

262234

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

formulada el 7 de Noviembre de 1960, con el núm. 262.234

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de SVENSKA SOCKERFABRIKS AKTIEBOLAGET, entidad sueca,
establecida en 9, Persens väg, Malmö, Suecia, por:

"UN METODO DE PRODUCIR ACIDO CITRICO"

5 Se ha propuesto producir ácido cítrico por medio de una
fermentación sumergida de melazas diluídas utilizando hongos
del género Aspergillus y Penicillium. En este procedimiento,
el sustrato se ha inoculado por micelio, es decir, esporas de
sarrolladas separadamente en una solución de tipo análogo al
10 empleado para la fermentación de ácido cítrico. Se ha segui-
do la costumbre de dejar desarrollar las esporas mientras se
agita mecánicamente la solución, de manera que las hifas o hi-
los de micelio se afieltren y formen agregados más o menos esfé-
ricos, denominados píldoras. Por inoculación con dichas píldo



262234

54 FEB 1954

ras, las fermentaciones podían hacerse de un modo más uniforme y con rendimientos más uniformes que antes.

Se ha propuesto también realizar la inoculación con micelio no aglomerado de *Aspergillus niger*, y después de un cierto período de fermentación, el pH de la solución se reduce añadiendo un ácido o una sal ácida mientras se agita y se airea la solución simultáneamente. Se afirma que el pH se reduce a no menos de 4,6 en soluciones de melazas de azúcar de remolacha, mientras que los valores límites correspondientes para soluciones de melazas de azúcar de caña y melazas invertidas son 3,8 y 3,3, respectivamente. Después de esta reducción del pH, la fermentación se completa con agitación y aireación continuadas, y el micelio se desarrolla después en forma de unidades esféricas o agregados, denominados píldoras. Se afirma que este método da como resultado una formación incrementada de ácido cítrico hasta una cantidad de 70 % calculada con relación a la cantidad de azúcar usada.

Los métodos anteriormente conocidos han dado generalmente una cierta cantidad de ácido oxálico junto con el ácido cítrico y, por tanto, el ácido bruto obtenido exigía ser sometido a una purificación especial.

De acuerdo con el presente invento, el azúcar suministrado se utiliza mucho mejor (rendimiento mayor) y no se forma ácido oxálico, o solo se forman indicios del mismo, mientras que, al mismo tiempo, el período de fermentación resulta mucho más corto que anteriormente. En general, el método del invento se realiza de tal manera que el micelio se aglomera en forma de píldoras antes de ser introducido en el sustrato principal, y en algún momento después de la introducción de las píldoras, el pH del sustrato principal se reduce sustancialmente por adición de

262234

14 FEB



un ácido. El agregado de micelio activo obtenido de esta manera comenzará rápidamente a convertir el azúcar en ácido cítrico sin formación de ácido oxálico o producto análogo.

De acuerdo con una realización del invento, la formación de píldoras se efectúa de una manera especial mientras se agita mecánicamente y se sopla aire. Los agregados de micelio altamente activos así obtenidos se aclimatan ellos mismos fácilmente en el sustrato principal para formar ácido cítrico puro. Para la producción en escala industrial, se ha comprobado que son preferibles ciertas dimensiones del aparato formador de las píldoras. También parece ser de importancia decisiva para la calidad de las píldoras la forma de agitación y la aireación.

La formación de agregados de micelio así como la fermentación y conversión adecuadas se realizan utilizando como sustrato melazas de azúcar de remolacha. Sin embargo, el método puede aplicarse también cuando se usan otros tipos de melazas, tal como melazas de azúcar de caña, por ejemplo, aunque el rendimiento será algo menor a causa de la presencia de ciertas sustancias retardadoras de la fermentación o por la falta de sustancias nutritivas especiales. Los rendimientos pueden mejorarse considerablemente por adición de sustancias nutritivas, tales como los aminoácidos obtenidos a partir de productos naturales. Cuando se usan melazas de remolacha, es posible también mezclar otras melazas, jarabe de máquina de baja calidad u otros productos sin refinar que resultan de la producción de azúcar. Sin embargo, el invento se refiere principalmente al uso de melazas de remolacha, ya que se ha comprobado que este material es específicamente adecuado para el método.

La agregación del micelio se realiza preferiblemente en melazas de remolacha que contengan sustrato del mismo tipo que

262234 FEB 1957



el usado para la fermentación de ácido cítrico, posiblemente con una concentración menor de azúcar que la del sustrato principal.

Por ejemplo, el contenido de azúcar puede alcanzar a 5-15 %.

Se han obtenido resultados excelentes con un contenido de azúcar de 6-7,5 % en la solución usada para la preparación de píldoras y con 15 % de azúcar en la solución de fermentación principal. Como en el caso del sustrato principal, se añade ferrocianuro potásico al sustrato preparatorio con el fin de reprimir, por medio de la formación de complejo, cualquier efecto per

judicial de los iones metálicos, particularmente el hierro y para prevenir un crecimiento demasiado rápido del micelio. Además, pueden añadirse sales nutritivas tales como sales de fósforo y nitrógeno. La solución se esteriliza de la manera corriente, p. ej. por calentamiento, añadiéndose preferiblemente el ferrocianuro antes de calentar, y el fosfato, después.

Al preparar el sustrato para el cultivo de píldoras, es conveniente usar agua subterránea o agua de la cañería corriente que cumpla los requisitos normales. Debido a su contenido de sales, etc., este agua es generalmente más conveniente que el agua destilada (condensada de vapor) o que el agua desionizada. Sin embargo, el pH del sustrato debe ajustarse a los límites de 5,5-5,9 que son los más convenientes para la agregación.

La agregación puede realizarse de la manera conocida por agitación, pero se realiza preferiblemente por agitación mecánica en combinación con suministro de aire dispersado. Para obtener píldoras que tengan una estructura mecánicamente estable y una elevada actividad, es necesario un suministro de aire efectivo. El aire debe dispersarse de manera que se obtenga un crecimiento uniforme en todas las partes de la vasija. Puede usarse una cantidad de aire de 3 a 40 litros por litro

262234-4 FEB 1954



de sustrato y hora, y, en la mayoría de los casos, es conveniente una cantidad de 5 a 10 litros por litro de sustrato y hora. Una reducción de la cantidad de aire a 2 litros o menos por hora y litro de sustrato conduce a píldoras con una estructura
5 suelta y de una calidad peor.

Es importante mantener una turbulencia conveniente en la vasija de agregación de manera que las hifas de micelio se enrosquen en forma de agregados esféricos semejantes a pequeñas
10 bolas de hilo. A una velocidad pequeña del agitador, cada agregado contendrá un número relativamente mayor de esporas desarrolladas que a una velocidad mayor. La agitación no debe ser demasiado fuerte, ya que una turbulencia excesiva no da la agregación deseada sino solamente una masa pulposa. El número de esporas añadido debe ser preferiblemente del orden de 10^{10} por litro. En las condiciones indicadas, el cultivo da como resultado agregados esféricos que tienen un diámetro que es, generalmente, de 0,2 a 0,4 mm. y constituidos por hifas de micelio que tienen, por término medio, 500 a 600 esporas.

La agitación en la vasija de agregación se realiza preferiblemente mediante brazos de agitación montados en uno o más
20 árboles rotatorios. Los brazos pueden estar dispuestos de modo centrado o excéntricamente, y el árbol puede ser vertical, horizontal o inclinado. Se proporcionan preferiblemente miembros fijos o brazos de freno entre los brazos del agitador, con
25 el fin de crear una turbulencia que favorezca el enroscamiento de las hifas.

Se ha encontrado ventajoso ajustar la velocidad periférica de los medios de agitación y la anchura de los brazos del agitador de tal manera que el producto de los mismos esté entre
30 110 y 170 cm^2 por segundo preferiblemente unos 140 cm^2 por se-

262234 FEB



gundo. En el caso de que los brazos del agitador estén incli-
nados en el plano de rotación, su anchura se calcula a lo lar-
go de la proyección en el plano a través del árbol agitador y
sus brazos respectivos. Esta relación se aplica a agitadores
5 ordinarios de este tipo o a distancias ordinarias entre los
brazos de freno u otros medios de frenado y los brazos rotato-
rios, es decir, hasta distancias de 2-3 veces la anchura del
brazo rotatorio.

Preferiblemente, la agregación no debe realizarse en vasi-
10 jas demasiado grandes o en vasijas con diámetro demasiado gran-
de, ya que la turbulencia se hace insuficiente cerca del árbol
agitador, si se accionan brazos de agitador largos a una velo-
cidad periférica tan limitada que sus extremos externos no cau-
san la disgregación de las píldoras. Deben preferirse vasijas
15 cilíndricas con un árbol agitador vertical y brazos de agitador
que tengan una longitud no mayor de 1 metro.

El desarrollo de las hifas y la agregación, respectiva-
mente, requerirán en general un período de tiempo de 9 a 25 ho-
ras a la temperatura óptima para el desarrollo de las esporas,
20 es decir, unos 27 a 30° C.

El sustrato principal estéril que tiene una temperatura
de unos 30° C., un contenido de azúcar de alrededor de 15 %, pre-
preferiblemente, y un pH ajustado a valores casi neutros o pre-
feriblemente dentro de los límites de 7,5 a 5,5, se inocula des-
25 pués con una cantidad de píldoras exactamente calculada mientras
se sopla aire o posiblemente aire que contenga oxígeno adicio-
nal. Una cantidad adecuada es 3 a 7 litros de aire por litro
de sustrato y hora. El sustrato se airea de esta manera duran-
te un cierto número de horas, de manera que se aclimaten las
30 píldoras y comience una formación de ácido cítrico. Durante es

262234⁴ FEB 5



te período, la actividad enzimática es más bien insignifican-
te y solo ligeramente exotérmica y, por lo tanto, puede ser
necesario, en un clima templado suministrar algo de calor de
manera que se mantenga la temperatura en el valor más favora-
5 ble para los procesos biológicos, es decir, 29,5 a 29,89 C.

Después de un período de tiempo, cuando, debido a la
formación de ácido cítrico, el valor del pH del sustrato se
ha reducido a 5,5-4,5, aproximadamente, es decir, generalmen-
te después de 4 a 48 horas, se añade ácido (ácido clohídrico)
10 para rebajar más el pH del sustrato a un valor por debajo de
3,5, preferiblemente 3,0 o ligeramente menor. En relación
con la adición de ácido, la presión de oxígeno en la solución
se aumenta soplando oxígeno dispersado, aire enriquecido con
oxígeno o aire por lo menos a dos atmósferas. Ahora comienza
15 verdaderamente la formación de ácido cítrico y hay que retirar
cantidades considerables de calor del sustrato durante los po-
cos días subsiguientes mediante enfriamiento. Hacia el final
de la fermentación, la presión de oxígeno en el sustrato puede
reducirse, p. ej. soplando aire a presión atmosférica.

20 Para rebajar los costos del oxígeno, puede ser convenien
te recircular el oxígeno para usarle de nuevo. Sin embargo,
la proporción de ácido carbónico contenido en el mismo no de-
be dejarse que sea excesivamente elevada, ya que la fermenta-
ción resultaría obstaculizada. La concentración de ácido car-
25 bónico en el gas circulante puede mantenerse en un valor permi
sible por absorción de una manera conocida.

Si se usa aire enriquecido con oxígeno, en lugar de oxí-
geno, puede ser conveniente realizar el procedimiento a presión
mayor de la atmosférica o usar vasijas de fermentación altas.
30 Como es natural, esto es válido también para el caso en que se

262234 FEB



use aire solamente. El aire, el oxígeno o el aire enriquecido con oxígeno se introduce preferiblemente por el fondo de la vasija de fermentación o a través de los brazos de un agitador, o de ambas maneras, y se dispersa por medio de placas porosas, perforaciones o dispositivos análogos.

El invento se describirá además a continuación mediante algunos ejemplos que, sin embargo, no deben considerarse como limitativos.

Ejemplo 1

El procedimiento se realiza en una vasija cilíndrica que tiene un volumen de unos 9 litros (diámetro 190 mm., altura 320 mm.). Un árbol agitador dispuesto centralmente en dicha vasija lleva 3 brazos de agitador (longitud 150 mm., anchura 25 mm.) a distancias iguales. Brazos de freno de una anchura de 25 mm. se extienden diametralmente a través de la vasija entre los brazos agitadores.

Se preparó con melazas de azúcar de remolacha un sustrato normal que tenía un contenido de azúcar de 6,0-7,5 % y un pH de aproximadamente 5,7-5,9. Se añadieron al mismo aproximadamente 0,3 % de ferrocianuro potásico y aproximadamente 0,2 % de fosfato potásico dihidrógeno (fosfato monopotásico), y la inoculación se realizó con esporas de *Aspergillus niger* de una cepa especialmente mejorada para la formación de ácido cítrico. Las esporas se añadieron en número de aproximadamente 10^{10} por litro de solución. El líquido se mantuvo a 30° C. El agitador se hizo girar a 70 r.p.m. y se suministraron 5 litros de aire dispersado por litro de sustrato y hora. Después de 12 horas, se obtuvieron aproximadamente $1,5 \times 10^8$ píldoras con excelente estructura y un diámetro de 0,2 a 0,4 mm.

La fermentación principal se realizó en una vasija cilín-

232234



drica dimensionada para recibir líquido dentro de un espacio de 0,6 m. de diámetro y 3,5 m. de altura y para dejar un espacio adicional por encima del líquido para alojar la espuma que pudiera formarse. Se introdujeron en dicha vasija 1000
5 litros, aproximadamente, de melazas de azúcar de remolacha diluidas y esterilizadas. Esta masa era del mismo tipo que la utilizada para la producción de píldoras, es decir, se añadieron a la misma ferrocianuro y fosfato, pero la concentración de azúcar era aproximadamente 15 % y el pH 6,8. La masa se mantuvo a una temperatura de unos 30^o C. y se suministró aire dispersado en una cantidad de aproximadamente 3 litros por litro de masa y hora mediante regaderas provistas en el fondo de la vasija. Las píldoras preparadas como se ha dicho anteriormente (un número total de $1,5 \times 10^8$, aproximadamente), se añadieron
15 de manera que la masa contenía aproximadamente $1,5 \times 10^5$ píldoras por litro. La aireación se continuó durante 40-48 horas a una temperatura de 29,5 a 29,8^o C. Se formó algo de ácido cítrico durante este tiempo y originó una disminución del pH a 4,7. En lugar de aire, se suministraron ahora 5 litros de oxígeno por litro de masa y hora, y se añadió ácido clorhídrico
20 hasta que el pH había bajado a 3,0. Luego se enfrió la masa para mantener la temperatura en los valores indicados, y la fermentación se completó en 96 horas. El oxígeno se retiró por la parte superior de la vasija de fermentación y, después de lavar
25 álcali se introdujo de nuevo por el fondo de la vasija. Se suministró oxígeno fresco en una cantidad correspondiente a la cantidad consumida.

La masa completamente fermentada contenía aproximadamente 15 % de ácido cítrico. Era clara y podía separarse fácilmente
30 de las píldoras por filtración. Prácticamente, se consumió la

282234 FEB



totalidad del azúcar y el rendimiento de ácido cítrico f
vado, es decir 90 a 100 gr. de ácido cítrico por 100 gr, de azú
car. La solución estaba libre de ácido oxálico, y el ácido cí
trico se recuperó de la misma por el método conocido.

5 El número de revoluciones del agitador, la cantidad de
aire suministrada, y el tiempo de tratamiento cuando se prepa
ran las píldoras pueden variar dentro de ciertos límites. Si
el suministro de aire se reduce a 2 litros por litro de sustra
to y hora, las píldoras tendrán una estructura más suelta, una
10 actividad menor, y menos capacidad para adaptarse por sí mis
mas a un medio ácido. Un incremento del número de revolucio
nes a 140 r.p.m. con aireación solamente por difusión desde la
superficie líquida dió también píldoras de calidad deficiente.
Un incremento adicional del número de revoluciones dió como re
15 sultado una menor formación de píldoras así como una mayor dis
gregación de píldoras ya formadas. Un incremento de la canti
dad de aire a 7 litros por litro de sustrato y hora a un núme
ro de revoluciones de 70 r.p.m. del agitador dió píldoras muy
uniformes y estables en un tiempo tan corto como 9 horas. Es
20 tas píldoras mostraron una gran actividad así como adaptabili
dad a un medio ácido.

Ejemplo 2

Las píldoras se produjeron en una vasija cilíndrica de
unos 220 litros de volumen (diámetro 520 mm., altura 1040 mm.).
25 Un agitador dispuesto centralmente en la vasija se equipó con
6 brazos agitadores rectos (longitud 450 mm., anchura 40 mm.)
igualmente espaciados. Se montaron brazos de freno que tenían
una anchura de 40 mm., extendiéndose diametralmente en la vasi
ja entre los brazos agitadores. El aire dispersado podía su
30 ministrarse a través de filtros cerámicos dispuestos en el fon

262234



do de la vasija. Se aclaró que las píldoras de estructura muy favorable, con elevada actividad y adaptabilidad muy buena a un medio ácido podían obtenerse a una velocidad del agitador de 15 r.p.m. y un suministro de aire de aproximadamente 5 litros por litro de sustrato y hora, siendo las demás condiciones análogas a las del Ejemplo anterior. Un incremento del número de revoluciones dió como resultado píldoras de menor diámetro y una reducción de la aireación dió una actividad deficiente.

La cantidad de píldoras así obtenida fué suficiente para una vasija de fermentación con un volumen de líquido de 500 a 25 m³, es decir, un diámetro de 2,25 m. y una altura de 5 m. La fermentación principal en esta vasija se realizó mientras se suministraba aire u oxígeno a través de regaderas porosas fijas o dispositivo análogo en el fondo de la vasija. Las regaderas se colocaron centralmente en el fondo de manera que se obtuvo un flujo ascendente de aire y líquido en la porción central de la vasija. Para mejorar la circulación de líquido y píldoras, la vasija podía equiparse con superficies guías, por ejemplo en forma de un cilindro de metal laminado (diámetro 1,85 m., altura 3,0 m.) abierto en ambos extremos y dispuesto centralmente a una distancia de unos 500 m. del fondo.

Después de completada la fermentación de la manera descrita en el Ejemplo anterior, el sustrato estaba casi libre de azúcar después de 85 a 90 horas.

Ejemplo 3

En lugar de disponer regaderas porosas, fijas, o dispositivo análogo para la aireación como en los ejemplos 1-2, el gas puede suministrarse a través de perforaciones en uno o más de los brazos agitadores, comunicando dichas perforaciones con canales a través de dichos brazos y a través del árbol agitador.

262234



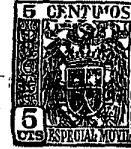
El número de revoluciones se ajusta así de tal manera que las píldoras no se disgregan. Igualmente, en este caso puede ser conveniente proporcionar superficies guías, p. ej. en forma de un cilindro, para obtener una circulación definida en la vasija.

Ejemplo 4

Generalmente, es conveniente preparar píldoras en una vasija de volumen tal que se obtenga un lote suficiente para inoculación en una o varias vasijas de fermentación. Esto tiene la ventaja de que, en cada vasija de fermentación separada, las píldoras son de un tipo uniforme y/o están en el mismo estado de desarrollo. En el caso de vasijas de fermentación muy grandes, p. ej. de 200 metros cúbicos de sustrato, es preferible, pues, usar una vasija de preparación de píldoras de un volumen de unos 2 metros cúbicos. Una vasija de este tipo puede tener un diámetro de 1000 mm. y una altura de 2500 mm., y sus medios de agitador pueden comprender 10 brazos de agitador separados (longitud 900 mm., anchura 45 mm.) y 9 brazos de freno intermedios (anchura 45 mm.). La velocidad de los brazos de agitador puede ser 7,5 r.p.m.

Una vasija de fermentación del tamaño arriba mencionado (unos 200 m³) puede diseñarse en forma de torre cilíndrica de 3 metros de diámetro y 28 metros de altura. En lugar de soplar oxígeno durante el período principal de fermentación, se introduce aire dispersado con una adición de 10 % de oxígeno, aproximadamente, y escapa por la parte superior de la torre. Poniendo la torre bajo presión superior a la atmosférica, el tiempo de fermentación puede reducirse dentro de ciertos límites. A una presión super-atmosférica suficiente, puede omitirse la adición de oxígeno. Igualmente, en este caso, puede

262234



ser aconsejable proporcionar superficies guías para obtener una circulación definida.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en Suecia, el 11 de Noviembre de 1959, bajo el núm. 10.555/59 y el 5 de Septiembre de 1960, bajo el núm. 8439/60, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

N O T A

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

1º.- Un método de producir ácido cítrico a partir de melazas de remolacha por fermentación sumergida con agregados de micelio de *Aspergillus niger* o cepas afines de hongos de mohos, que comprende añadir ácido clorhídrico a melazas diluídas que contienen agregados de micelio, denominados gránulos, para reducir el pH a un valor inferior a 3,5 y realizar la fermentación mientras se suministra oxígeno, aire enriquecido con oxígeno o aire a presión superatmosférica.

2º.- Un método según el punto 1º, caracterizado porque el pH se reduce a un valor inferior a 3.

3º.- Un método según los puntos 1º ó 2º, caracterizado porque se añaden gránulos producidos por separado a las melazas diluídas, casi neutras, con aireación simultánea, y porque la adición de ácido clorhídrico tiene lugar después de que los gránulos se han aclimatado y el pH ha bajado a 5,5-4,5 debido a la formación de ácido cítrico.

4º.- Un método según los puntos 1º a 3º, caracterizado porque la fermentación se lleva a cabo con gránulos producidos

262234



en un recipiente separado en un medio del mismo tipo que el mosto
to a fermentar.

5 5º.- Un método según el punto 4º, caracterizado porque los gránulos se producen mientras la solución es agitada mecánicamente y se insufla aire a su través.

6º.- Un método según los puntos 1º a 5º, caracterizado porque la formación de gránulos tiene lugar en un sustrato más diluído que el mosto a usar para la fermentación principal.

10 7º.- Un método según los puntos 5º ó 6º, caracterizado porque se introducen en el sustrato en forma dispersa más de 2 litros de aire por litro de sustrato y hora.

15 8º.- Un método según los puntos 5º a 7º, caracterizado porque los gránulos se producen en un recipiente que contiene brazos agitadores rotativos y medios de barrera estacionarios intermedios, adaptándose el número de revoluciones de los medios agitadores, de tal modo que el producto de la velocidad periférica de dicho agitador y la prolongación de cada brazo en la dirección axial del agitador asciende a 110-170 cm² por segundo, con preferencia a unos 140 cm² por segundo.

20 9º.- Un método según los puntos 1º a 8º, caracterizado porque las melazas de remolacha azucarera se mezclan con otras melazas, jarabe pobre de máquina u otros productos no refinados procedentes de la fabricación de azúcar.

25 10º.- Un método según los puntos 1º a 9º, caracterizado porque el sustrato está compuesto por melazas de azúcar de caña, posiblemente con adiciones suplementarias de sustancias nutritivas, tales como aminoácidos.

11º.- Un método de producir ácido cítrico.

30 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

262234 FEB 5



Esta Memoria consta de quince hojas escritas a máquina
por una sola cara.

Madrid, 4 FEB 1967

F.A.

Alcalde de Madrid
[Signature]