

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



TRABAJO DE GRADUACION

**"Producción de Acido Cítrico
Por Método Microbiológico, Utilizando
los Azúcares Presentes en Cáscara de Piña
(Ananas comosus)"**

PRESENTADO POR:

LUIS ANTONIO REYES VALIENTE

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA

Septiembre de 1989



SAN SALVADOR,

EL SALVADOR,

CENTRO AMERICA.

T
661.86
R457p

UES BIBLIOTECA CENTRAL



INVENTARIO: 10111481

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

LIC. LUIS ARGUETA ANTILLON

SECRETARIO GENERAL

ING. RENE MAURICIO MEJIA MENDEZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO EN FUNCION

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

SECRETARIO

DRA. MARIA GLADYS DE MENA GUERRERO

DEDICATORIA

A DIOS : Por permitirme seguir adelante y
 fortalecer mi espíritu.

A MIS PADRES : Eugenio Reyes López
 Martina Valiente de Reyes
 CON INTENSO RESPETO Y AMOR.

A MIS HERMANOS : Ana Vilma,
 Carlos Alberto,
 Miriam Haydee,
 Rhina Elizabeth (Q.E.P.D.),
 Oscar Eugenio (Q.E.P.D.),
 José Angel,
 María del Carmen,
 Patricia Eugenia,
 Ana Rita de Jesús (Q.E.P.D.),
 Juan Ernesto,
 Sonia Deysi (Q.E.P.D.)
 CON AMOR INFINITO.

LUIS ANTONIO REYES VALIENTE

A G R A D E C I M I E N T O

- A la INGENIERO MARIA DEL CARMEN GUILLEN DE MEDRANO y al LICENCIADO EDUARDO CORTES GARCIA, por la valiosa cooperación, paciencia y orientación necesaria para la realización del presente trabajo.
- Al DOCTOR GUSTAVO A. ESCOBAR por la Orientación básica de Micología.
- A la DOCTORA GLORIA RUTH CALDERON por el apoyo moral y material brindado para coadyuvar el desarrollo de este trabajo.
- A la INGENIERO BERENICE HUEZO DE OLIVA, por aclararme aspectos metabólicos del proceso microbiano.
- A los SEÑORES LABORATORISTAS :
Oscar Coreas, Mateo Eugenio Diaz,
Víctor Sánchez,
por la colaboración brindada.

R E C O N O C I M I E N T O

- A las siguientes Secciones :

- a) Microbiología, Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental.
- b) Investigación Aplicada y Tesis Profesional, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
- c) Análisis Instrumental, Departamento de Análisis Químico e Instrumental.

POR BRINDARME SU COLABORACION Y LA OPORTUNIDAD DE
REALIZAR EL PRESENTE TRABAJO.

- Al Personal de la Planta Piloto; Facultad de Ingeniería y Arquitectura.

POR SU OPORTUNA Y VALIOSA COLABORACION.

- A todas las personas, familiares, parientes, Docentes y amigos, que me apoyaron en forma directa o indirecta.

I N D I C E

Capítulo	Pág.
I. Introducción	5
II. Objetivos	7
III. Resumen	8
IV. Revisión bibliográfica	10
V. Parte Experimental	13
a) Materiales y Equipo Utilizado	14
b) Metodología empleada para la preparación de sustrato	18
c) Metodología para activación o adaptación del <i>A. niger</i> al medio de cultivo	19
d) Método microbiológico para pro- ducir ácido cítrico	22
e) Obtención del ácido cítrico, des- pués de la fermentación	24
f) Identificación del ácido cítrico	27

Capítulo	Pág.
VI. Resultados y discusión	28
Primer ensayo	28
Segundo ensayo	33
Tercer ensayo	37
Identificación del producto obtenido	43
VII. Conclusiones	46
VIII. Recomendaciones	48
IX. Bibliografía	50

INDICE DE APENDICE

Sección	Pág.
A. Producción e importación de piña	55
B. Clasificación del <i>Aspergillus niger</i>	56
C. Determinación de peso seco	57
D. Tabla de correcciones de °Brix	58
E. Método de Saffran-Densted	60
F. Cálculos Estequiométricos	63
G. Medios de cultivos	67
H. Esquema del sistema fermentativo, utilizado a nivel de laboratorio	70
I. Secuencia Bioquímica para la ob- tención de ácido cítrico.	71
J. Diagrama general de flujo para el proceso de fabricación del ácido cítrico.	72

Sección	Pág.
K. Tabla de composición química de la piña	73
L. Esquema que representa el aprove- chamiento de la piña	74

I N T R O D U C C I O N

La revisión de la bibliografía previa al desarrollo - del presente trabajo nos refleja, que la producción de ácido cítrico obtenida de frutos cítricos está quedando en desuso, ya que el obtenido por procesos micribiológicos ha resultado ser más económico.

El proceso de fermentación sumergida (22, 25) nace a mediados de la Segunda Guerra Mundial en el cuál se produjo antibióticos (Penicilinas).

Una vez desarrollado el proceso microbiológico sumergido, éste es utilizado para la producción de ácido cítrico y otros productos.

En lo que concierne a la producción de este ácido, se sabe que la mayor parte es obtenida a partir de melazas (10, 22, 25), y que dentro de la búsqueda de nuevas fuentes para este fin, el jugo extraído de las cáscaras de piña puede ser aprovechado para fines de biotransformación.

El cultivo de piña es de importancia agrícola en el país (5, 8, 13, 18, 28) (ver en apéndice producción e

importación, pág. 55) y produce un 35 por ciento de desechos (24) representados en cáscara y que, además, los azúcares contenidos en el jugo de las cáscaras pueden ser aprovechadas para la obtención de ácido cítrico por la acción metabólica del *Aspergillus niger*. Fué así que se eligió la cáscara como material para el desarrollo del presente trabajo; se pretende de esta manera, mostrar la posibilidad de aprovechar ciertos residuos agroindustriales que se producen en este país.

La economía de El Salvador es eminentemente agrícola y, como otros países del mundo, se caracteriza por la creciente disminución en la producción de alimentos y energía, asociada con la necesidad de preservar el medio ambiente. Los materiales de desecho o subproductos agroindustriales, tales como: melaza de la caña de azúcar, aguas mieles del café, suero de leche y otros, pueden aprovecharse para obtener productos útiles y contribuir, en cierta medida, a mejorar la economía salvadoreña.

II. OBJETIVOS .

GENERAL :

Aprovechar los carbohidratos presentes en el jugo extraído de las cáscaras de piña, para obtener ácido cítrico, por medio de la acción metabólica del *Aspergillus niger*.

ESPECIFICOS :

- Utilizar un modelo de investigación que permita establecer procedimientos técnicos en la utilización de residuos Agroindustriales por vía fermentativa, para obtener productos de interés y reducir al mínimo los riesgos de contaminación ambiental.
- Utilizar los recursos naturales renovables de nuestro país, para la obtención de materias primas útiles para la industria evitando de esta manera su importación en el futuro.
- Obtener una concentración óptima de sustrato y un tiempo óptimo para la producción microbiológica de ácido cítrico.

III. R E S U M E N .

El propósito de este trabajo es tratar de establecer las vías que permitan el empleo apropiado de los desechos Agroindustriales como substratos de fermentación en la obtención de metabolitos secundarios de interés industrial.

El proceso microbiológico utilizado en esta investigación trata de buscar una aplicación del jugo contenido en las cáscaras de piña con el fin de lograr establecer una producción de ácido cítrico, a partir de los carbohidratos contenidos en ésta; utilizando para ello el sistema de cultivo sumergido.

En dicho proceso se buscó una concentración óptima de substrato utilizando para ello concentraciones de 5.66, 10.88, 15.49, 20.11, 30.62, 41.13 y 50.63° Brix y un inóculo de 0.13 gramos de *A. niger*, para lo cual se ensayaron siete muestras en duplicado.

Asímismo se optó por buscar un tiempo óptimo de producción del ácido cítrico, para lo cual se utilizó una concentración de 30° Brix y 0.43 gramos de *A. niger* utilizando 9 muestras, (en duplicado), muestreando cada 48 horas.

Seguidamente se sometió a ensayo un lote de 48 muestras, las cuales contenían 20.54° Brix de substrato y 0.43 gramos de *A. niger*, de las cuales se muestreó cada 48 horas, con el fin de determinar el

ácido cítrico producido en dicho proceso, logrando encontrar un tiempo óptimo de 216 horas (9 días). Para determinar el ácido correspondiente se aplicó el método de Saffran-Densted.

Por otro lado, la cáscara utilizada en este trabajo fue recolectada al azar con un estado de madurez óptimo sin importar la variedad de piña, sino visto como un desecho.

Posteriormente se hicieron pruebas de comprobación del ácido obtenido.

IV. REVISION BIBLIOGRAFICA .

El ácido cítrico se encuentra como constituyente natural en frutos cítricos, piñas, manzanas, y otros.

En el año 1784, éste fué descubierto, aislado y cristalizado a partir del jugo de limón por Scheele(15,27) y estudiado por Liebig en 1838.

Posteriormente Grimaux y Adams (1880), sintetizan este ácido a partir de glicerol.

Whemer 1893, reporta haber encontrado acumulación de ácido cítrico en un procedimiento biológico, a partir de un hongo del género *Citromyces*, dándose con este acontecimiento, el inicio de la producción de ácido cítrico a partir de la fermentación de glucosa.

Sánchez (1942) cita que la formación de ácido cítrico bajo la acción de microorganismo , sobre soluciones azucaradas, agregadas en forma continua, fué estudiada ampliamente hasta el año de 1909, época en que la industria cítrica aún no estaba suficientemente explotada. (23, 27).

Loockwood, menciona que por el año de 1923, aparece la introducción del ácido cítrico en el mercado, el cuál es producido por medio de fermentaciones y con un precio más bajo que el obtenido

de los frutos cítricos. Rhodes y Fletcher, mencionan que dentro de los materiales, que más se utilizan como substratos ricos en azúcares para producir ácido cítrico, se tienen melazas de caña y remolachas; los cuales son sub-productos Agro-Industriales de las plantas azucareras.

Otros investigadores (3, 19, 23, 27) mencionan que dentro de los microorganismos de trabajo están *Cytromices glover*, *Mucor pyriformis*, *Aspergillus wentii* y *A. niger*.

Hoy en día, la producción industrial del ácido cítrico sigue teniendo como base, la utilización de melaza de caña, *A. niger* y el proceso de cultivo sumergido (4, 10, 15, 23, 25, 26).

El *A. niger* desde el punto de vista económico, puede considerarse negativo o positivo.

- a) Negativo : Puede deteriorar; frutos, jaleas, etc. y como saprófito puede atacar, vegetales, animales y personas (6, 10, 14).
- b) Positivo : Por producir ácidos cítrico , glucónico, oxálico y enzimas tales como amilasas, proteasas, peptinasas, oxidasas e invertasa (9, 15, 16, 17, 25).

En cuanto a la utilización de la piña, según la bibliografía consultada, tanto nacional, como internacional, no se ha encontrado información que mencione la utilización del jugo contenido en las cáscaras como sustrato para obtener ácido cítrico, únicamente se

menciona lo siguiente:

- a) De la pulpa aprovechable se elaboran jaleas, conservas, jugos, aunque en su mayoría se consume en estado fresco (7, 18, 28).
- b) De la cáscara se extrae el jugo, que es utilizado para obtención de alcohol y vinagre; el salvado (cáscara prensada y deshidratada) se destina para la alimentación del ganado, la fibra celulósica para la industria de papel, textil; celulosa y carboximetilcelulosa utilizado en la Industria Química y Farmacéutica (7, 11, 12, 24, 29).
- c) Asimismo se menciona que el ácido cítrico contenido en forma natural, ha sido aislado por métodos Físicos-Químicos, pero no obtenido por procesos fermentativos a partir de los azúcares contenidos en el jugo.

PARTE EXPERIMENTAL

V. PARTE EXPERIMENTAL.

A. Materiales y Equipo Utilizado.

1. Materiales.

Asas bacteriológicas

Agitador de vidrio

Balones volumétricos de 50, 100, 1000 mililitros

Beaker de 50, 100, 250 y 1000 mililitros

Bureta de 50 ml.

Erlenmeyer de 50, 125, 250 y 500 mililitros.

Espátulas.

Embudos pyrex medianos.

Embudo Büchner.

Gradillas de metal.

Goteros.

Kitazato de 500 ml.

Láminas de vidrio para tinciones.

Mortero de ágata.

Microespátula.

Mechero Bunsen.

Probetas de 10, 25 y 100 mililitros.

Placas de Petri.

Pipetas volumétricas de 1, 2 y 5 mililitros.

Pipetas de Mohr despuntadas de 5 y 10 mililitros.

Pizetas.

Tubos de ensayo con tapón de rosca 13 x 120 mm.

Tubos de ensayo de 13 x 120 mm.

Tubos de vidrio (varillas).

Vasos para centrífuga de 15 y 50 mililitros.

Vidrios de reloj.

2. Reactivos y Medios de Cultivo.

a) Para método microbiológico.

a.1. Proceso fermentativo.

Materia prima principal: Extracto azucarado y concentrado, obtenido de las cáscaras de piña (desperdicios).

Microorganismos de trabajo : *Aspergillus niger* (ver apéndice, pág.56).

Peptona "BBL".

Fosfato ácido de potasio.

Sulfato de magnesio heptahidratado.

Acido clorhídrico al 50%.

Agua desmineralizada.

Alcohol caprílico (Antiespumante)..

a.2. Para cultivar, e identificar *A. niger*.

Agar dextrosado de Sabouraud "BBL".

Agar-Agar Difco.

Agar-papa-dextrosa.

Glucosa.

Verde de bromo cresol (indicador alcalino-ácido).

Aceite de inmersión.

Lacto fenol azul algodón.

b) Para extraer ácido cítrico del medio de cultivo.

Hidróxido de calcio.

Acido sulfúrico al 20%.

Carbón activado.

Carbonato de bario.

Gel de sílice.

3. Equipo.

Auto Clave de construcción vertical modelo BCH Webeco.

Refrigerador.

Balanza granataria marca OHAUS.

Balanza analítica Mettler H 7 8 AK.

Estufa Thelco modelo 16.

Centrífuga.

Baño de María Thelco modelo 83.

Microscopio Binocular M 3208.

PH chimetro.

Espectrofotómetro Perkin Elmer 124 U. V.-V.

Espectrofotómetro Perkin Elmer 714 IR.

Hand Refractó meter 10431 marca Reichert 0-50^o Brix.

Trompa para hacer vacío.

Bomba para hacer vacío.

Bomba compresor para impulsar aire.

Termostato.

Mantas de calentamiento.

Rota vapor para concentrar al vacío.

Termómetro corriente calibrado de 0 a 105°C.

Aerómetro - °Baume.

Desecador.

Kit para destilación simple.

Secador de cabello.

Cocina eléctrica.

Hot plate tipo 1900, marca Termoline.

Fermentador.*

* Creación y diseño del autor (ver apéndice, pág. 70).

B. METODOLOGIA EMPLEADA PARA LA PREPARACION DE SUSTRATO:

1. Recolección de cáscara de piña.
2. Reducirla a fracciones pequeñas con la ayuda de cuchillo de acero inoxidable y posteriormente someterla a presión manual o mecánica con el fin de extraer el jugo.
3. Esterilizar el jugo a una T° de 121°C , 15 libras de presión por 15 minutos en auto clave.
4. Eliminar la pulpa o coloides por decantación para clarificar el jugo.
5. El jugo clarificado, se concentra al vacío (en rotavapor a 60°C) hasta obtener las concentraciones necesarias para los ensayos correspondientes.*

* Se refiere al caso de este trabajo; en el cual se necesitaron las siguientes concentraciones:

- a) para el caso del primer ensayo: 5.66, 10.88, 15.49, 20.11, 30.62, 41.13 y 50.63°Brix .
- b) Segundo ensayo 30°Brix .
- c) Tercer ensayo 20.54°Brix .

C. METODOLOGIA PARA ACTIVACION O ADAPTACION DEL *Aspergillus niger** AL MEDIO DE CULTIVO.

Fundamento:

Estimular el sistema enzimático del microorganismo, adaptándolo al medio para obtener un mejor y rápido aprovechamiento de los carbohidratos (sustrato), dando como resultado una mayor producción de ácido cítrico.



Procedimieno:

1. Preparación de medios de cultivo (ver esquema No. 1, pág.20).
2. Preparación del medio de Sabouraud (ver apéndice, pág. 68).
3. Siembra del microorganismo en medio Foster en bisel. Tiempo de incubación 6 á 7 días.
4. Segunda resiembra en medio Foster en cajas de Petri. Tiempo de incubación 10 días.

* Obtenido de colección de hongos (Micoteca), Sección de Microbiología, Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental; Facultad de Química y Farmacia. U.E.S.

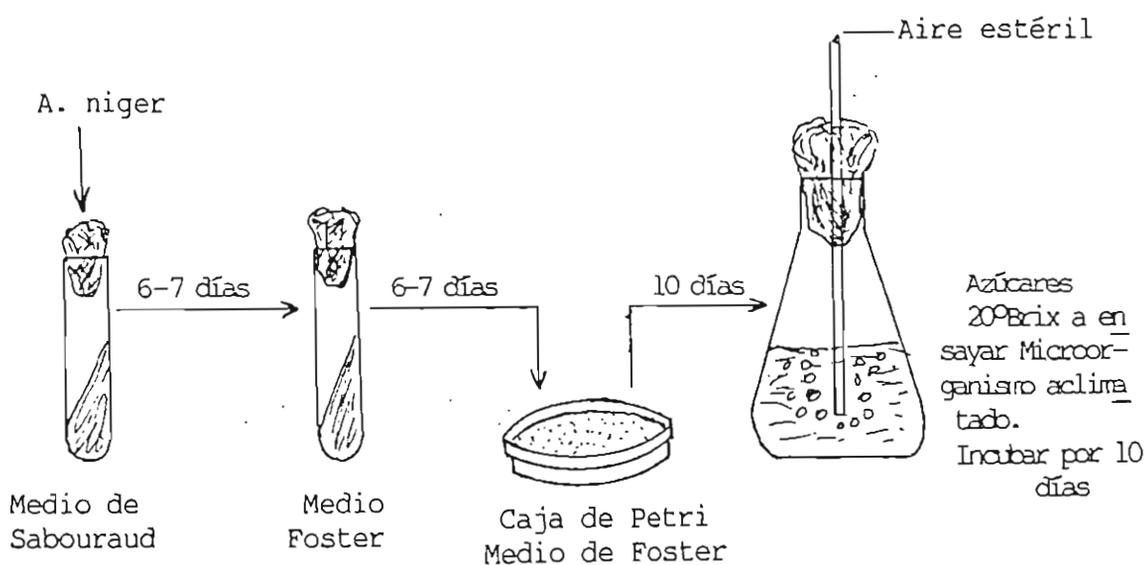
5. Siembra del *A. niger* en un medio líquido de adaptación o aclimatación constituido por:

Sulfato de magnesio heptahidratado0.1 por ciento
 Fosfato monoprótico0.1 por ciento
 Peptona0.5 por ciento
 Jugo concentrado a 20°Brix
 (sustrato a ensayar) 100 ml.

Ajustar PH = 2 con HCl al 50 por ciento, con aireación estéril (ver apéndice pág. 72) e incubar por 10 días.

6. Luego que el microorganismo se ha aclimatado, se puede utilizar para inocular medios de cultivo que contiene el sustrato a investigar.

ESQUEMA No. 1 ADAPTACION DEL *A. niger* AL MEDIO DE CULTIVO.



NOTAS :

1. Para mantener una cepa pura se aconseja resiembras sucesivas para aislar el microorganismo, teniendo en cuenta una asepsia estricta en el manipuleo de éstos, y una esterilidad del medio de cultivo.
2. En caso de que el A. niger haya sido aislado del medio ambiente o se desconozca su capacidad para producir ácido cítrico, efectuar todos los pasos anteriores.

D. METODO MICROBIOLOGICO PARA PRODUCIR ACIDO CITRICO.*

Procedimiento :

1. Disolver : 0.5 gramos de peptona, 0.1 gramo de fosfato monoprótico de potasio, 0.1 gramo de sulfato de magnesio heptahidratado en 100 mililitros de jugo extraído y concentrado, a 20.54°Brix** en un Erlenmeyer de 250 ml.
2. Ajustar el PH a \pm 2 con ácido clorhídrico al 50 por ciento.
3. Esterilizar a 121°C por 15 minutos y 15 libras de presión en autoclave.
4. Inoculación (0.43 gramos de A. niger aclimatado por cada 100 ml. de medio). (ver determinación peso seco en apéndice pág. 57).
5. Someter a incubación a una temperatura de 27°C, con ai reacción estéril.***

* Ver secuencia bioquímica en apéndice, pág. 71

** Estos grados °Brix corresponden a sólidos totales.

*** La esterilidad del aire se consigue por filtración doble; el aire pasa por un filtro incorporado a la bomba-compresor y un filtro de algodón humedecido, el cuál previamente ha sido esterilizado en autoclave. (ver esquema de cultivo sumergido, en apéndice, - pág. 70).

6. En caso de una formación de espuma agregar 0.5 por ciento de alcohol caprílico.(utilizado como antiespumante).
7. Controlar diariamente el crecimiento misceliar mediante examen microscópico y mantener el PH ácido (1.5 a 2.0) del medio de cultivo, durante el proceso de incubación.
8. Muestrear cada 48 horas, para determinar espectrofotométricamente la cantidad de ácido cítrico producido durante el tiempo de incubación. (ver método Saffran-Densted en apéndice, pág. 60).

E. OBTENCION DEL ACIDO CITRICO, DESPUES DE LA FERMENTACION.

El procedimiento seguido en esta parte de la investigación, está basado en utilizar 100 mililitros de medio cultivo, el cual contiene 2.803 gramos de ácido cítrico.*

Procedimiento :

1. Filtrar al vacío el medio de cultivo, para separar miscelios del hongo. (ver apéndice, pág. 72).
2. Calentar el filtrado a más o menos 87°C , y precipitar el ácido cítrico con lechada de cal, (la cual contiene 1.483 gramos de hidróxido de calcio, en 6.5 ml de agua) agregar ésta, en porciones y con agitación continua (cálculos estequiométricos verlos en apéndice, pág.63).
3. Filtrar en caliente y al vacío.
4. Lavar con agua caliente hasta que la masa quede incolora.
5. Disolver el residuo en agua (una cantidad equivalente al peso) luego calentar aproximadamente a 80°C y agregar 9.82 ml.

* 2.803 g. de ácido cítrico total correspondiente al valor máximo obtenido a las 216 horas de iniciado el proceso fermentativo (ver cuadro No. 3, pág.41).

de ácido sulfúrico al 20 por ciento en porciones y con agitación. **

(ver cálculos estequiométricos en apéndice pág.63) seguidamente llevar a ebullición por más o menos 12 minutos.

Pasado este tiempo suspender el calentamiento y mantener una agitación constante por 30 minutos más.

6. Filtrar la solución en caliente al vacío.
7. Concentrar el filtrado en rotavapor a 60°C, en caso de formarse precipitado de sulfato de calcio volver a filtrar, luego proseguir con la concentración.
8. La solución concentrada se vierte en un recipiente apropiado y conservando en refrigeración por 5 días, con el fin de cristalizar el ácido cítrico (primera cristalización).
9. Pasado este período centrifugar y decantar para separar los cristales formados; luego lavarlos con agua helada.
Reunir los lavados y el sobrenadante y concentrarlos nuevamente según numeral 7.
10. Los cristales obtenidos de la centrifugación se disuelven en a-

** Se recomienda agregar un exceso de 0.2% de ácido sulfúrico para facilitar la cristalización de ácido cítrico; pero, no exceder de esta cantidad por la posible caramelización del ácido orgánico.

gua en una relación de 1;2 en peso. Luego agregar carbón activado (0.5%) y calentar a ebullición para eliminar sustancias coloreadas; y para los remanentes de ácido sulfúrico (numeral 5) agregar solución de carbonato de bario al 5 por ciento; seguidamente filtrar, a fin de precipitarlos.

11. La solución resultante, concentrarla nuevamente en un rotavapor a 60°C , hasta alcanzar una concentración de más o menos 38°Be .
12. El licor concentrado se calienta a aproximadamente 80°C durante 12 minutos. Después de este tiempo enfriar en baño de hielo agitando constantemente para provocar la cristalización.
Centrifugar. Para efecto de rendimiento el sobrenadante puede someterse a refrigeración durante dos días, para precipitar el ácido cítrico residual.
13. Secado de los cristales. Estos se secan con aire caliente y seguidamente se colocan en un desecador conteniendo gel de sílice durante 24 horas.

F. IDENTIFICACION DEL ACIDO CITRICO.

1. La solución responde a la prueba de citratos.

A pocos miligramos de citratos mezclados con 15 mililitros de piridina y 5 mililitros de anhídrido acético, produce un color rojo carmín. (32).

2. A una alícuota de la solución a ensayar, ligeramente alcalinizada con NH_4OH , se agregan 10 mililitros de una solución saturada de cloruro de calcio. La solución permanece inalterada en frío, pero al calentar se forma un precipitado blanco de citrato de calcio.

Este precipitado es soluble en ácido clorhídrico e insoluble en solución reactiva de NaOH . (2, 27).

3. Tiraje de espectro infrarrojo con nujol.

Para todo ésto se utilizó patrón de comparación.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION .

PRIMER ENSAYO .

En el gráfico No. 1 y cuadro No. 1, se presentan los resultados de ensayo en el cual se pretendía encontrar una concentración de azúcar óptima para la producción de ácido. Para ésto se mantuvo constante el tiempo de incubación (10 días), la cantidad de inóculo (0.13 g.); variándose únicamente la cantidad de sustrato.*

Los valores dados en cada curva representan un promedio de dos muestras, la curva A corresponde a los valores promedio de ácido cítrico natural (sin fermentar), la curva B corresponde a los valores promedio de ácido cítrico producido por fermentación.

Al compararse ambas curvas puede observarse lo siguiente:

1. Que dentro del intervalo de concentración de 5 a 20^oBrix, para - la curva B, presenta una disminución de ácido con respecto a la curva A, ésto significa que posiblemente el microorganismo puede consumir como fuente de carbono ácido cítrico, además de

* Sustrato : Jugo extraído y concentrado de la cáscara de piña. Empíricamente en este trabajo se utilizó para expresar las diferentes concentraciones de jugo el método expresados en ^oBrix, - el cual expresa el porcentaje en peso de los sólidos suspendidos en una solución azucarada. No llegándose a determinar la cantidad neta de azúcar contenida en el jugo.

los azúcares presentes, ya que la literatura mencionada (15, 17) que si el medio presenta cierta acidez favorece su multiplicación y por ende la estimulación del complejo enzimático del *A. niger*.

2. En el intervalo de 20 a 50^oBrix la curva B manifiesta un incremento bien marcado con respecto a la curva A. Aunque el muestreo se realizó a partir de 20^oBrix, con concentraciones de sustrato que van de 10 en 10 unidades y no de 5 en 5 como en el primer intervalo, la tendencia de la curva es siempre en aumento, pero más acelerado. Se puede decir que el hongo no se ve afectado por concentraciones altas de sustrato en el medio, sino, por el contrario, se ve estimulado su complejo enzimático hacia una producción mayor de ácido cítrico.

Las siete muestras en duplicado, sometidas al proceso fermentativo durante 10 días, mostraron cambios muy marcados, tal como se observa en cuadro No. 1. Conforme aumenta la concentración del sustrato, aumenta la concentración de ácido cítrico inicial (natural) y el producido por fermentación.

En los muestreos del 1 al 4 (rango de 5.66 a 20.11^oBrix) puede verse decrementos con respecto al ácido cítrico inicial (rango de -0.181 a - 0.14 g. de ácido cítrico). Hubo consumo de este ácido, (ver gráfico No. 1) el que prácticamente fue consumido o reciclado por el microorganismo de trabajo.

Asimismo el ácido cítrico producido se incrementa en el rango que va de 30.62 a 50.63^oBrix en donde los incrementos van de --

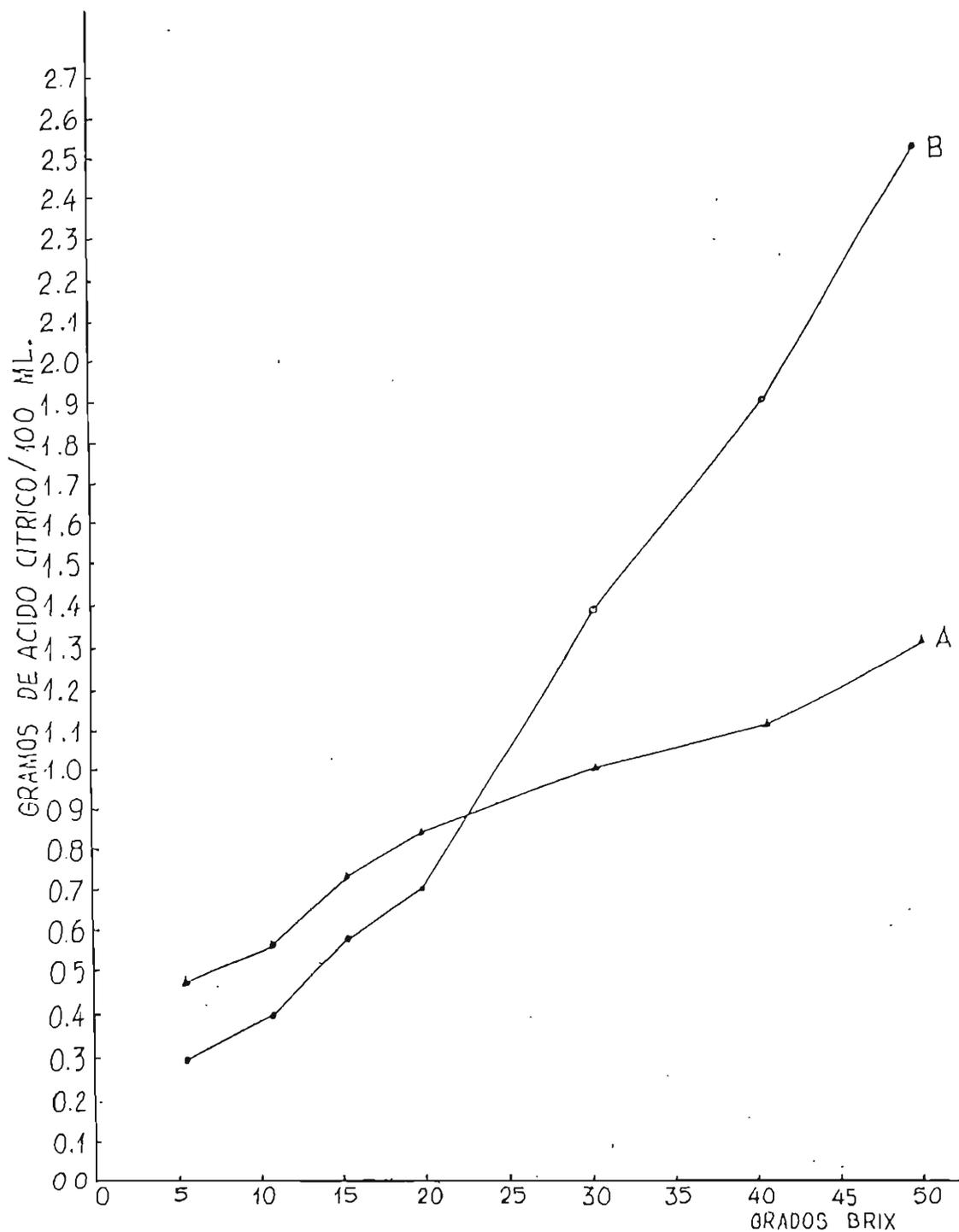
0.385 a 1.21 g. del correspondiente ácido.

El enfoque explicativo puede darse desde el punto de vista fisiológico, ya que el *A. niger* es osmotolerante, y existe la posibilidad de que a medida se incrementó las concentraciones de azúcares, el crecimiento del microorganismo fue muy activo y como consecuencia del proceso metabólico se obtuvo un aumento en la producción del ácido cítrico.

Muestreo No.	Muestras Torradas	Concentración de Sustrato-(°Brix) \bar{x}	Valores de Ácido Cítrico g/100 ml.		Decrementos e incrementos de ácido cítrico. (con respecto al natural).
			Inicial* 0-días	Después de fermentación. 10-días.	
1	2	5.66	0.479	0.298	-0.181
2	2	10.88	0.562	0.395	-0.167
3	2	15.49	0.735	0.580	-0.155
4	2	20.11	0.845	0.705	-0.140
5	2	30.62	1.000	1.385	0.385
6	2	41.13	1.145	1.912	0.767
7	2	50.63	1.320	2.535	1.215

CUADRO No. 1. VALORES DE ACIDO CITRICO ACUMULADO A LOS 10 DIAS DE INCUBACION UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUSTRATO (EXPRESADAS EN °BRIX).

* Acido cítrico inicial (natural) : Es el que se encontró en el extracto concentrado extraído de las cáscaras de piña, antes de poner a fermentar.



GRAF. 1 PRODUCCION DE ACIDO CITRICO A LOS 10 DIAS DE INCUBACION UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUSTRATO Y 0.13 GRAMOS DE INOCULO.
 A: ACIDO CITRICO NATURAL O INICIAL (▲)
 B: ACIDO CITRICO AL FINAL DEL PROCESO FERMENTATIVO (●)

SEGUNDO ENSAYO.

En el cuadro No. 2 y gráfico No. 2, se presentan los resultados de un segundo ensayo, en el cual se pretendía encontrar un tiempo óptimo para la producción microbiológica de ácido cítrico; se tomó como base el valor de 30°Brix del ensayo No. 1, ya que este dato se consideró un valor mayor del extremo superior, que cita la bibliografía. (intervalo de 14-20%) En nuestro primer ensayo (discutido anteriormente) es el primer valor superior al intercepto de las curvas A y B, y que presenta una producción de ácido cítrico detectable arriba del valor inicial del mismo ácido, encontrado para - 50°Brix, que es la máxima concentración de sustrato utilizada en esta parte.

Así también se cambió la cantidad de inóculo de 0.13 g. a 0.43 g. con el fin de acelerar el consumo de sustrato presente en el medio y posiblemente evitar el consumo de ácido cítrico inicial o natural ya que como se ha mencionado en la discusión del gráfico No. 1. En éste, para lograr un balance entre la cantidad de microorganismo y sustrato, tuvo que consumir el ácido cítrico para su multiplicación y adaptabilidad al medio.

Como el objetivo era el de encontrar un tiempo máximo, se ensayó un lote de 18 muestras, manteniendo constante el inóculo de 0.43 gramos y un sustrato de 30°Brix en la solución de trabajo.

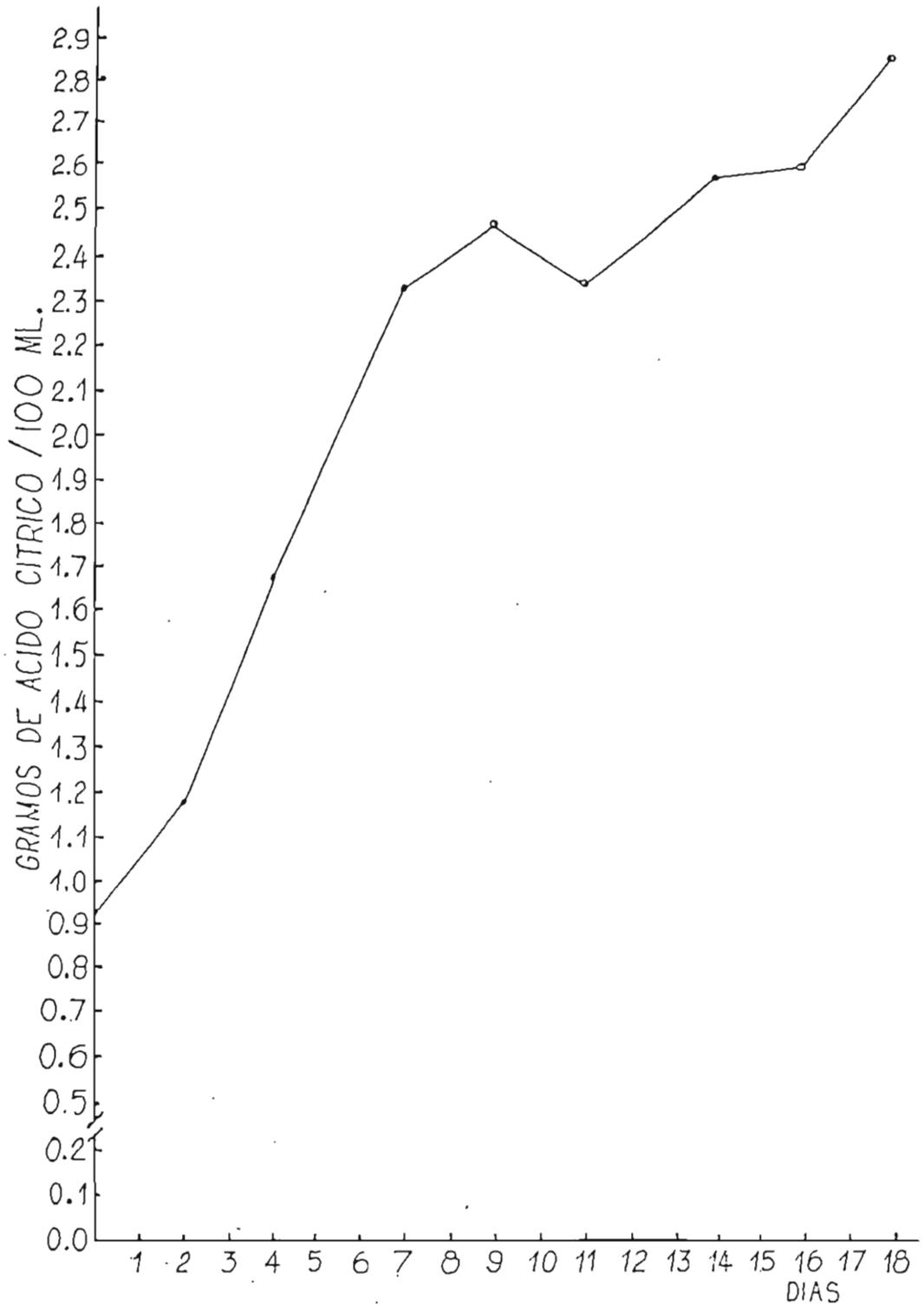
Según gráfico No. 2 prácticamente se tiene una producción de ácido cítrico bien pronunciada en el tiempo que va cero a nueve días, luego, a los once días de iniciado el proceso se presenta un decremento que posiblemente se deba a que las condiciones ambientales del hongo podrían haberse afectado por proceso de aireación o formación de espuma, lo cual puede llegar a atrofiar o inhíbir al microorganismo y por ende la producción de ácido. En los puntos siguientes (11 a 18 días), se observa una producción irregular pero no muy pronunciada como en la primera etapa de cero a nueve días, lo cual posiblemente se deba a que la cantidad de sustrato disponible no era lo suficiente para toda la población de hongos existente a estas fechas.

Como puede observarse en el gráfico No.2, el propósito perseguido era el de encontrar un tiempo máximo de producción de ácido, el cual no se alcanzó tanto con la cantidad de inóculo como con la de sustrato utilizada (0.43 g y 30^oBrix respectivamente) en el tiempo de 432 horas (18 días). Como tal, en el caso particular el proceso de fermentación se prolongó hasta los 18 días con la idea de obtener mayor rendimiento. Pero basado en indagaciones hechas por ciertos investigadores, se sabe que el tiempo óptimo y económico para producir ácido cítrico, oscila entre 5 a 12 días (3, 10, 19, 25), por lo que, de acuerdo a éstos, no se saca mayor ventaja con un tiempo prolongado.

Sin embargo, es de tomar en cuenta el equilibrio que debe existir entre la cantidad de inóculo y azúcares presentes en el medio de cultivo en dichos procesos.

Muestreo	Cantidad de Muestras Tomadas.	Tiempo de Incubación. (horas)	Valores de Acido Cítrico. Total g/100 ml.
1	2	0	0.925
2	2	48	1.18
3	2	96	1.67
4	2	168	2.335
5	2	216	2.475
6	2	264	2.345
7	2	336	2.57
8	2	384	2.59
9	2	432	2.85

CUADRO No. 2 : VALORES DE ACIDO CITRICO PRODUCIDO A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION UTILIZANDO 30° BRUX DE CONCENTRACION DE SUSTRATO Y 0.43 g. DE INOCULO.



GRAF. 2 PRODUCCION DE ACIDO CITRICO A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION UTILIZANDO 30° BRIX DE CONCENTRACION DE SUSTRATO Y 0.43 GRAMOS DE INOCULO.

TERCER ENSAYO

Con el propósito de encontrar un "tiempo óptimo de incubación" para la producción máxima de ácido cítrico, se ensayó un lote de 48 muestras, las cuales se sometieron a las mismas condiciones de fermentación, manteniendo constante la cantidad de sustrato e inóculo (sustrato 20.54 °Brix*, inóculo 0.43 gramos por 100 ml), variando únicamente el tiempo de fermentación.

Cada cierto tiempo se hizo un muestreo cuyos resultados se presentan en el cuadro No. 3 y gráfico No. 3.

La bibliografía internacional (10, 19, 23, 25, 27) reporta que la producción de ácido cítrico a partir de melazas de caña o de remolacha la concentración de azúcar va de 14-20 por ciento y cuyo rendimiento oscila entre 60 á 90 por ciento de ácido cítrico en un tiempo que va de 5 a 12 días; mientras que en El Salvador, un trabajo a nivel de tesis desarrollado por Antillón de Córtez (2), utilizando solución de melaza de caña al 14 por ciento en peso de azúcar, obtuvo

* Ya que en el ensayo No.2 no se logró un punto óptimo utilizando 30° Brix y 0.43 g. de inóculo, se optó por disminuir la concentración de sustrato manteniendo la misma cantidad de inóculo con el fin de lograr un equilibrio entre dicho sustrato y cantidad de microorganismo. Además, en el ensayo No.1 se muestra que para las concentraciones de 20.11 y 30.62 °Brix hay un cambio muy marcado con respecto a decrementos e incrementos. Por lo que se optó por tomar de base la concentración de 20.54 °Brix y por estar relacionado el valor del mínimo decremento.

un rendimiento del 38 por ciento en 12 días.

En el presente trabajo, utilizando jugo de cáscara de piña con una concentración del 20.54 °Brix (dado como sacarosa, ver apéndice, - pág. 58) se obtuvo un rendimiento de 2.803 g. en un tiempo promedio de 9 días, esto puede significar que es el tiempo máximo de producción de ácido por el microorganismo, pero independientemente la fuente del sustrato, se mantiene dentro del rango citado ya por la literatura. (3, 4, 10, 15, 19).

Todos los valores de ácido cítrico presentados en el cuadro No. 3 corresponden a un valor promedio de seis muestras tomadas a diferentes tiempos en donde el intervalo total de fermentación es de cero a dieciocho días.

El valor de 0.85 g/100 ml. corresponde al ácido cítrico presente en el jugo de la cáscara concentrado y sin fermentar. Esto demuestra que la cáscara de piña tiene un porcentaje de ácido cítrico en forma natural.

Según PY (24) la cantidad de ácido cítrico presente en el jugo de la parte comestible de la piña es de 0.52 g/100 ml. de jugo. Este valor difiere del reportado en el presente trabajo, posiblemente debido a las siguientes razones:

- a) El valor reportado en este trabajo está dado en jugo concentrado de la cáscara, mientras que el reportado por PY, además de estar dado en una parte diferente de la piña no ha sido con centrado.

b) Por otro lado, se puede considerar que tanto la variedad, zonas de cultivo y el método utilizado para encontrar ambos valores son diferentes, ya que en el presente caso la variedad no fué específica sino que tomada del mercado al azar y el método para la determinación del ácido fué espectrofotométrico.

c) Además debe tomarse en cuenta que el estado de madurez de la piña, puede influir en la concentración del ácido encontrado en forma natural.

En el mismo cuadro puede verse que la cantidad de ácido cítrico producido por el microorganismo varió entre 0.25g. y 1.953 g. en todo el intervalo de fermentación, siendo las diferencias entre los valores casi constantes en el período de 48 horas (2 días) hasta las 216 horas (9 días).

A partir de este tiempo las diferencias son variables, notándose una tendencia negativa, debido a que el microorganismo posiblemente esté utilizando el ácido producido (reciclaje) ó que las condiciones para su producción ya no son las adecuadas, por la disminución en la concentración del sustrato y otros nutrimentos, manifestándose en la baja producción del ácido cítrico.

Al observar el gráfico No. 3 apreciamos, que la producción de ácido cítrico varía en forma progresiva con el tiempo de incubación del A. niger, llegándose a un máximo a las 216 horas (9 días) de iniciado el proceso de fermentación, para luego decrecer tendiendo a un míni-

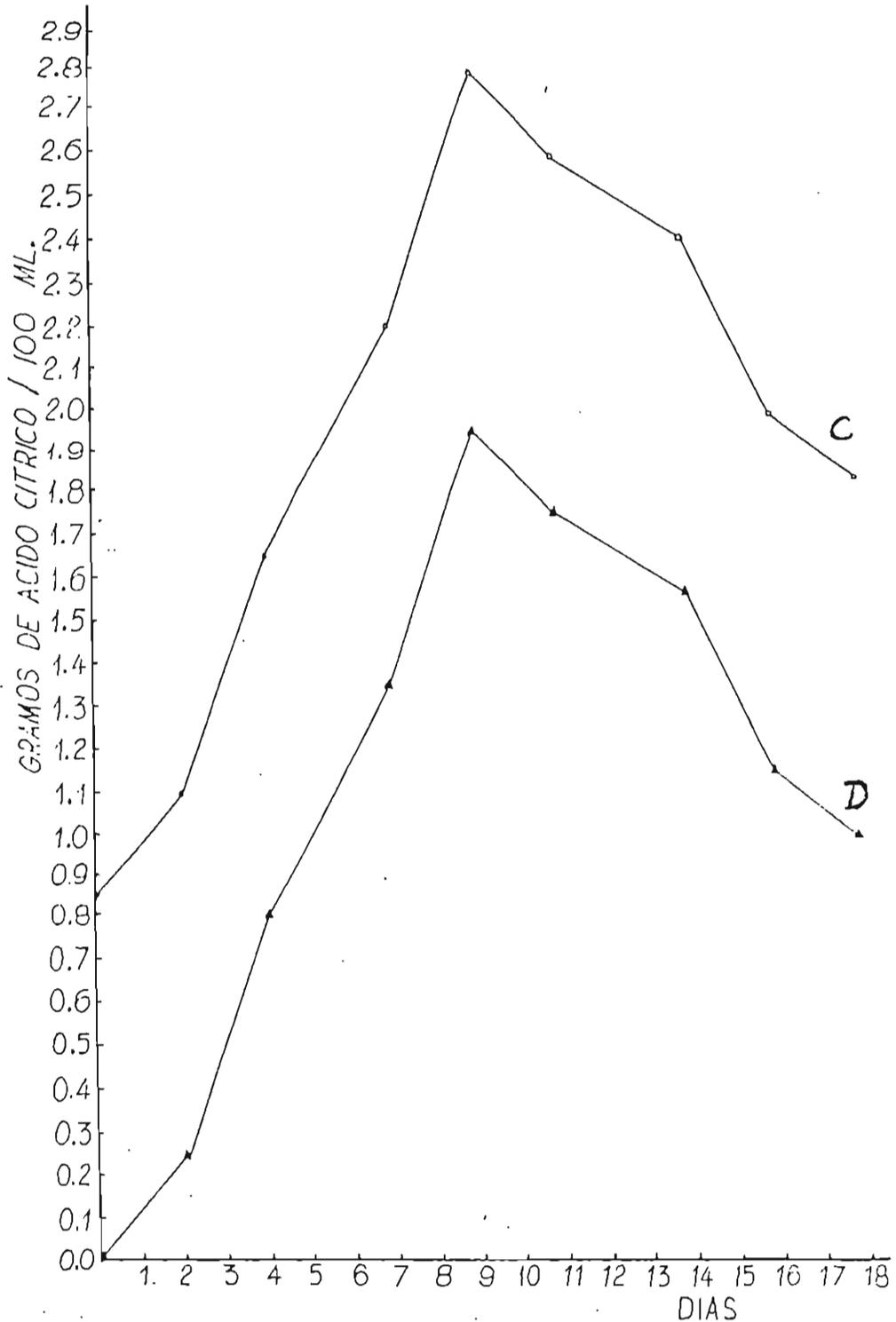
mo.

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente, notamos que la acumulación del ácido cítrico en el medio de cultivo va de acuerdo a la cantidad de inóculo utilizado para cada caso, del grado de adaptación que este microorganismo tenga, la concentración de sustrato y del tiempo de incubación.

Muestreo	Cantidad de Muestras Tomadas.	Tiempo de Incubación (horas)	Valores de Acido Cítrico.	
			Total g/100 ml C	Neto g/100 ml D
1	6	0	0.850*	0.0
2	6	48	1.100	0.25
3	6	96	1.650	0.80
4	6	168	2.200	1.35
5	6	216	2.803	1.953
6	6	264	2.600	1.73
7	6	336	2.420	1.57
8	6	384	2.000	1.15
9	6	432	1.850	1.00

CUADRO No. 3. VALORES DE ACIDO CITRICO PRODUCIDO A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION UTILIZANDO 20.54°BRIX DE CONCENTRACION DE SUSTRATO Y 0.43 g. DE INOCULO.

* Cantidad de ácido cítrico inicial contenido en el jugo natural concentrado de la cáscara de piña. (sin fermentación).



GRAF. 3 PRODUCCION DE ACIDO CITRICO A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION UTILIZANDO 20.54° BRIX DE CONCENTRACION DE SUSTRATO Y 0.43 GRAMOS DE INOCULO.
 C: ACIDO CITRICO NATURAL MAS PRODUCIDO MICROBIOLOGICAMENTE (○)
 D: ACIDO CITRICO PRODUCIDO MICROBIOLOGICAMENTE (▲)

IDENTIFICACION DEL PRODUCTO OBTENIDO .

Para confirmar que el producto obtenido en este trabajo era ácido cítrico, se realizaron los ensayos químicos, mencionados en la metodología (pág. 27) y además se corrió un espectro infrarrojo contrapatrón, dando los siguientes resultados:

Pruebas químicas para citratos ambas fueron positivas. Y en cuanto al infrarrojo, podemos decir lo siguiente:

Al comparar los espectros, podemos observar ciertas diferencias en cuanto a la forma e intensidad de las bandas lo que puede deberse a - problemas de concentración al preparar la muestra para el corrido del espectro y además de considerar la pureza de la muestra problema; pero que las regiones en las cuales aparece cada una de esas bandas es aproximadamente la misma.

La tabla siguiente muestra la frecuencia a las que aparece las bandas características correspondientes a ácidos carboxílicos.

Absorción Infrarrojo para ácidos carboxílicos (21).

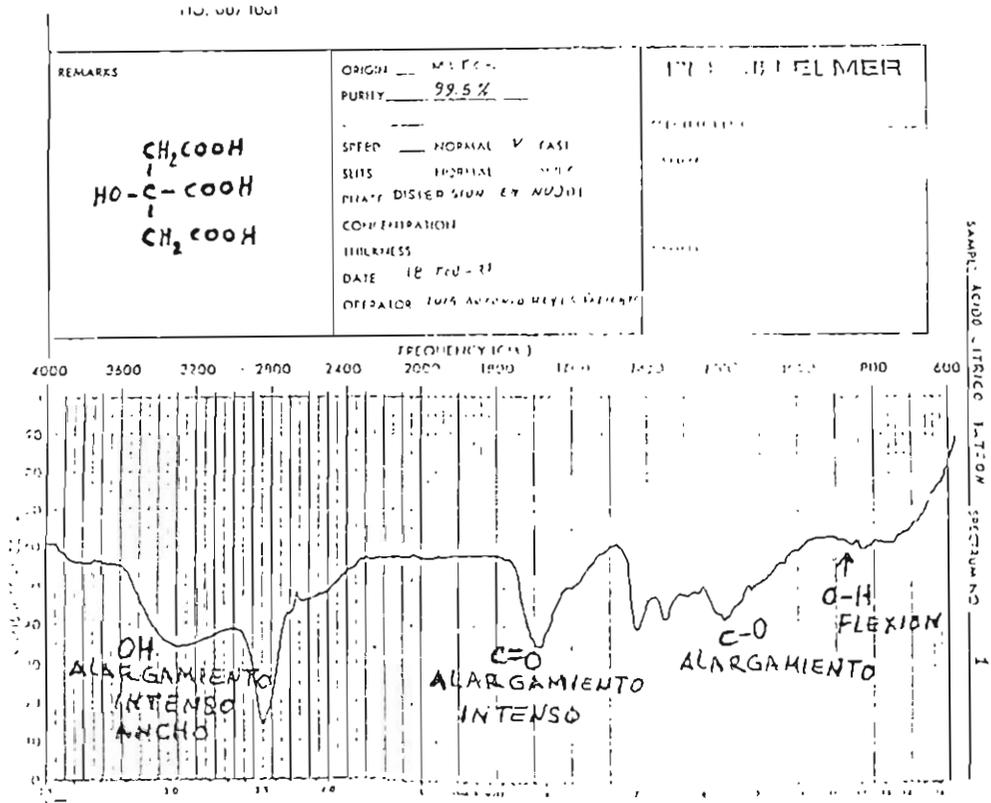
Compuesto	O - H	C - O	C = H	O - H*
Acido Cítrico	Alargamiento 2500-3000 cm - 1 La frecuencia es muy intensa y ancha	Alargamiento 1250 cm - 1	Alargamiento 1680-1725 cm - 1	Flexión 1000-800 cm - 1

* Debería aparecer una banda entre 1000-800 cm-1, pero que tanto en el espectro patrón como en el de la muestra problema no puede apreciarse dicha banda y esto posiblemente se ha debido a la resolución que presenta el aparato. (Perkin Elmer 714 IR).

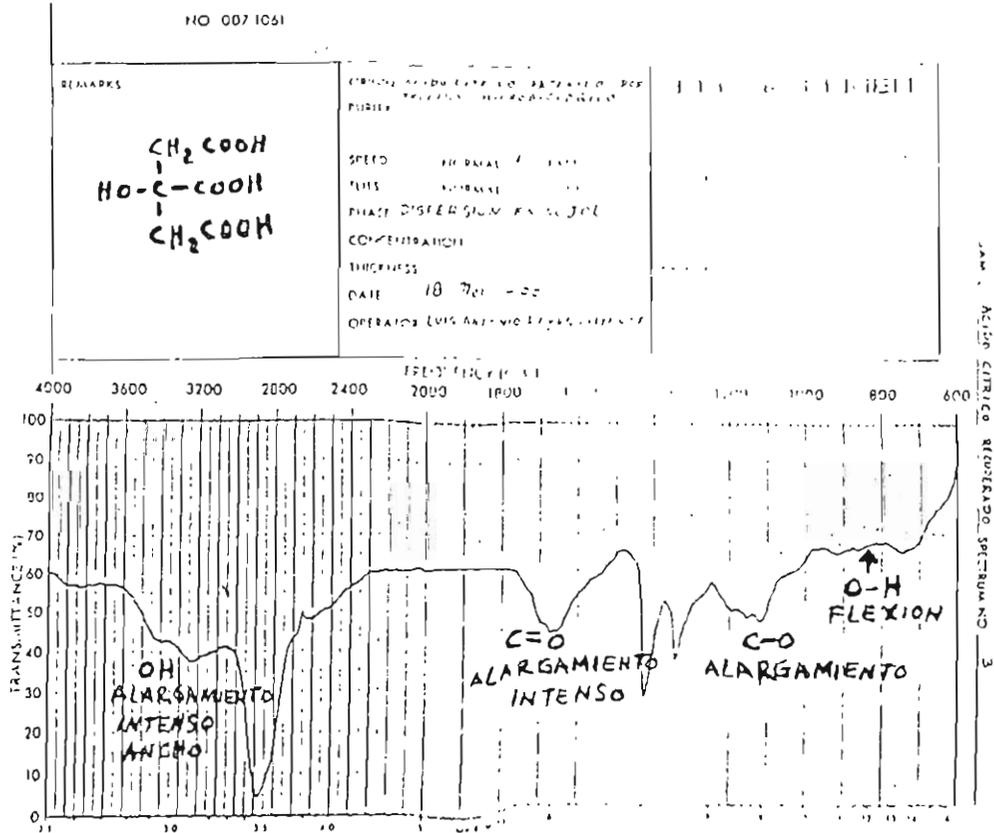
De acuerdo a la obtención de espectros, se tiene que el espectro infrarrojo del ácido producido en este trabajo (espectro No. 2) es semejante al espectro obtenido del ácido cítrico, calidad Merck que se utilizó como patrón y cuya pureza es de 99.5 por ciento (espectro No. 1) y como tal pueden apreciarse a continuación.

ESPECTROS INFRARROJOS, CON SUS BANDAS CARACTERISTICAS

ESPECTRO No.1. ACIDO CITRICO PATRON.



ESPECTRO No.2. ACIDO CITRICO PRODUCIDO.



VII. CONCLUSIONES .

Después de obtener ácido cítrico, por método microbiológico utilizando el jugo (sustrato) de cáscara de piña se llegó a las siguientes conclusiones:

1. El jugo contenido en la cáscara de piña, puede tener perspectivas en la búsqueda y desarrollo de procesos de Bioconversión, para la obtención de productos útiles.
2. El *Aspergillus niger* requiere de una adaptación o aclimatación previa, para mantener la capacidad de producir ácido cítrico.
3. Dado que el *A. niger*, puede utilizar en su metabolismo el ácido cítrico producido, se hace necesario estandarizar el tiempo de cosecha en el proceso fermentativo, evitando de esta forma el consumo de dicho ácido por el microorganismo.
4. De acuerdo a la experiencia obtenida, se puede decir que no se saca ventaja el utilizar concentraciones altas de azúcar en los procesos de fermentación, ya que para un mejor aprovechamiento de esto es necesario mantener un balance entre la concentración de azúcar y el inóculo.
5. Ya que a los nueve días de fermentar 100 mililitros de jugo de piña concentrado a 20.54°Brix se obtiene 1.95 gramos de ácido cítrico, se puede considerar de bajo rendimiento.

6. El bajo rendimiento posiblemente se deba a la presencia de hierro (ver análisis químico, apéndice, pág. 73) ya que éste activa la enzima deshidrogenasa del ácido isocítrico y por ende no hay suficiente acumulación de ácido cítrico en el medio de cultivo.
7. Al parecer lo fundamental de la fermentación reside en la composición del medio de cultivo, el tipo de cepa utilizada y acidez de dicho medio.

VIII. RECOMENDACIONES .

1. Para clarificar el jugo extraído de las cáscaras de piña, se recomienda centrifugar o calentar y por decantación eliminar la pulpa y coloides presentes en éste. Luego dicho jugo utilizarlo en la fermentación respectiva.
2. La presencia de la flora natural y la contaminación al manipular el jugo extraído puede provocar una fermentación no deseada, por lo que se recomienda esterilizar inmediatamente después de haber clarificado, y almacenar en forma aséptica.
3. Para conseguir un buen rendimiento, se recomienda que la cepa de *A. niger*, se mantenga en forma activa, es decir debe estarse cultivando en medios de cultivo, de sólidos a líquido y de líquido a sólido con el fin de que no pierda las características fisiológicas para la producción de ácido cítrico.
4. Durante el proceso de fermentación, se recomienda mantener una vigilancia constante del PH, exámen microscópico, regulación del aire (estéril), la temperatura y la formación de espuma; ya que al no controlar de estos factores puede afectar al rendimiento de ácido cítrico.
5. Se recomienda utilizar un secuestrante del hierro para lograr acumular ácido cítrico, ya que de esta manera se estaría

inactivando la enzima deshidrogenasa del ácido isocítrico y favoreciendo la acumulación de ácido cítrico en el medio de cultivo. (2, 25).

6. Se recomienda cuantificar analíticamente la cantidad de azúcar presente en el extracto inicial y el aprovechable durante el proceso microbiológico, logrando establecer así la cantidad de azúcar consumido por el *A. niger*.
7. Ya que en nuestro país el ácido cítrico tiene un uso amplio tanto en la Industria Farmacéutica y cosmética, en medicina e Industria alimenticia, se sugiere trabajar en procesos microbianos para desarrollar una técnica de producción de este ácido y aprovechar de tal manera los subproductos agroindustriales en forma adecuada para satisfacer la demanda en un futuro.
8. Considerando que la piña es un recurso natural renovable, se recomienda explotar integralmente este recurso ya que puede presentar muchas ventajas económicas.

IX. BIBLIOGRAFIA .

1. Anuarios de Estadísticas Agropecuarias, Ministerio de Agricultura y Ganadería, Dirección General de economía Agropecuaria. 1977-1987, San Salvador, El Salvador, C.A.
2. Antillón, Gladis Margoth. Obtención del Acido Cítrico por Fermentación. Tesis, Octubre de 1971.
3. Braverman, J. B. S. Chemical Composition and Chemical Technology. - New York. Interscience Publishers, Inc., 1949.
4. Brock, T.D. Biology Of Microorganisms. New Jersey, Prentice-Hall Inc. 1970.
5. Cedillos, M. R. y Koun-Chou, C. Propagación de Piña por Hoja. CENTA, San Andrés, La Libertad, Mayo de 1985.
6. Conant, N. F. et. al., Micología, Tercera Edición, Editorial Interamericana, México, 1972.
7. Desorier. N. W. Elementos de Tecnología de Alimentos. México, D.F. Compañía Editorial Continental S.A., 1977.
8. Documentos Técnicos Sobre Aspectos Agropecuarios, Frutales II, manual Técnico Número Tres, CENTA, Abril 1980.
9. Deacon, J. W. Introducción a la Micología Moderna, Editorial Limusa, México, D.F., 1988.

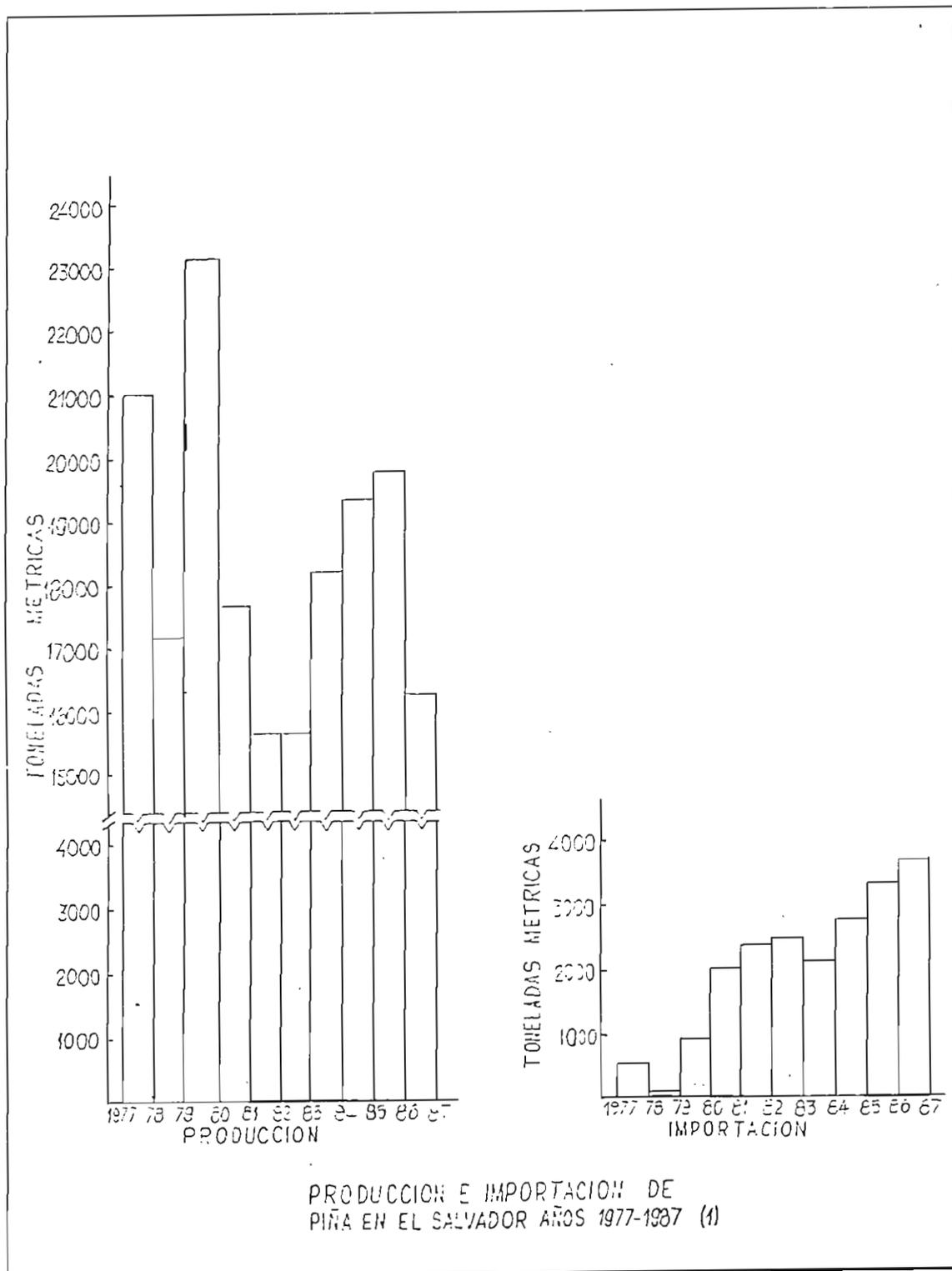
10. Frazier, W. C. *Microbiología de los Alimentos*, Zaragoza (España), Editorial Acribia, 1976.
11. Fuentes Soles, W. *Industrialización Integral de la Piña en México*. Veracruz Alimentos HP. S.A. Los Robles, 1975.
12. García Hernández, F. y Pérez J. L. *Fermentación de Desechos Agro-Industriales para la Obtención de Metabolitos de Interés Industrial*. Departamento de Biología del Desarrollo, Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM. Boletín de Estudios Médicos y Biológicos, México. Suplemento uno, Vol. 32, Número 7 y 8; 1983. pág. 177-195.
13. *Guía Técnica Agropecuaria, Documento Preliminar, manual Técnico Número uno*, CENTA, Enero 1980.
14. Gilman, A. G., Goodman, L. S. Rall, T. W. y Murad, F. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Séptima Edición, Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires Argentina, 1987.
15. Haen, H. *Bioquímica de las Fermentaciones*, Editorial Aguilar, Madrid, 1956.
16. Huitrón, C. *Recopilación de Simposio sobre Biotecnología de Enzimas*. México D.F. Universidad Autónoma de México, 1983.
17. Joergensen, A. *Microbiología de las Fermentaciones*, Barcelona, Reverté, 1977.

18. Koun-Chou, C. El Cultivo de la Piña en El Salvador, Boletín Divulgativo Número 32, CENTA-Misión Técnica Agrícola de la República de China, Julio de 1985.
19. Kretzschmar, H. Levaduras y Alcoholes. México D.F., Editorial Reverté, S.A., 1961.
20. Manual de Microbiología Industrial, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, 1987.
21. Morrison, R. T. and Boyd, R. N., Organic Chemistry Third Edition, Boston, Allyn And Bacon, Inc., 1976.
22. Pelczar, J. y Chan, E. C. S. Elementos de Microbiología, Traducción de la Primera Edición Inglesa por Rodríguez, J. García y J. Nombela, C. México D.F. Libros Mc-Graw-Hill de México, S.A., 1984.
23. Peppler, H. J., Perlman, D., Microbial Technology, Microbial Processes; Production of Organic Acids by Fermentation, Segunda Edición, Vol. 1. New York. Academic Press, 1979.
24. Py, C. La Piña Tropical, Madrid, Colección Agricultura Tropical, Editorial Blume, 1968.
25. Rhodes, A. y Fletcher, D. L. Principios de Microbiología Industrial. Zaragoza (España), Editorial Acribia-Royo, 1969.
26. Rhose, A. H., Microbiología Química, Madrid, Editorial Alhambra S.A. 1969.

27. Sánchez, S. Cultivo del Limonero Industrialización, México D.F., - Secretaría de Agricultura y Fomento. Dirección General de Agricultura, 1942.
28. Saballos, P. M. H., y Velis, M. A. Evaluación de Productos Químicos Para Combate de gallina Ciega - *Phyllo - Phaga* spp. y Pudricción causada por *Phytophthora* spp. En el Cultivo de Piña. CENTA, Mayo de 1985.
29. Sibaja, R et al, Obtención de Celulosa y Carboximetil Celulosa a partir de Desechos Industriales. J. P. S. F. Nuevo Boletín, Número 4 (Proyecto Especial de Materias Primas con Aplicación en la Industria Químico-Farmacéutica, Patrocinado por la O.E.A.) San José Costa Rica, 1987.
30. Spencer, Gy Meade, manual del Azúcar de Caña, Traducción de la Novena Edición en Inglés por Juan Roget Paija. Barcelona, Montaner y Simón, S.A., 1967.
31. Tabla de Composición de Alimentos para uso en América Latina. Comité Inter Departamental de Nutrición para la Defensa nacional, Instituto Nacional para Artritis y Enfermedades Metabólicas, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Maryland, E. I. U. U. y del INCAP. Ciudad de Guatemala, Guatemala C.A., Junio de 1961.
32. United States Pharmacopeia XX, 1980. Pág. 152

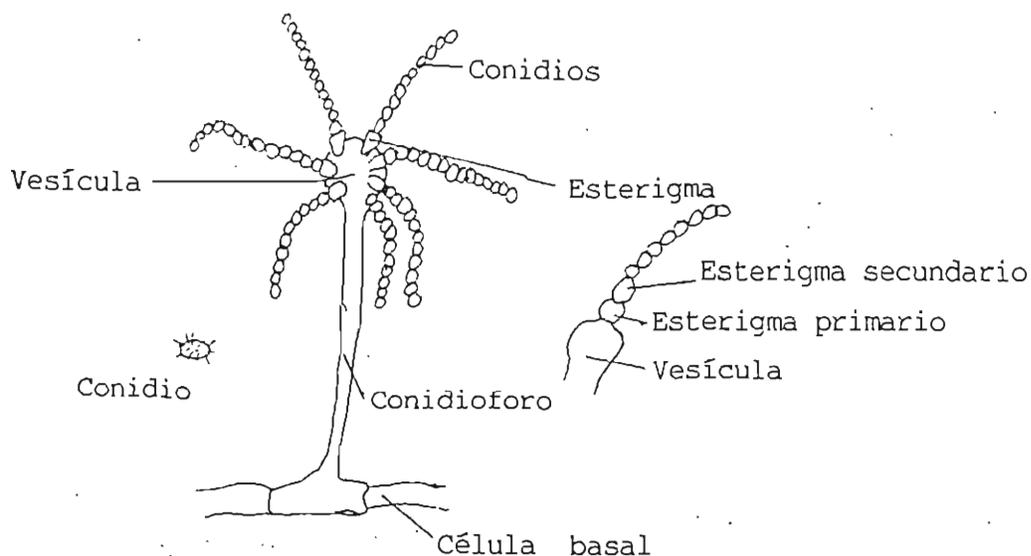
A P E N D I C E

A. PRODUCCION E IMPORTACION DE PIÑA.



B. CLASIFICACION DEL *Aspergillus niger** (9,22)

Reino	Fungi (Whittaker, 1969)
División	Eumycota
Sub-división	Deuteromycotina
Clase	Hyphomycetes
Sub-Clase	No hay
Orden	Hyphomycetales
Familia	Moniliaceae
Género	<i>Aspergillus</i>
Especie	<i>niger</i>

DIAGRAMA DEL *Aspergillus niger* (10,22).

* Clasificación más aceptada por el Instituto Micológico de Inglaterra.

C. DETERMINACION PESO SECO.

Procedimiento :

- a) Filtrar al vacío 100 ml. de medio de cultivo previamente esterilizado, en un papel filtro tarado.
- b) Lavar con agua para arrastrar materiales extraños a los --miscélios.
- c) Secar en estufa, papel filtro más miscelios, a una temperaatura de 80°C, hasta llevar a peso constante.
- d) Determinar peso seco (miscelios), en balanza analítica.

Peso seco = (Tara de papel filtro + miscelios) - (Tara de pa-
pel filtro).

D. TABLA DE CORRECCIONES PARA GRADOS BRUX EN BASE A
LA TEMPERATURA. (30)

Tabla internacional de corrección de temperatura (1936) para el modelo normal de refractómetro, por encima y por debajo de 20 °C

Temp. °C	Porcentaje de sacarosa														
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70
	Réstese del porcentaje de sacarosa														
10	0.50	0.54	0.58	0.61	0.64	0.66	0.68	0.70	0.72	0.73	0.74	0.75	0.76	0.75	0.79
11	0.46	0.49	0.53	0.55	0.58	0.60	0.62	0.64	0.65	0.66	0.67	0.68	0.69	0.70	0.71
12	0.42	0.45	0.48	0.50	0.52	0.54	0.56	0.57	0.58	0.59	0.60	0.61	0.61	0.63	0.63
13	0.37	0.40	0.42	0.44	0.46	0.48	0.49	0.50	0.51	0.52	0.53	0.54	0.54	0.55	0.55
14	0.33	0.35	0.37	0.39	0.40	0.41	0.42	0.43	0.44	0.45	0.45	0.46	0.46	0.47	0.48
15	0.27	0.29	0.31	0.33	0.34	0.34	0.35	0.36	0.37	0.37	0.38	0.39	0.39	0.40	0.40
16	0.22	0.24	0.25	0.26	0.27	0.28	0.28	0.29	0.30	0.30	0.30	0.31	0.31	0.32	0.32
17	0.17	0.18	0.19	0.20	0.21	0.21	0.21	0.22	0.22	0.23	0.23	0.23	0.23	0.24	0.24
18	0.12	0.13	0.13	0.14	0.14	0.14	0.14	0.15	0.15	0.15	0.15	0.16	0.16	0.16	0.16
19	0.06	0.06	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
	Síntese al porcentaje de sacarosa														
21	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.09	0.09	0.09	0.08
22	0.13	0.13	0.14	0.14	0.15	0.15	0.15	0.15	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
23	0.19	0.20	0.21	0.22	0.22	0.23	0.23	0.23	0.23	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
24	0.26	0.27	0.28	0.29	0.30	0.30	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.32	0.32	0.32	0.32
25	0.33	0.35	0.36	0.37	0.38	0.38	0.39	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
26	0.40	0.42	0.43	0.44	0.45	0.46	0.47	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48	0.48
27	0.48	0.50	0.52	0.53	0.54	0.55	0.55	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56
28	0.56	0.57	0.60	0.61	0.62	0.63	0.63	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64
29	0.64	0.66	0.68	0.69	0.71	0.72	0.72	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73
30	0.72	0.74	0.77	0.78	0.79	0.80	0.80	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81	0.81

Ejemplo: Del uso de la tabla.

Si se lee 11.74 °Brix en un refractómetro y la temperatura es de 27°C.
La lectura se corrige de esta manera:

1. Ubicamos los 11.74 °Brix en la columna de 10% de sacarosa (Columna Vertical)
2. Tomamos 27°C (Columna Horizontal)
3. Leemos el valor de 0.52 (Intercepto de columna vertical con Horizontal).
4. Luego, a 11.74 le sumamos 0.52 (11.74 + 0.52 = 12.26 °Brix).
5. Forma corregida 12.26 °Brix.

Notas :

1. Esta tabla toma de referencia 20°C. De donde : Si la lectura, -
esta por debajo de esta temperatura se resta y si es mayor de
20°C se suma el valor de corrección.
2. Para ubicar el porcentaje de azúcares, se puede utilizar ya -
sea el próximo menor o al próximo mayor según sea el caso.

E. METODO DE SAFFRAN - DENSTED.

- Método SaffranDensted

- Principio del método :

Se obtiene un filtrado de la muestra y éste se trata con piridina y anhídrido acético y se forma con el ácido cítrico un compuesto de color amarillo, el color obtenido se mide por espectrofotometría.

1. Construir curva patrón.

Procedimiento :

1.1. Disolver 400 mg. de ácido cítrico en 1000 ml de H₂O destilada.

1.2. De la solución anterior efectuar diluciones en tubos con tapón de rosca, que contenga de 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 ml de la solución de ácido cítrico. Luego completar hasta un mililitro con agua destilada. Como blanco utilizar H₂O destilada y tratarlo como las otras diluciones enunciadas.

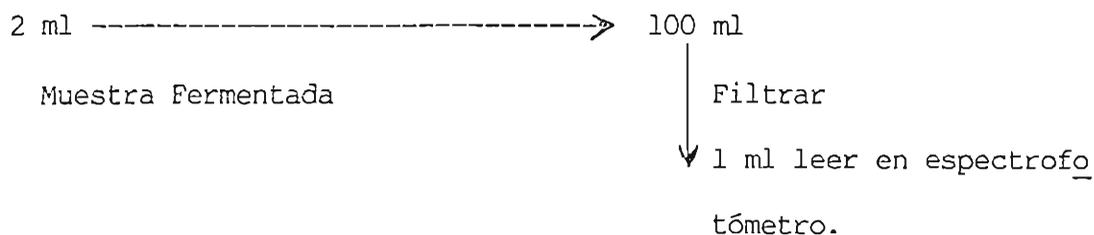
1.3. A cada tubo preparado en 1.2 adicionar 8 ml de anhídrido acético y colocar a 60°C en un BM durante 10 minutos.

1.4. Seguidamente agregar un mililitro de piridina a cada tubo llevándose a B.M por 40 minutos.

1.5. Enfriar y realizar lecturas en espectrofotómetro en la región visible a una $\lambda = 418$ nm.

1.6. Construir curva de calibración.

2. Determinación de Acido Cítrico Fermentado



1. Para un mililitro del fermentado, (tratado según marcha) tratarlo - como en el paso 1.3 hasta 1.5, luego interpolar en curva de calibración y determinar la cantidad de ácido cítrico producido.

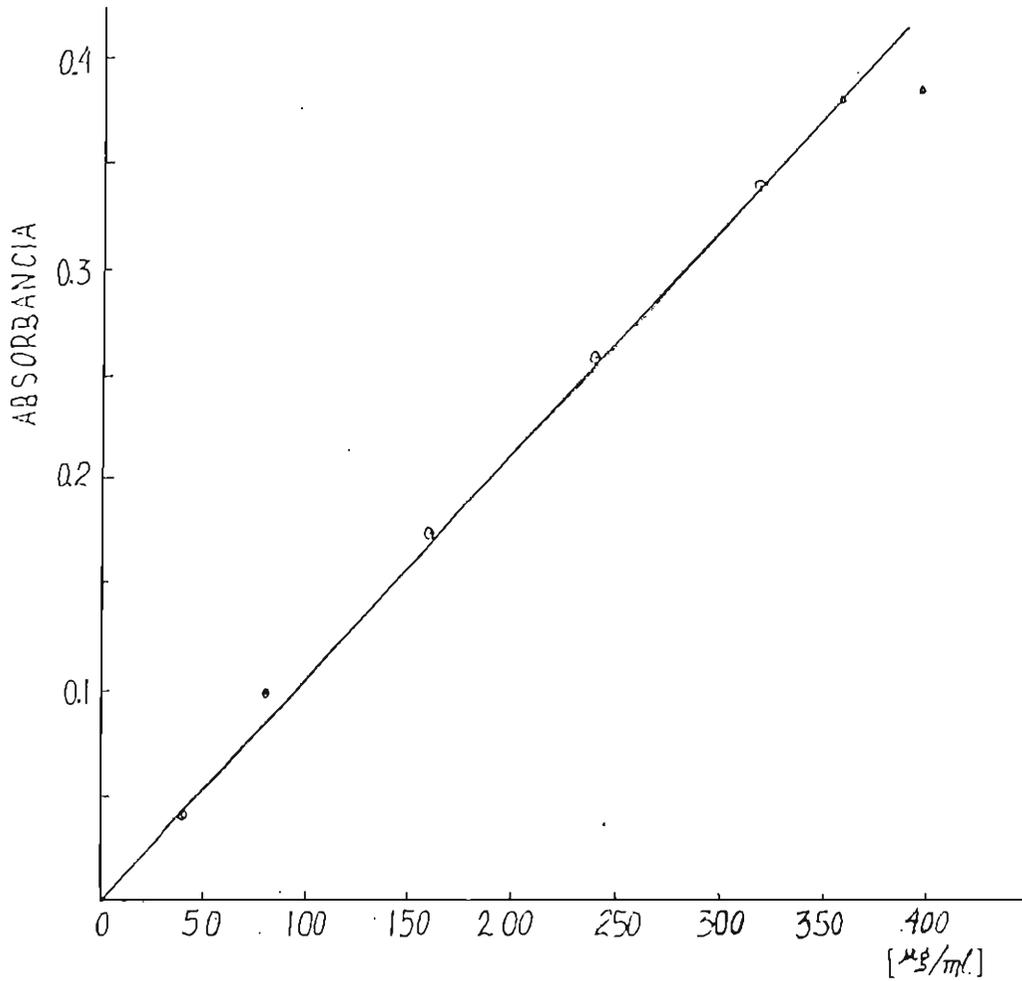
Notas :

En los pasos 1.3 y 1.5 hay que mantener cerrado los tubos, para que no se evapore el anhídrido acético.

Para la determinación del ácido cítrico fermentado tomar 2 ml ó la alícuota adecuada del medio de cultivo.

ESTANDARES DE ACIDOCITRICO
A 418 nm.

[$\mu\text{g}/\text{ml}$.]	ABSORBANCIA
0.0	0.0
40.0	0.040
80.0	0.100
160.0	0.175
240.0	0.260
320.0	0.340
360.0	0.380
400.0	0.386

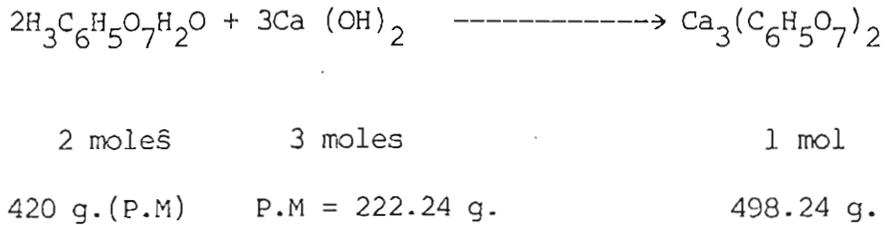


CURVA ESTANDAR de ACIDO CITRICO a 418 nm

F. CALCULOS ESTEQUIOMETRICOS PARA ENCONTRAR LA CANTIDAD
NECESARIA DE Ca(OH)_2 Y H_2SO_4 PARA LA RECUPERACION
DEL ACIDO CITRICO.

A. Precipitación de Citrato de Calcio.

Reacciones :



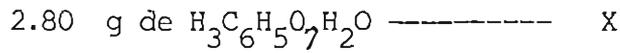
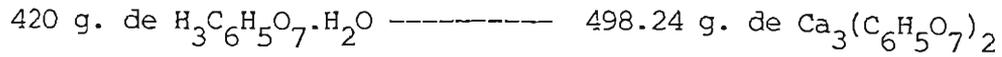
Sí en la producción de ácido cítrico se encontró 2.80* g. por cada 100 ml de medio de cultivo, entonces.

$$\frac{222.24 \text{ g. de Ca(OH)}_2 \times 2.80 \text{ g. H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{H}_2\text{O}}{420 \text{ g. de H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{H}_2\text{O}} = 1.48 \text{ g. de Ca(OH)}_2$$

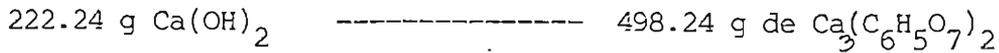
Luego por cada 1.48 g. de Ca(OH)_2 se utilizó 6.5 ml de agua para formar lechada.

Seguidamente se tiene:

* Valor máximo encontrado a los 9 días de iniciado el proceso fermentativo (ver cuadro No. 3, pág 41).

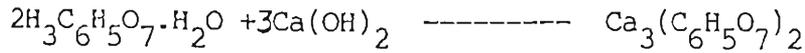


$$X \cong 3.32 \text{ g. de } \text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$$



$$X = 3.32 \text{ g}$$

Teóricamente se tiene esta ecuación estequiométrica.

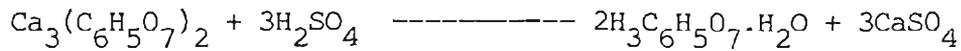


$$\text{P.M. } 420 \text{ g.} \quad \text{P.M. } 222.24 \text{ g.} \quad \text{P.M. } 498.24 \text{ g.}$$

$$2.80 \text{ g.} \quad 1.48 \text{ g.} \quad 3.32 \text{ g. Datos Experimentales.}$$

B. Descomposición del Citrato de Calcio.

Reacción Típica Principal.



$$1 \text{ mol} \quad 3 \text{ moles} \quad 2 \text{ moles}$$

$$\text{P.M} = 498.24 \text{ g.} \quad \text{P.M } 294.192 \text{ g.} \quad \text{P.M} = 420 \text{ g.}$$

$$294.192 \text{ g } 3\text{H}_2\text{SO}_4 \times 3.32 \text{ g} = 1.96 \text{ g. H}_2\text{SO}_4$$

498,24 g. Citrato de calcio

H_2SO_4 : 98 % de pureza y D = 1.84

Si para trabajar lo necesitamos al 20% tenemos :

$$98 \text{ g H}_2\text{SO}_4 \text{ ----- } 100 \text{ ml de solución}$$

$$100 \text{ g H}_2\text{SO}_4 \text{ ----- } x$$

$$x = 102.04 \text{ ml (solución)}$$

Luego si : $100 \text{ g} \text{ ----- } 102.04 \text{ ml de solución}$

$$20 \text{ g. ----- } x$$

$$x = 20.408 \text{ ml.}$$

Entonces para tenerlo al 20%

Medir 20.408 ml de H_2SO_4 al 98% y aforar a 100 ml, para tenerlo al 20%.

Equivalencia :

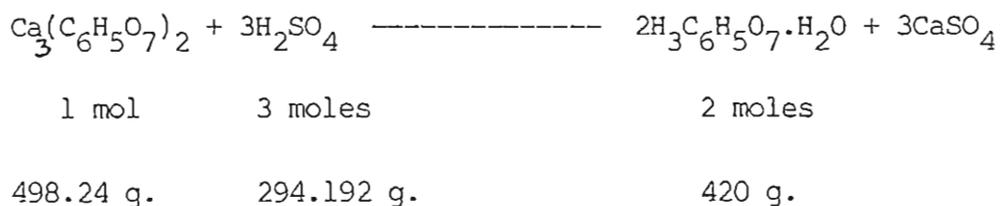
Si encontramos que 1.96 g H_2SO_4 se necesitan para regenerar al ácido tenemos:

$$20 \text{ g} \text{ ----- } 100 \text{ ml}$$

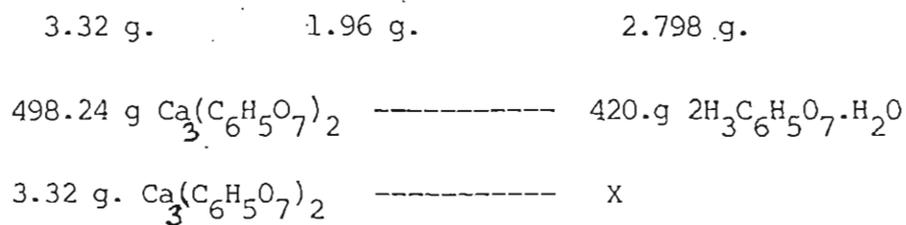
$$1.96 \text{ g} \text{ ----- } x$$

$$x = 9.8 \text{ ml solución al 20\% (1.96 g H}_2\text{SO}_4)$$

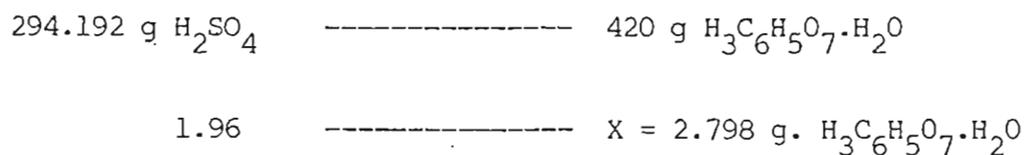
Entonces la ecuación final es :



Experimentalmente se tiene :



$$X = 2.798 \text{ g H}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$$



G. MEDIOS DE CULTIVOS.

Medios papa dextrosa agar.

Papa - Dextrosa (PDA)

Papa rallada 200 g.

Dextrosa (Glucosa)..... 20 g.

Agar 20 g.

Agua destilada C.S.P..... 1000 ml.

Lavar las papas en agua destilada (sin pelar). Triturarlas y dejarlas en agua destilada por 1¹/₂ horas.

Hervir a fuego lento y en baño de María por una hora.

Colar pero no filtrar. Reponer el volumen con agua destilada.

Medio Foster :

Procedimiento .

1. Pesar :

Glucosa 5 g.

Peptona 0.5 g.

Fosfato monoprótico de potasio 0.1 g.

Sulfato de magnesio heptahidratado..... 0.1 g.

Agar agar 2.0 g.

2. Disolver en 100 ml de agua destilada, y calentar hasta fundir el agar - agar. (Utilizando Erlenmeyer adecuado).
3. Esterilizar a 15 lbs, 15 minutos y 121°C.

Notas :

1. Para dispensar en tubos inclinados para formar bisel se coloca de 5-6 ml. de medio de cultivo en tubos de 13 x 100 mm. y se procede a esterilizarlas, después de esterilizado se inclinan - los tubos hasta que solidifique dicho medio (utilizando como so porte agitadores de vidrio).
2. Para dispensar en placas de Petri, una vez esterilizado el medio de cultivo, se vierte sobre dichas placas a una temperatura entre 35 y 40°C.
3. Para pruebas cualitativas (demostrar la producción de ácido cítrico por *A. niger*) se agrega 6.7 ml del indicador verde de bromocresol por cada 100 ml de medio.

Medio de Sabouraud.

Composición (g/litro)

Peptona de carne	5.0
Peptona de caseína	5.0
D (+) - Glucosa	40.0
Agar - agar	15.0

Preparación :

Disolver 65 g/litro y esterilizar al autoclave.

Medio de montaje para observaciones microscópicas.

Lactofenol - Azul algodón.

Fenol (cristales)	20.0 g.
Acido láctico.....	20.0 g.
Glicerina	40.0 g.
Agua destilada	20.0 g.
Azul algodón	0.5 g.

Nota : Se puede usar azul tripan a cambio de azul-algodón.

Indicador : Verde bromocresol

Cambios de PH

Alcalino Azul

Acido Amarillo

Preparación :

Un gramo de verde de bromocresol se disuelve en 14 ml. de NaOH 1 N y se afora a 250 ml con agua destilada.

Preparación :

Disolver 65 g/litro y esterilizar al autoclave.

Medio de montaje para observaciones microscópicas.

Lactofenol - Azul algodón.

Fenol (cristales)	20.0 g.
Acido láctico.....	20.0 g.
Glicerina	40.0 g.
Agua destilada	20.0 g.
Azul algodón	0.5 g.

Nota : Se puede usar azul tripan a cambio de azul-algodón.

Indicador : Verde bromocresol

Cambios de PH

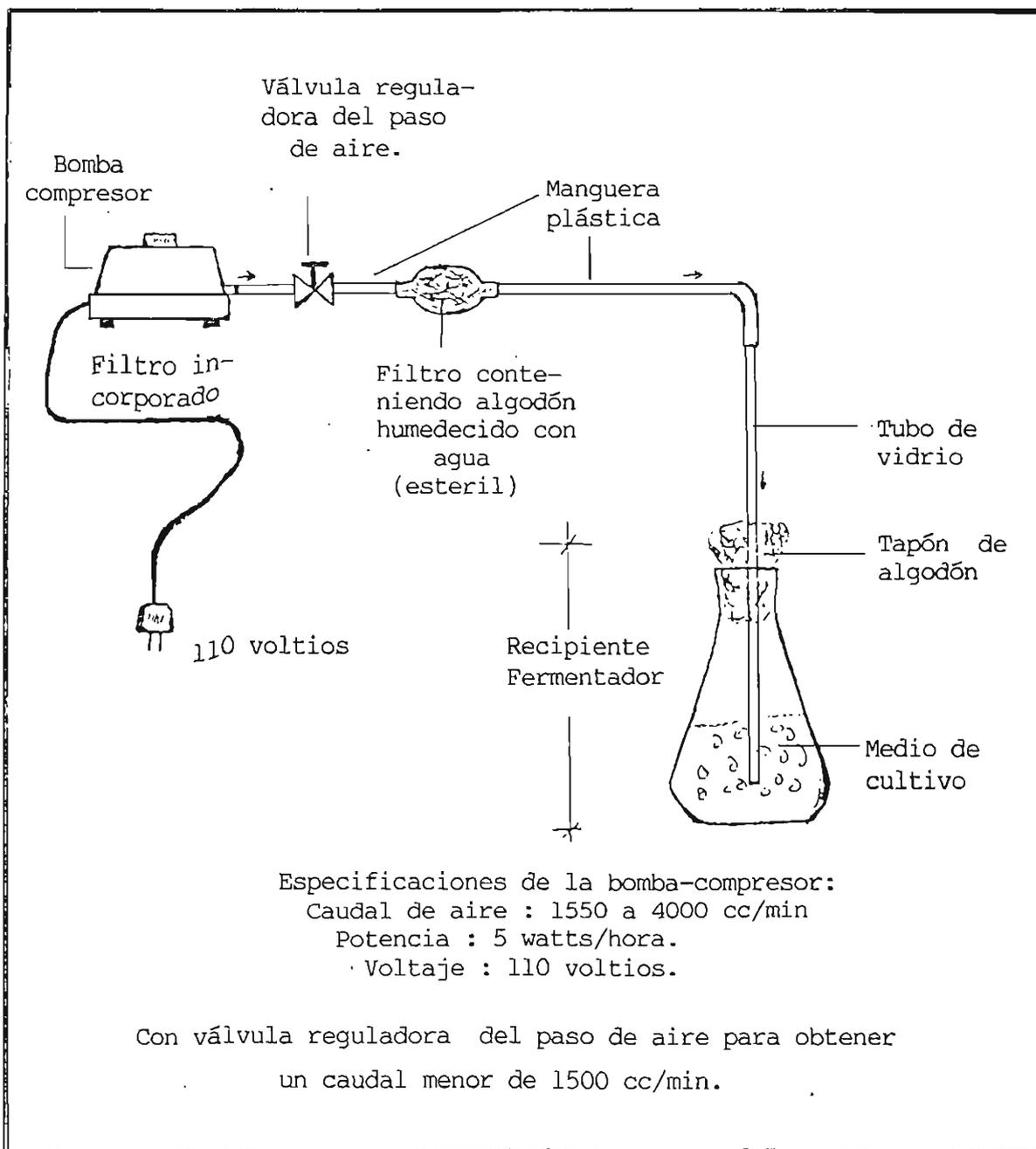
Alcalino Azul

Acido Amarillo

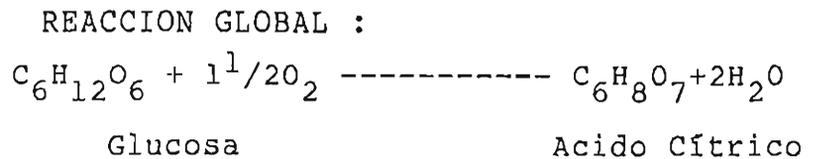
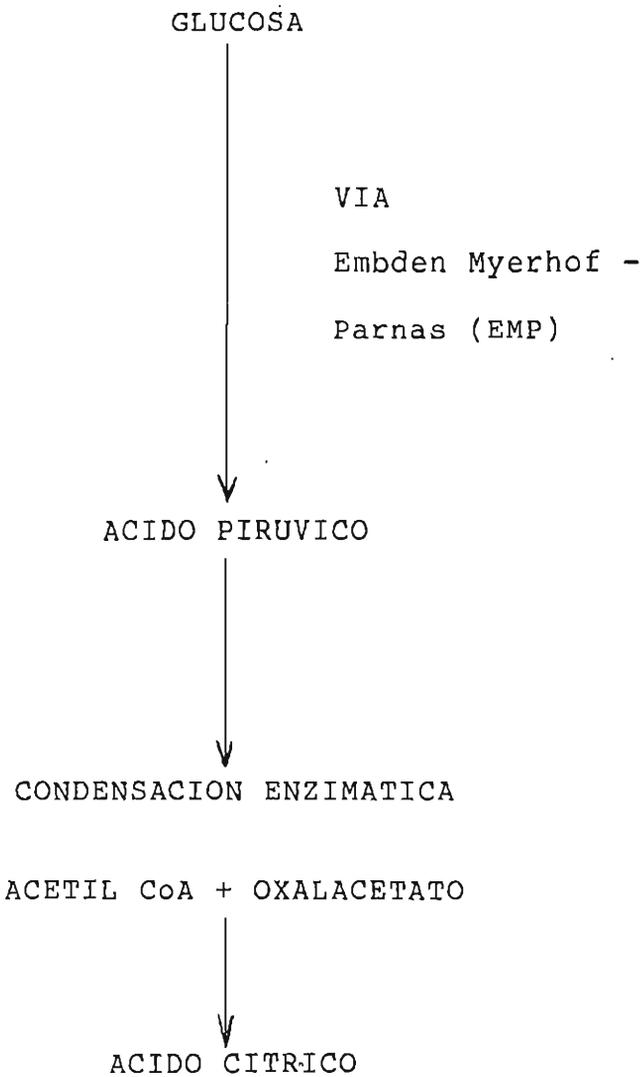
Preparación :

Un gramo de verde de bromocresol se disuelve en 14 ml. de NaOH 1 N y se afora a 250 ml con agua destilada.

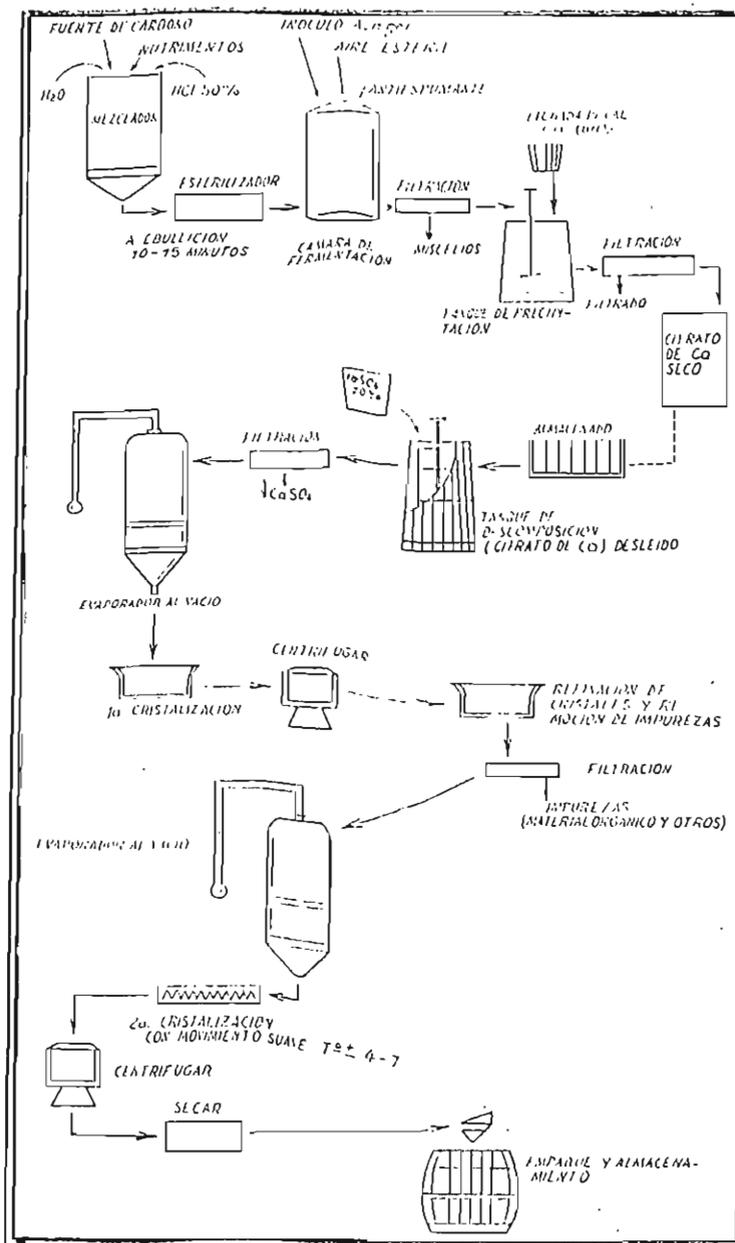
H. ESQUEMA DEL SISTEMA FERMENTATIVO, UTILIZADO A
NIVEL DE LABORATORIO PARA CULTIVO SUMERGIDO.



I. SECUENCIA BIOQUIMICA PARA LA OBTENCION DE ACIDO CITRICO
 POR PROCESO MICROBIOLOGICO (23).



J. DIAGRAMA GENERAL DE FLUJO* PARA EL PROCESO DE FABRICACION DEL ACIDO CITRICO.

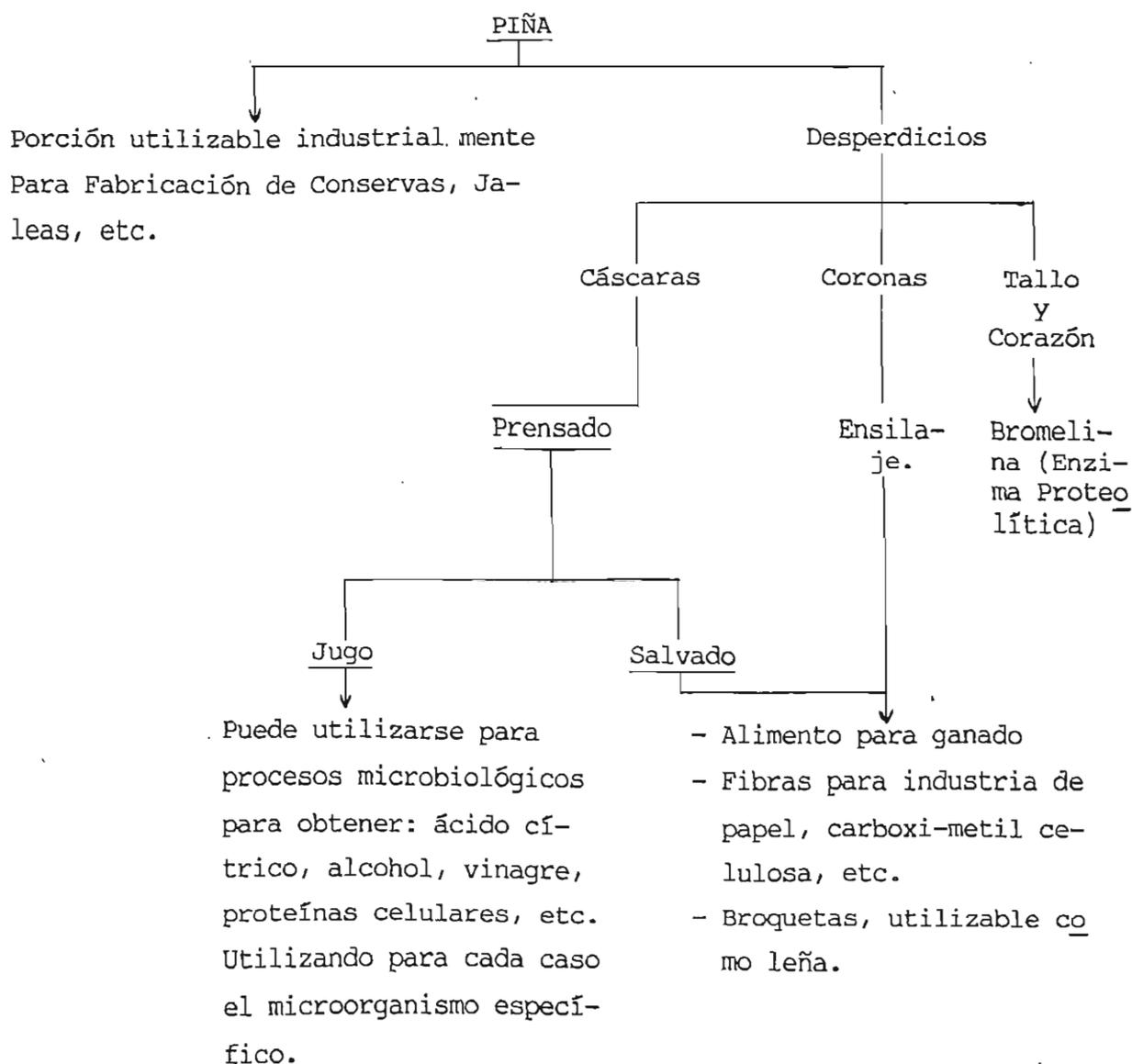


* Del autor.

K. COMPOSICION POR 100 g. DE PORCION COMESTIBLE DE
 PIÑA (Ananas comosus). (31)

Valor energético	52 Cal
Humedad	85.4 %
Proteínas	0.4 g.
Grasa	0.2 g.
Hidratos de carbono totales	13.7 g.
Fibra	0.4 g.
Cenizas	0.3 g.
Ca	18. mg.
P	8. mg.
Fe	0.5 mg.
Vitamina A actividad	15. mcg.
Tiamina	0.08 mg.
Riboflavina	0.04 mg.
Niacina	0.2 mg.
Acido Ascórbico	61.0 mg.
Porción no comestible	41 % cáscara, 66 % corazón y co- rona.

L. ESQUEMA QUE REPRESENTAN EL APROVECHAMIENTO
DE LA PIÑA.



Nota : Los hijuelos no aparecen en dicho esquema, ya que pueden conservarse para nuevas plantaciones.