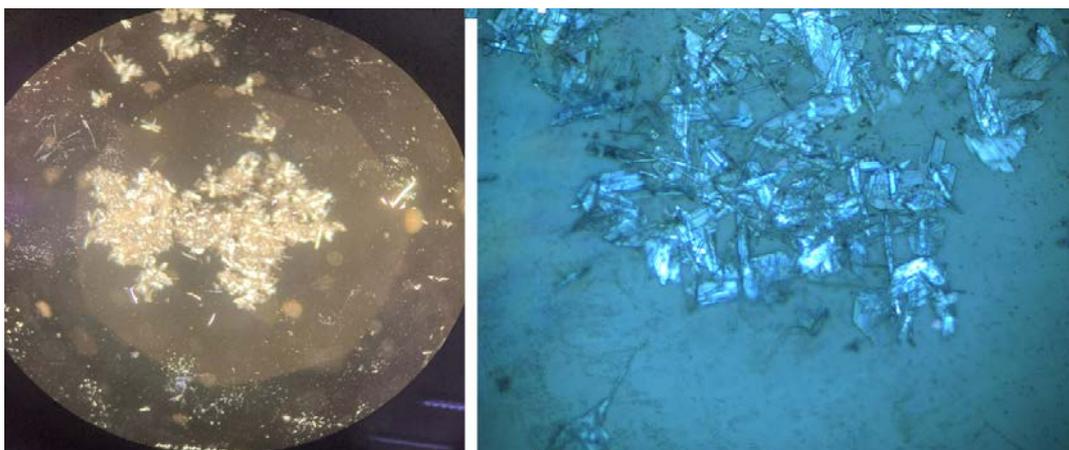


Figura 12. Ácido cítrico bajo un microscopio polarizado

Fuente: Elaboración propia.

Nota. El ácido cítrico exhibe polimorfismo, presentándose en formas anhidra y monohidratada, cada una con propiedades físicas y químicas distintas que afectan su solubilidad, estabilidad y reactividad. Este fenómeno permite que el ácido cítrico se adapte a diversas condiciones, con posibles transiciones entre formas polimórficas en respuesta a cambios de temperatura y humedad.

CONCLUSIONES

- La fermentación del moho *Aspergillus* en una solución azucarada es viable para producir ácido cítrico, ofreciendo una alternativa biotecnológica a los métodos químicos tradicionales.
- La caracterización del ácido cítrico mediante espectroscopia infrarroja confirmó su estructura molecular y pureza, validando la viabilidad del método de producción biotecnológico empleado.

ANEXOS

Máquinas empleadas

- Microscopio Olympus CX31
- Microscopio Leica DM750P
- Autoclave
- Campana extractora
- Cámara de bioseguridad
- Incubadora thermo scientific
- Horno de secado
- FTIR Shimadzu Prestige

REFERENCIAS

- [1] Svedberg G. Royal Swedish Academy of Engineering science <https://www.iva.se/contentassets/e8436f25872e4bca8be92207871a0456/ivas-minnesskrift-2012-scheele.pdf>
- [2] Vidal Jorge Curso de Botánica 28a edición editorial Bruño Lima
- [3] Di Lorenzo R., Serra I., Porro D., Branduardi P. Review State of the Art on Microbial production of Industrially relevant Organic Acids Catalyst 2022, 2 ,pp3 <https://www.mdpi.com/2073-4344/12/2/234>
- [4] Lende S., Karemore H., Umekar M. Review of production of citric acid by fermentation of technology GSC Biological and Pharmaceutical Sciences https://www.researchgate.net/publication/357431891_Review_on_production_of_citric_acid_by_fermentation_technology/fulltext/62c5e8db2bdd98698ad8c2b3/Review-on-production-of-citric-acid-by-fermentation-technology.pdf?origin=publication_detail&p=eyJjb250ZXh0Ijp7ImZpcnN0UGFnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uW9uliwicG-FnZSI6InB1YmxpY2F0aW9uRG93bmxvYVWQILCJwcm-V2aW91c1BhZ2UiOiJwdWJsaWNhdGlvbiJ9fQ&__cf_chl_tk=u5lcg8GhGA4oo85r4QJ9jXBQ3EgXq1ZaryYU-Qd46U8E-1732142686-1.0.1.1-NdaqFe9kxECgMuy-MO1sYaRfq3f24n7wpMJWpmXqBX6A
- [5] Martin, E. (1953). *Farmacía práctica de Remington* (10.^a ed.). UTEHA. Pag 610 Mexico
- [6] Ksiasek Ewelina review citric acid: properties, microbiological productions and application in industries *Molecules* 2024 ,29,22. <https://doi.org/10.3390/molecules29010022> <https://www.mdpi.com/journal/molecules> <https://www.mdpi.com/1420-3049/29/1/22>
- [7] Frazier W.C. Westhoff D.C. *Microbiología de los alimentos* cuarta edición española 1993 Editorial Acribia España pag 30
- [8] Madigan M, Martinko J Bender K, Buckley D , Stahl D *Biología de los microorganismos* 2015 Pearson educación.S.A. España pag 596- 604
- [9] Monroy, M., Rueda, L., Aparicio, A., & Garcia, J. (2019). Fermentation of *Musa paradisiaca* Peels to Produce Citric Acid. *Hindawi Journal of Chemistry*, Article ID 835671.

Recuperado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2019/8356712>

- [10]** Pau Loke Show, P. et al. (2015). Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 271-283. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1033653>.

ACERCA DE LOS AUTORES

Laurence R. Salmon Barrantes

Químico farmacéutico egresado de la maestría de química por la pontificia Universidad Católica del Perú PUCP, ha trabajado en la industria en productos farmacéuticos y cosméticos, asesor en INDECOPI, y amplia experiencia docente. Desde 2013 docente de tiempo completo en Tecsup en la carrera de procesos químicos y metalúrgicos.

 lsalmon@tecsup.edu.pe

Frank Yamir Paredes Vásquez

Estudiante de la carrera profesional de procesos químicos y metalúrgicos en TECSUP Lima

 frank.paredes@tecsup.edu.pe

Luz Milagros Daza Concha

Estudiante de la carrera profesional de procesos químicos y metalúrgicos en TECSUP Lima

 luz.daza@tecsup.edu.pe

Recibido:

Revisado:

Aceptado:



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons AtribuciónNoComercial 4.0 Internacional.