

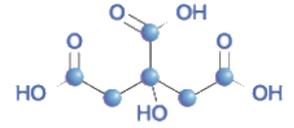
biotecnologie: produzione di **BIO-ACIDO CITRICO**

elaborazioni e appunti del Prof.A.Tonini – versione#B2 - www.andytonini.com

INDICE: [PROCESSO](#) - [MATERIE PRIME](#) - [FASI DEL PROCESSO](#) - [SCHEMA](#) - [APPENDICI](#) - [CICLO KREBS](#) - [PRODOTTI E USI](#) -

CARATTERISTICHE: [formula grezza C₆H₈O₇]

formato da cristalli incolori, inodori, di sapore acidulo, solubili in acqua e in alcol, poco solubile in etere; presente nelle piante, libero e come sale, è abbondante nel frutto degli agrumi; alcuni microrganismi lo producono partendo dal glucosio.



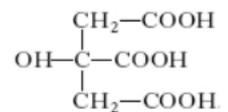
PROPRIETÀ:

acidulante (in bevande, gelatine, marmellate,...) e conservante - antiossidante (stabilizzante colore/sapore/aroma) - correttore di ph - riduttore del grado di dolcezza - per detersivi (sostituto dei fosfati, come sequestrante di durezza) – per vernici (resine viniliche) e agente complessante nel settore tessile - ritardante indurimento del cemento (calcestruzzo) - stabilizzante di agenti farmaceutici (antiossidante di vitamine) - additivo (per sali effervescenti) - conservante per il plasma (anticoagulante) e come regolatore di pH. L'acido c. delle cellule dei tessuti animali non è di origine alimentare, ma si forma localmente da altri composti; esso concorre alla regolazione fisiologica dell'equilibrio acido-base nell'organismo ed è un prodotto intermedio della catena di reazioni metaboliche detta ciclo dell'acido c. (o ciclo di Krebs).



USI:

75%: industria alimentare - 15%: industria chimica - 10%: industria farmaceutica.



PRODUZIONE:

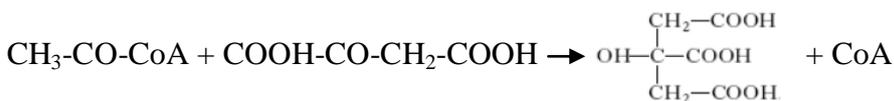
- estrazione da agrumi: resa massima <9%;
- per via **fermentativa aerobica** da materie prime saccarosiche, con l'impiego delle muffe **Aspergillus niger***. [altri microrganismi in appendice]

[*]**Aspergillus niger** dispone anche di amilasi: permette uso di materie prime amidacee.

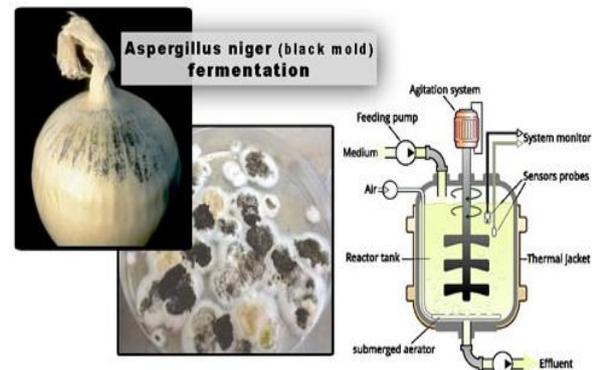
N.B.: l'acido citrico nel ciclo di Krebs è un prodotto intermedio, ottenuto specie nella fase stazionaria, e si ottiene per glicolisi aerobia, secondo la via di Embden-Meyerhof, dall'acetyl coenzima A, che per reazione con ac.ossalacetico,



catalizzata dall'enzima a.c.sintetasi, porta a acido citrico:



tramite aggiunta di EDTA che sequestra il Fe(II), cofattore dell'enzima aconitasi, oppure per aggiunta di Cu(II), si blocca l'enzima aconitasi che catalizza la reazione successiva del ciclo Krebs che porta a trasformare l'a.c. in a. isocitrico.



■ **processi industriali** [discontinui]:

a) fermentatori a **coltura sommersa**: [maggiore resa, 110÷125g/dm³ brodo]. Reattori STR stirred tank [250m³]- R.airlift [900 m³]; tempo 4÷8 giorni; con struttura di micelio φ<1mm compatto e ramificato;

b) fermentatori a **superficie** a cellule immobilizzate, uso materia prima amidacea; R. vasche impilate; t=7÷10 giorni; processo ormai abbandonato per alti costi manutenzione e manodopera.

MATERIE PRIME:

■ **zuccheri** rapidamente catabolizzati: soluzioni di saccarosio (resa 98%), maltosio fruttosio glucosio; [richieste concentrazioni elevate di saccarosio (50-55%) per ottenere alte rese di produzione]

■ **materiali grezzi** (previo opportuno controllo e trattamento): melasso da canna o da barbabietole (resa 60-70%), sostanze amidacee dal mais, sottoprodotti della lavorazione del grano, amido polpa di mele o di patate o scarti alimentari (acqua scarto ananas), scarti industria di cotone e birra;

REAZIONE BASE:



CONDIZIONI OTTIMALI DI PROCESSO:	
ZUCCHERO	120÷150 g/dm ³
SALI DI AMMONIO	>2 g/dm ³
FOSFATI	0,2÷1 g/dm ³
MANGANESE	<10 ⁻⁸ M
ZINCO	<10 ⁻⁶ ÷ 10 ⁻⁷ M
FERRO	<10 ⁻⁴ M
pH	1,6÷2,2
TENSIONE O ₂ disciolto	>140 mbar
TEMPO	160÷240 h

[INIZIO]

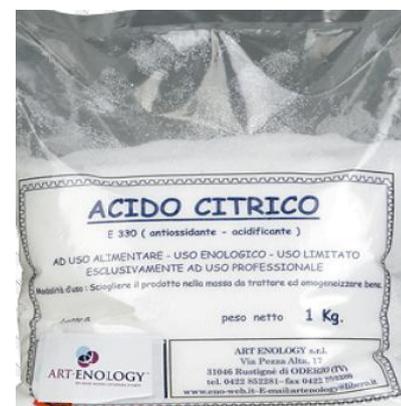
FASI DEL PROCESSO: [vedi oltre -schema del processo]

- **PREPARAZIONE inoculo** e accrescimento da spore germinate, 1-2 settimane;
- **PURIFICAZIONE delle materie prime** [brodo di coltura]: filtrazione e scambio ionico (eliminazione ioni Mn [da'ac.ossalico] Mg Zn Fe, cofattori di enzimi coinvolti in altri cicli metabolici che abbassano la resa totale);
- **STERILIZZAZIONE** del brodo;
- **FERMENTAZIONE:** [altre metodiche in appendice]

brodo di coltura + inoculo, microrganismo aerobio che richiede forte aerazione ottenuta tramite agitazione; pH iniziale <4, in seguito pH <3; processo fortemente esotermico, regolato a $T \approx 30^{\circ}\text{C}$; uso di oli come antischiuma; resa $\approx 80\%$ rispetto al carboidrato iniziale; tempo variabile, a seconda della carica, $t=5 \div 14$ day; al termine si precipita con calcio l'acido ossalico che è un sottoprodotto;

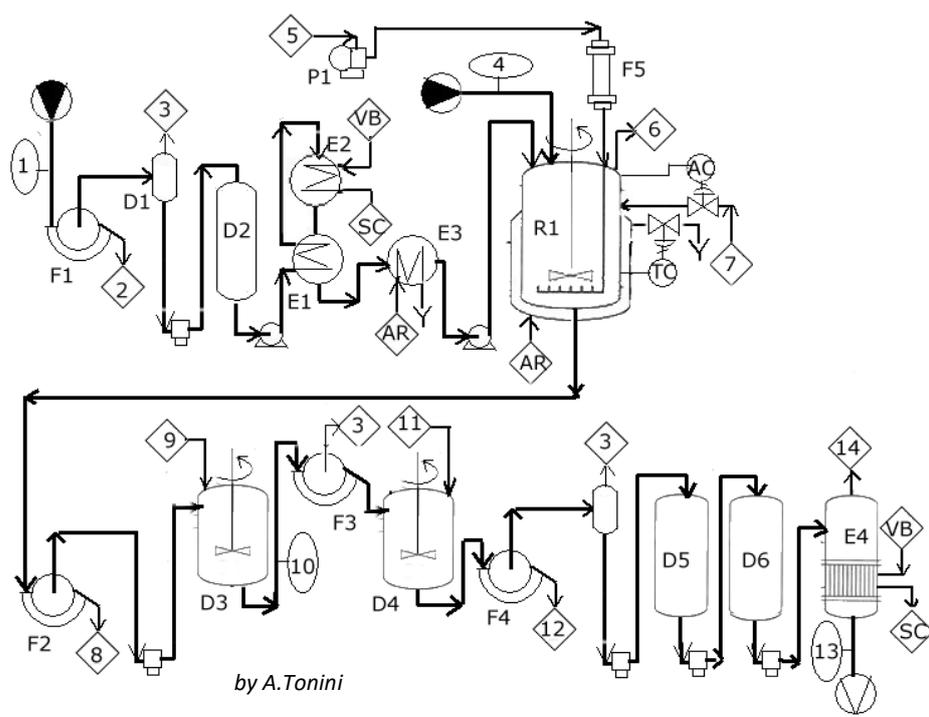
- **FILTRAZIONE** del brodo coltura/biomassa;
- **PRECIPITAZIONE** a 80° e pH 7: liquido + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ [opp. CaCO_3] \rightarrow Ca-citrato \downarrow [+ CO_2];
FILTRAZIONE per separare precipitati e contaminanti;
- **DISSOLUZIONE** del precipitato in **ac.solforico** a $T < 60^{\circ}\text{C}$:
Ca-citrato + **ac.solforico** \rightarrow soluzione **ac.citrico** + Ca-solfato \downarrow ;
FILTRAZIONE per eliminare Ca-solfato;
- **TRATTAMENTI FINALI:**
PURIFICAZIONE del liquido ac.citrico con Carbone attivo e Scambio Ionico;
CONCENTRAZIONE – CRISTALLIZZAZIONE – CENTRIFUGAZIONE –
ESSICCAMENTO – STOCCAGGIO -

N.B.: l'acido citrico può essere prodotto in forma monoidrata [cristallizzazioni ripetute, acqua residua <10%]; oppure anidra [deidratazione a $T > 36^{\circ}\text{C}$]



[INIZIO]

SCHEMA SEMPLIFICATO DEL PROCESSO DI PRODUZIONE AC.CITRICO:



LEGENDA IMPIANTO DI PRODUZIONE
ACIDO CITRICO CONCENTRATO
REATTORE STR:

MATERIALI:

- 1 MATERIA PRIMA, BRODO DI COLTURA DI CARBOIDRATI
- 2 IMPUREZZE
- 3 SERVIZIO VUOTO
- 4 INOCULO
- 5 ARIA FILTRATA
- 6 GAS USCENTI
- 7 CORRETTORE ACIDITA'
- 8 BIOMASSA
- 9 SOLUZIONE Ca IDROSSIDO
- 10 SOLUZIONE CON Ca CITRATO
- 11 AC.SOLFORICO
- 12 SOLUZIONE AC.CITRICO + Ca SOLFATO
- 13 AC.CITRICO CONCENTRATO
- 14 VAPORI SOLVENTE

APPARECCHIATURE:

F1-4 FILTRI SOTTO VUOTO
D1 RACCOLTA FILTRATO
D2 RESINE SC.IONICO
E1 SCAMBIATORE DI CALORE

E2 STERILIZZATORE
E3 RAFFREDDATORE
R1 FERMENTATORE
F5 ULTRAFILTRO ARIA

D3,4 SERBATOI PRECIPITATORI
D5 COLONNA A CARBONE ATTIVO
D6 COLONNA A SCAMBIO IONICO
E4 EVAPORATORE CONCENTRATORE

[INIZIO]

APPENDICI**A1 – ANNOTAZIONI:**

L'acido c. delle cellule dei tessuti animali non è di origine alimentare, ma si forma localmente da altri composti; esso concorre alla regolazione fisiologica dell'equilibrio acido-base nell'organismo ed è un prodotto intermedio della catena di reazioni metaboliche detta ciclo dell'acido c. (o ciclo di Krebs). Questo porta all'ossidazione di frammenti a due atomi di carbonio, che entrano nel ciclo come acetilcoenzima A (\rightarrow coenzima) e provengono dal metabolismo dei glucidi, degli acidi grassi, di alcuni amminoacidi e da altre reazioni del metabolismo intermedio; il ciclo avviene nella matrice dei mitocondri, in quasi tutti i tessuti e organismi ed è essenzialmente unidirezionale; l'acido c. (a 6 atomi di carbonio) si forma per condensazione dell'acido ossalacetico (a 4 atomi di carbonio) con il gruppo acetile dell'acetilcoenzima A, a opera della citratosintetasi. Attraverso successive reazioni di isomerizzazione, decarbossilazione ossidativa, ossidazione e idratazione, dall'acido c. si forma l'acido ossalacetico che riprende il ciclo. I due atomi di carbonio che lasciano il ciclo sotto forma di anidride carbonica sono diversi da quelli che entrano nel ciclo dall'acetilcoenzima A. Al processo partecipano numerosi enzimi, cofattori e trasportatori di elettroni; questi ultimi vengono ridotti nel ciclo, e poi ossidati dall'ossigeno molecolare, nella catena respiratoria che avviene anche essa nei mitocondri; il ciclo dell'acido c. rappresenta la principale via metabolica capace di fornire gli equivalenti riducenti (NADH, FADH) indispensabili per la produzione di ATP.

A2 – MICRORGANISMI –

Muffe: aerobi pluricellulari uniti in strutture filamentose che si sviluppano anche a pH molto acidi (pH fino a 2 unità).

Eucarioti (classe dei funghi) dotati di:

- nucleo delimitato da membrana
- citoplasma con mitocondri, reticolo endoplasmatico e apparato del Golgi.

MICRORGANISMI che producono l'a.c.:

Funghi filamentosi: • *Aspergillus niger* [fungo eucariota aerobiotico] • *Penicillium citricum* • *Mucor piriformis*
• *Candida guilliermondii*[lievito] • *Saccharomyces lipolytica*

A3 – TIPI DI PROCESSI:**1° PROC. – FERMENTAZIONE A SUPERFICIE -****IN FASE SOLIDA**

• amido di patata (+ piccole aggiunte di α -amilasi), polpa di patate o crusca di frumento in **vasche di alluminio impilate** (profonde 3-5cm); • Spore, pH 4-5, 28°C per 5-8 giorni; • Bassa sensibilità agli oligoelementi

IN FASE LIQUIDA - (20% della produzione totale di acido citrico)

• più antico e più economico del "solido"; • Melasso di bietola in **vasche impilate di alluminio**; • Spore, 30°C, ventilazione con aria sterile (+O₂ and - CO₂), germinazione (24h) e formazione strato di micelio in superficie (pH 1.5-2, per utilizzo ammonio); • Trofofase \rightarrow 30ore \rightarrow Idiofase \rightarrow accumulo acido citrico (coltre bianca in superficie \rightarrow pigmento giallastro se si forma ac. ossalico per eccesso di ferro); • Durata totale: 8-14 giorni

2° PROC. – FERMENTAZIONE IN FASE SOMMERSA -

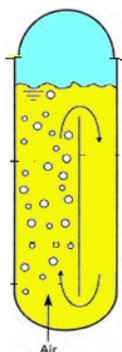
• Maggiormente utilizzata (80% della produzione totale); • Economico (bassi costi investimento e manodopera)
• Controllo dei microelementi; • Controllo ossigeno; • **Stirred-tank ed Air-lift**;

Qualità materiale del fermentatore • resistenza acidi • no rilascio metalli; Rifornimento di ossigeno (poco ma indispensabile); Struttura del micelio; Stabilità genetica; Svantaggi: • Maggiori costi energetici
• Necessità di controlli + sofisticati (personale qualificato);

A4 – REATTORI:

- FERMENTATORI AD AGITAZIONE PNEUMATICA

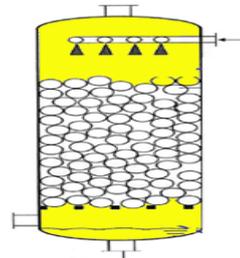
air lift a torre o a colonna di bolle o a gorgogliamento; presentano delle bolle d'aria compressa che salgono dal basso, creando un moto tumultuoso e a causa della pressione dell'aria, che è più alta in basso, la densità è minore nella parte inferiore del fermentatore e il liquido tende a risalire e a mescolarsi con quello in alto; la presenza di dischi perforati, deflettori e tubi sommersi garantisce un migliore mescolamento della biomassa; produttività simile ai reattori ad agitazione, ma con notevole risparmio energetico.



Processo	Superficie	Sommerso
Substrato	Glu 160g/l batch	Glu 160g/l: •40g/l in trofofase •120g/l in idiofase
pH	6-6.5 (germinazione) 1.5-2 (produzione)	5 in trofofase 2-3 in idiofase
Inoculo	Spray di spore o sospensione di spore	Inoculo 10% v/v spore pregerminate
T	30°C	28-32°C
Aerazione	Aria sterile	Aria sterile
Tempo	30-48 h trofofase 8-14gg idiofase	20-40 h trofofase 4-6gg idiofase
Resa di conversione	0.7-0.8	0.7-0.8
Resa di fermentazione	1.2-1.5 Kg/m ²	110-125g/l
Reattori	Vasche impilate	•Stirred tank (220-250m ³) •Airlift (900m ³)

- FERMENTATORI AD AGITAZIONE MECCANICA [vedi schema impianto precedente]

I più comuni sono i reattori **discontinui STR** (Stirred Tank Reactor) o *batch* che consistono in cilindri di acciaio inossidabile sul cui asse longitudinale viene fatto ruotare un albero munito di palette di forma spesso complessa, poste solo in profondità o a vari livelli. Sono sempre presenti dei frangiflutti o rompivortici e possono essere inseriti dei tubi sommersi per il circolo del liquido.



- REATTORI A LETTO FISSO

sono **colonne riempite** (impaccate) di particelle di biocatalizzatore immobilizzato e sono utilizzate in casi di elevata permanenza dei reagenti nella miscela di reazione affinché si formino prodotti stereoselettivi. Come supporto per il biocatalizzatore si usano fibre sintetiche o argilla con porosità elevata e superficie dai 50 ai 250 m² per m³.

[INIZIO]

A5 – CICLO DELL'AC.CITRICO:

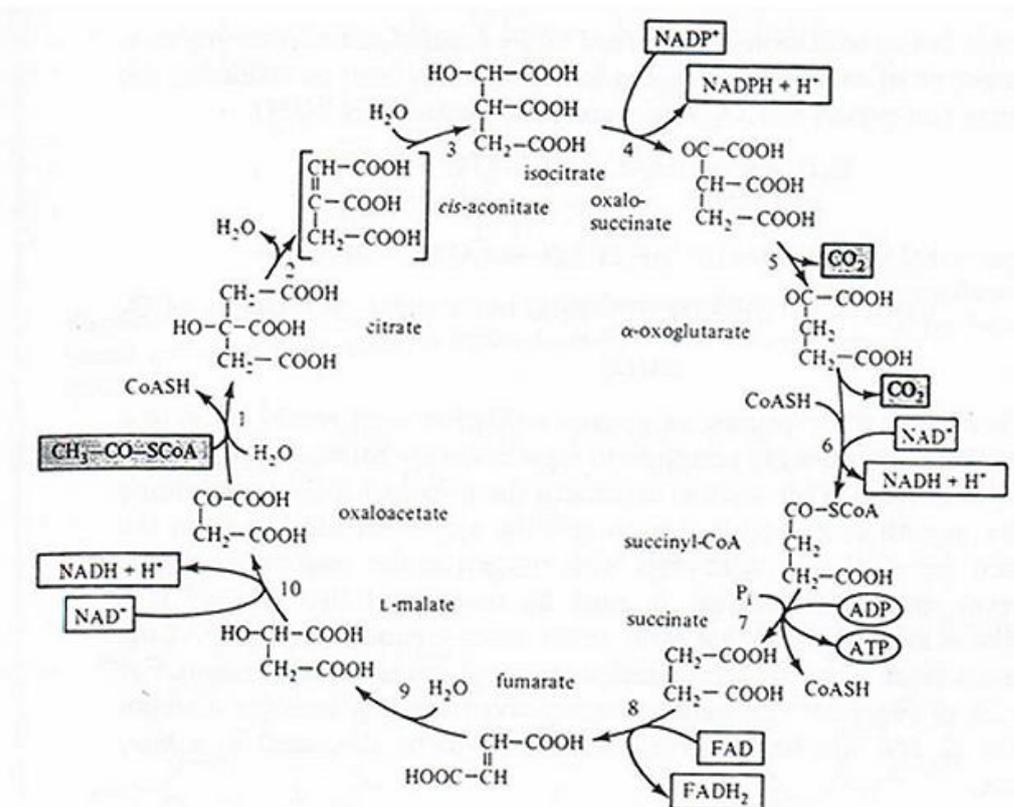
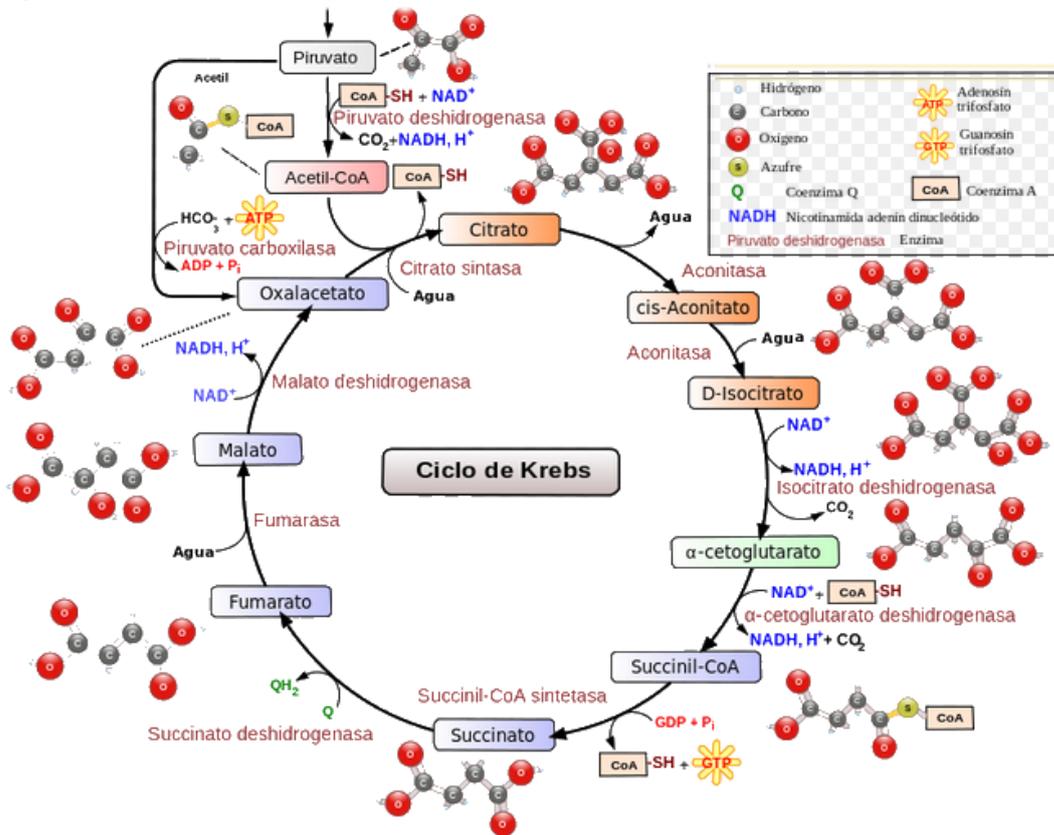


Figure 2.6. Oxidation of acetyl-CoA via the tricarboxylic acid cycle. 1, citrate synthase; 2 and 3, cis-aconitate hydratase; 4 and 5, isocitrate dehydrogenase; 6, alpha-oxoglutarate dehydrogenase complex; 7, succinate thiokinase; 8, succinate dehydrogenase; 9, fumarase; 10, malate dehydrogenase.

[INIZIO]

A6 – PRESENZA ACIDO CITRICO -

Alimenti ricchi di **Acido citrico**:

Limone 	Arancia 	Aceto 	Pomodoro 	Verdure 
Succhi di frutta 	Ribes nero 	Vino 	Kiwi 	Fragole 

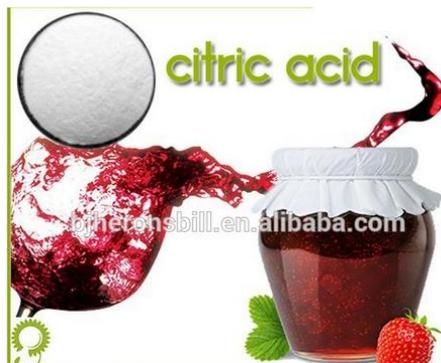
PRODOTTO:



USI:

Proprietà dell' **acido citrico**:

- 1 E' antiossidante e contrasta i radicali liberi
- 2 Partecipa al ciclo di Krebs, processo che trasforma il glucosio
- 3 È necessario per l'assorbimento del ferro da parete dell'organismo
- 4 È diuretico e dissetante
- 5 E' un antibatterico naturale ed uccide funghi e miceti
- 6 Combatte l'osteoporosi (rende compatto il tessuto osseo)



NOTATIONS IN ENGLISH -

Commercial Production:

Two different types of fermentation processes are basically used for commercial production of citric acid, e.g., the surface fermentations and the submerged fermentations. In addition, some citric acid is also produced by solid state fermentations, particularly in less developed rural areas such as some East Asian countries. Citric acid production by yeast is exclusively done by submerged cultivation.

Surface fermentation (Fig. 40.4) is the older and more labour intensive version of citric acid fermentation, yet it is still in use, even by some major producers of citric acid. The main reasons for this are the lower power requirements and the higher reproducibility of the process due to its lower susceptibility to interference by trace metal ions and variations in the dissolved O_2 tension.

Their fermentation is usually carried out in aluminium trays (2 m x 2.5 m), filled with nutrient medium to a depth of between 50 and 200 cm.

Molasses solution containing inorganic nitrogenous salts is used as fermentation medium.

The pH is maintained at about 2. The fermentation medium is first freed of trace elements (e.g., Mn^{++} , Zn^{++} , Fe^{++} , phosphates) through ion exchange resin because the trace elements exert inhibition of citric acid formation above a critical level.

Following this, the requisite concentrations of metal ions are added as salts in the medium. Spores are now distributed over the surface of the trays, and sterile air (serving both as an oxygen supply as well as a cooling aid) is passed over them. The mycelium develops as a coherent felt, becoming progressively more convoluted. The fermentation is completed within a period of 7 to 12 days at $30^\circ C$.

The culture fluid is taken out from the bottom of the trays, leaving the mycelial mat of *A. niger* more or less undisturbed. Citric acid is recovered from the fluid by precipitation. Fresh medium is added into the trays for the next batch of fermentation.

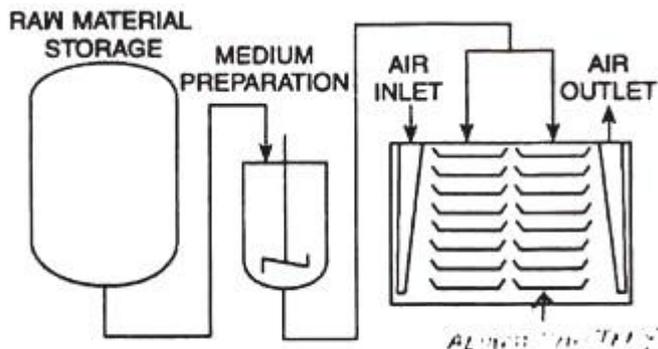


FIG. 40.4. Surface fermentation process used for commercial production of citric acid.

The **submerged fermentation process** (Fig. 40.5) is desirable because of its higher efficacy due to higher susceptibility to automation. Yet the severe influence of trace metal ions and other impurities present in the carbohydrate raw materials and its disturbance by variations in O_2 supply make it more difficult to manage particularly because the quality of the carbohydrate source is variable.

There are two types of fermentors in use:

- Stirred tanks

- Aerated tower fermentors.

Both types are constructed of high-grade stainless steel and contain facilities for cooling. Sparging with O_2 occurs from the base.

One of the most prominent features of submerged fermentation is the mycelial development which shows a characteristic pattern: the germinating spores form stubby, forked and bulbous hyphae, which aggregate to small (0.2-0.5 mm) pellets having a firm, smooth surface, and sediment quickly when harvested.

This striking morphology has been shown to be critical for attaining high yields by submerged fermentation and is dependent on an appropriate nutrient composition. It is therefore a convenient indicator for the progress of fermentation, e.g., by procedures involving microscopy. A final yield of $0.8-0.9 \text{ kg kg}^{-1}$ is obtained after 7 to 10 days.

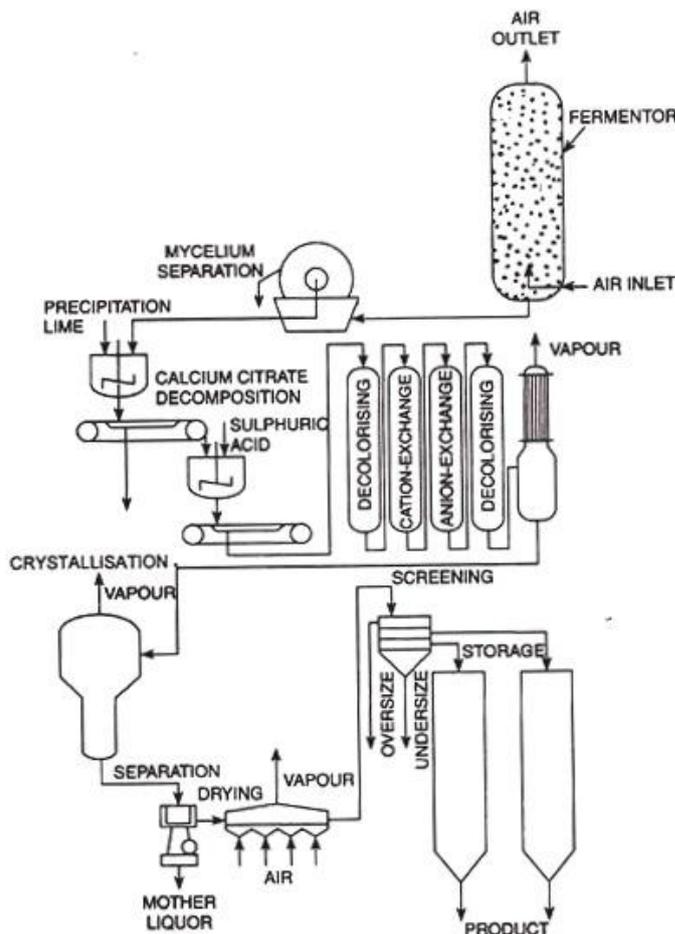


FIG. 40.5. Submerged fermentation process used for commercial production of citric acid.

Uses of citric acid:

Due to its pleasant taste, low toxicity and excellent palatability, citric acid is widely used in industry for the preparation of food and sugar confectionery (21% of total production) and beverages (45%). Other major applications are in the pharmaceutical and detergent/cleaning industry (8 and 19%, respectively).

It is also able to complex heavy metal ions, such as iron and copper, and therefore is applied in the stabilisation of oils and fats or ascorbic acid against metal ion-catalysed oxidation. In addition, citric acid esters of a wide range of alcohols are known and can be employed as non-toxic plasticisers.

Finally, some of its salts have commercial importance, e.g., trisodium citrate as a blood preservative which prevents blood clotting by complexing calcium, or as a stabiliser of emulsions in the manufacture of cheese.

[da <http://www.biologydiscussion.com/>]