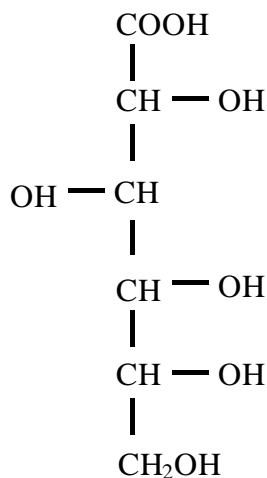


## TRABAJO PRACTICO PRODUCCION DE ACIDO GLUCONICO Y SUS DERIVADOS

El ácido glucónico (pentahidroxicaproico) es el producto de oxidación de la D-glucosa en el C<sub>1</sub>.



Este ácido presenta un pKa = 3.7

En soluciones acuosas el ácido se encuentra en equilibrio con la  $\delta$  y  $\gamma$  lactonas que son los productos directos de la deshidrogenación de la glucosa.

Soluciones sobresaturadas de ácido glucónico rinden cristales del ácido (o el monohidrato de éste) a temperaturas inferiores a 30°C, cristales de la  $\delta$  lactona se obtienen entre 30 y 70 °C y de la  $\gamma$  lactona a temperaturas superiores a los 70 °C.

Acido D-glucónico

### Usos

El ácido glucónico no se comercializa en forma cristalina sino que se ofrece en soluciones al 50%. La  $\delta$  lactona es comercializada en forma cristalina. Tanto el ácido, como sus lactonas, se utilizan fundamentalmente como acidulantes para alimentos. La  $\delta$  lactona es usada universalmente como un ácido latente en polvos para hornear, sustancias leudantes para panificación y mezclas para preparar tortas.

La sal sódica del ácido glucónico es el derivado con mayor importancia comercial. Debido a sus excelentes propiedades como agente complejante se lo utiliza en soluciones lavadoras de material de vidrio, soluciones alcalinas de NaOH, particularmente en el caso de botellas retornables. Los carbonatos de metales di y trivalentes son fácilmente removidos por estas soluciones.

También se utiliza el gluconato de sodio en cementos mezclas donde modifican las propiedades de fraguado e incrementan la dureza y resistencia al agua del cemento.

El gluconato de calcio es ampliamente usado para el tratamiento de enfermedades que

producen déficit de calcio o para suplir este metal durante el embarazo.

El gluconato de hierro(II) es utilizado para suministrar este metal en casos de anemia.

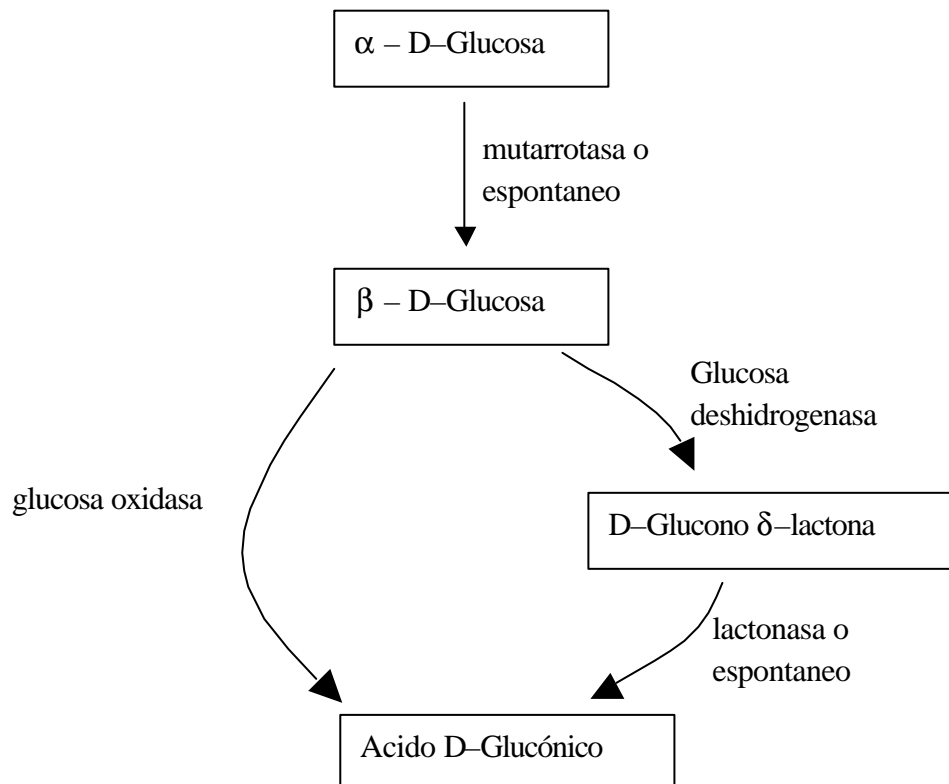
### Microorganismos empleados y rutas metabólicas

Si bien es posible oxidar la D-glucosa a D-glucono- $\delta$ -lactona por métodos electroquímicos, químicos y enzimáticos, el método fermentativo es el actualmente utilizado por su bajo costo.

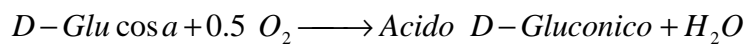
Gran variedad de bacterias y hongos producen glucónico a partir de glucosa. Los más utilizados son los hongos y entre ellos cepas de *Aspergillus niger* siendo en general la cepa de elección la NRRL 3 debido a que no produce paralelamente ácidos cítrico y oxálico bajo condiciones de operación.

Entre las bacterias la única utilizada industrialmente es *Gluconobacter suboxydans*.

En *A. niger* la ruta metabólica que lleva a glucónico se observa en la figura:



La principal enzima involucrada en la oxidación de la  $\delta$ -D-glucosa es la comúnmente llamada glucosa oxidasa. Esta enzima es una flavoproteína que remueve dos hidrógenos de la glucosa reduciéndose. La forma reducida de la enzima luego se reoxida con oxígeno molecular dando agua oxigenada que es luego hidrolizada por una catalasa. La ecuación neta se puede escribir



Se ha demostrado para *A. niger* que tanto la glucosa oxidasa como la catalasa se encuentran en peroxisomas evitándose de esta forma la toxicidad por  $H_2O_2$ .

El último paso en la obtención de glucónico es la hidrólisis de la  $\delta$ -lactona. Esta puede ocurrir espontáneamente o por intermedio de una lactonasa (que se halla presente en *A. niger*). La acumulación de la lactona reprime la producción de glucónico. La hidrólisis de la lactona ocurre espontáneamente a alta velocidad a pH neutro o alcalino. A pH ácidos es importante la actividad de la lactonasa.

El pH también es importante para favorecer la ruta metabólica que lleva a la producción de glucónico, ya que a valores de éste neutros o alcalinos *A. niger* produce este ácido casi exclusivamente. Además, a valores de pH entre 1 y 3, el glucónico es rápidamente metabolizado por *A. niger*.

### Estrategias de producción de ácido glucónico y sus derivados

La producción de ácido glucónico o sus sales por *A. Níger* es un proceso muy bien conocido y los diferentes fabricantes en todo el mundo utilizan una tecnología más o menos similar. Se utiliza la cepa NRRL 3 del hongo. Este se hace crecer en superficie hasta obtener abundante esporulación y estos desarrollos son el 'stock' microbiano a partir del cual comienza el proceso. Con los esporos, en general, se siembra el reactor que va a ser utilizado como inóculo del principal. En el inóculo se trata de obtener una elevada masa microbiana y favorecer la síntesis de la glucosa oxidasa, enzima clave en la oxidación de la glucosa. Para ello se trabaja con un medio con elevada concentración de fuentes nitrogenadas y factores de crecimiento, siendo en general utilizados urea o sulfato de amonio y corn steep liquor (agua de hidrolizado de maíz o su forma deshidratada). Se utiliza glucosa o el monohidrato de ésta como fuente de carbono para inducir la glucosa oxidasa.

El reactor donde se realiza el proceso final se siembra con el desarrollo obtenido en los inóculos a razón de un 10% v/v. El medio final de producción tiene una elevada concentración de glucosa y muy baja concentración de fuente nitrogenada (incluso

ésta puede no agregarse) con el objeto de que no haya crecimiento y sí formación de producto. La concentración de glucosa a utilizar depende del derivado del ácido glucónico a obtener. Si se va a obtener la sal sódica se puede utilizar hasta 470 g de glucosa por litro, dada la alta solubilidad de la sal (400 g/L a 30°C). En cambio, cuando se trata de la obtención de gluconato de calcio, dada su menor solubilidad, se trabaja con alrededor de 130 a 150 g/L de glucosa, obteniéndose una solución sobresaturada de la sal.

Debido a lo indicado anteriormente, es necesario controlar el pH a valores cercanos a la neutralidad para favorecer la formación de ácido glucónico. En esta necesidad se basa la estrategia de obtener las diferentes sales de este ácido. Si se va a obtener gluconato de sodio se trabaja controlando el pH a 6.5 por NaOH. En caso de la obtención de la sal de calcio, no se hace control automático de pH, sino que se agrega al inicio del proceso  $\text{CaCO}_3$  en el medio de cultivo, en una concentración tal que neutralice el ácido glucónico que se espera obtener. Si se desea obtener el ácido glucónico y sus lactonas se neutraliza con NaOH, pero al final del proceso se desconecta el control automático de pH obteniéndose una mezcla de gluconato de Na y ácido glucónico a valores de pH alrededor de 3. Luego se desplaza la sal con un ácido fuerte. Lo mismo puede hacerse a partir del gluconato de calcio (soluble) que tratado con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  rinde el ácido glucónico y  $\text{CaSO}_4$  precipitado.

El rendimiento teórico en la producción de glucónico a partir de glucosa, asumiendo que no hay formación de  $\text{CO}_2$ , es de 109 g de ácido/100 g de azúcar. En la práctica se obtienen rendimientos superiores al 90% de este máximo.

La fermentación en escala industrial se realiza a 30-33 °C, el cultivo es agitado y se utilizan volúmenes de aire de 1-1.5 VVM. Además se trabaja, en general, con el reactor presurizado a alrededor de 2 Kg/cm<sup>2</sup>. El tiempo de fermentación, respetando las condiciones de pH, T<sup>0</sup> y aereación ya indicadas, depende fundamentalmente de la biomasa inicial y el estado fisiológico de la misma. En las mejores condiciones se puede llegar a tiempos tan cortos como 19 hs para oxidar completamente alrededor de 200 g/L de glucosa en la producción de gluconato de sodio

Finalizado el proceso se debe separar la biomasa del efluente, donde se halla la sal de glucónico soluble. Este paso se puede hacer tanto por centrifugación como por filtración. El micelio centrifugado puede ser reutilizado hasta 2-3 veces para un nuevo proceso sin pérdida de rendimiento y productividad.

#### Obtención del producto final

Gluconato de calcio: el efluente del medio de cultivo se decolora con carbón activado,

se concentra evaporando el 15-20 % del agua y se deja cristalizar a temperaturas cercanas a 0°C. La sal se filtra y se lavan los cristales con agua fría. Se puede obtener de esta manera un producto con un adecuado grado de pureza. Si se requiere una sal de alto grado de pureza se recristaliza en agua o agua-alcohol.

Gluconato de sodio: La forma comercial de esta sal se puede preparar concentrando el efluente del cultivo a 40-45% de sólidos, ajustando el pH a 7.5 con NaOH y luego secando en tambor rotatorio.

Un producto de mejor calidad se puede obtener decolorando con carbón el concentrado caliente luego de la evaporación y luego recristalizando el producto resultante del secado por tambor rotatorio.

Acido glucónico: La solución al 50% de ácido glucónico que se encuentra en el mercado se obtiene concentrando por evaporación la solución del ácido (que puede haber sido obtenido tratando con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> una solución concentrada de gluconato de calcio previamente purificado).

Las lactonas se obtienen por precipitación de soluciones saturadas a diferentes temperaturas, como ya se indicó.

## Obtención de gluconato de calcio

### Parte experimental

Medios de cultivo

Componentes (g/L)	Medio inóculo	Medio proceso
Glucosa x 1 H <sub>2</sub> O	50	150
KPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub>	0.30	0.20
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0.25	0.15
NaNO <sub>3</sub>	0.20	0.15
Extracto de levadura	10.0	0
CaCO <sub>3</sub>	30	35
pH	6.5	6.5

Nota: Se esteriliza por separado glucosa /CaCO<sub>3</sub> y el resto del medio (a este último se le ajusta el pH al valor indicado).

Procedimiento: A partir de un desarrollo de A. níger NRRL 3 sobre agar papa, plenamente esporulado, se siembran erlenmeyers de 1000 ml con 100 ml de medio

inóculo. Se resuspenden los esporos en cultivo sólido con solución fisiológica y se siembra con esta suspensión para lograr un recuento inicial de alrededor de  $1 \cdot 10^6$  esporos/ml. Luego se colocan en cuarto estufa a  $30^{\circ}\text{C}$  sobre un agitador rotatorio. Se deja crecer alrededor de 24-30 hs.

Con este desarrollo se siembra el fermentador conteniendo el medio proceso utilizando un volumen de inóculo del 10%.

Durante el proceso se toman muestras a intervalos regulares de tiempo (1-1,5 h) las cuales se van a someter al siguiente tratamiento:

- a) Se mide el pH en la muestra.
- b) Se filtra un volumen perfectamente medido de cultivo para separar micelio de efluente.  
El efluente se congela para luego determinar glucosa remanente en todas las muestras y ácido glucónico en las muestras finales (cuando no haya presencia de azúcares reductores ya que éstos interfieren en el método colorimétrico empleado para la detección del ácido).
- c) Al micelio filtrado se lo lava con una solución al 15% de HCl calculando la cantidad del mismo que es necesario agregar para eliminar totalmente el  $\text{CaCO}_3$  que filtró junto con el micelio. Luego se coloca el papel de filtro conteniendo el micelio en estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  para determinación de peso seco.
- d) Se mide el %  $\text{O}_2$  y el % de  $\text{CO}_2$  en los gases de salida del reactor.

Al final del proceso (cuando haya disminuído marcadamente el consumo de  $\text{O}_2$  y la producción de glucónico) se debe aislar el producto obtenido (gluconato de calcio x 1  $\text{H}_2\text{O}$ ).

Para ello se filtra el cultivo a través de papel de filtro. El efluente obtenido se coloca en heladera donde cristalizará.

Luego se separa por filtración el gluconato de calcio precipitado del resto del efluente del cultivo. Se lava con agua fría y se seca en estufa obteniéndose de esta manera gluconato de calcio x 1  $\text{H}_2\text{O}$  cristalizado que puede ser sometido a un proceso de purificación.

Cálculos a realizar

- 1 Plantear la ecuación estequiométrica del proceso.
- 2 Calcular el rendimiento máximo teórico de producción de gluconato de  $\text{Ca} \cdot \text{H}_2\text{O}$
3. Calcular el consumo de  $\text{O}_2$ , producción de  $\text{CO}_2$ , rendimiento en biomasa y producto del proceso.