

Producción Industrial de Ácido Glucónico



Álvaro Moreno Sevilla
Grado en Biotecnología
2022 / 2023

ÍNDICE

1. Objeto y justificación de la tesis

2. Introducción

2.1. Ácidos orgánicos

2.2. Propiedades

2.3. Aplicaciones

3. Microorganismos productores

3.1. Hongos

3.2. Bacterias

4. *Aspergillus Niger*

4.1. Taxonomía

4.2. Glucosa oxidasa

5. Producción de ácido glucónico

5.1. Qué producir y cómo

5.2. Tratamientos previos (Upstream)

5.3. Fermentación

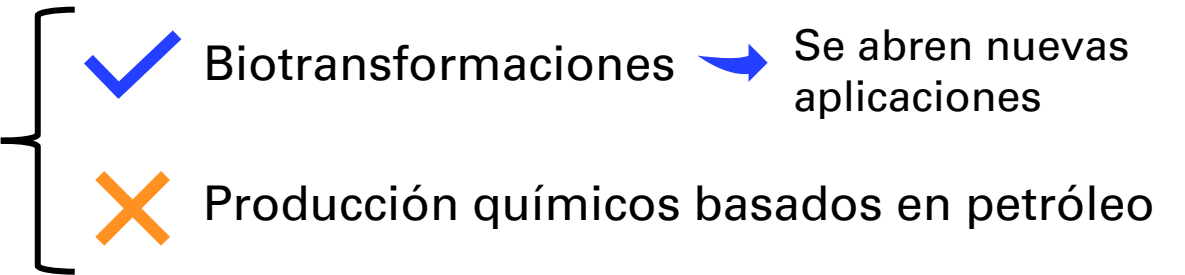
5.4. Separación y Purificación (Downstream)

6. Conclusión

1. OBJETO Y JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS



Objeto y justificación de la tesis

- Creciente necesidad desarrollo sostenible 

OBJETIVOS



- Cómo es la producción industrial ➡ Literatura publicada en los últimos 70 años
- Cuáles son las actuales limitaciones
- Cuáles son las tecnologías que podrían solventarlas

2. INTRODUCCIÓN

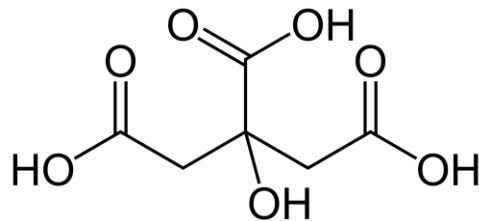


Introducción

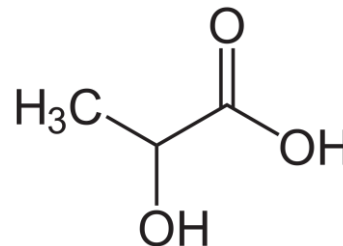
2.1. Ácidos Orgánicos

- Propiedades ácidas débiles conferidas por grupo carboxilo
- Metabolitos primarios  - Crecimiento
- Metabolismo  Cualquier m.o potencial productor
- Numerosas aplicaciones en multitud de ámbitos

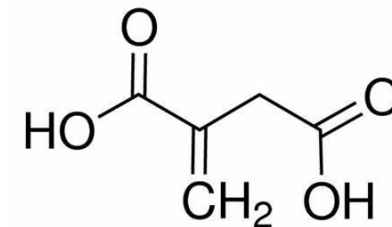
Ácido cítrico



Ácido láctico

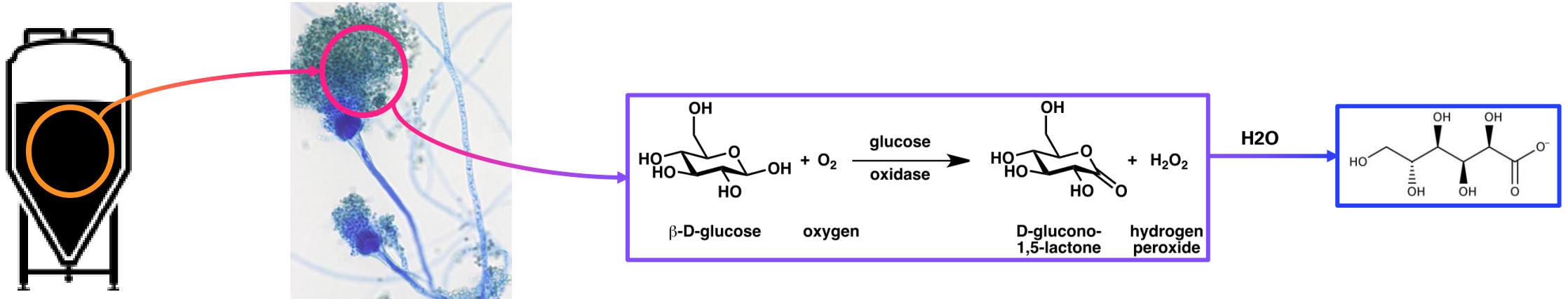


Ácido itacónico



Ácido Glucónico

- Ácido 2,3,4,5,6-pentahidroxihexanoico || Ácido orgánico débil multifuncional
- **Más implantada:** Fermentación batch sumergida aireada con *Aspergillus Niger* → η 95-98%
- Comercialización como ácido glucónico, como sales derivadas y gluconolactonas



2.2. Propiedades

Gluconic acid	
Nature	Noncorrosive, mildly acidic, less irritating, nonodorous, nontoxic, easily biodegradable, nonvolatile organic acid
Relative molecular mass	196.16
Chemical formula	$C_6H_{12}O_7$
Synonym	2,3,4,5,6-pentahydroxyhexanoic acid
pKa	3.7
Melting point (50 % solution)	Lower than 12 °C
Boiling point (50 % solution)	Higher than 100 °C
Density	1.24 g/mL
Appearance	Clear to brown
Solubility	Soluble in water
Sourness	Mild, soft, refreshing taste
Degree of sourness (sourness of citric acid is regarded as 100)	29–35

Tabla 1. Características generales del ácido glucónico [1].

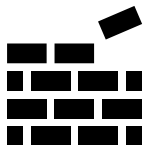
2.3. Aplicaciones



- Tratamiento de carnes
- Coagulación del tofu
- Agentes leudantes (levaduras industriales)
- Reductor de la absorción de grasas en la bollería industrial
- Acidulante
- Endulzante
- Antiséptico
- Saborizante



- Excipiente formulación, suplementos de ciertos minerales, reguladores del pH...etc.
- **GA-calcio:** inyecciones efecto anti-necrosis en tejidos profundos
- **GA-hierro:** tratar la anemia
- **GA-zinc:** acelerar la curación de heridas, tratar el resfriado común, maduración sexual retardada, alteraciones en la piel o decaimiento mental
- **GA-quinina:** inyectado intramuscularmente para tratar la malaria



GA – sodio → Capacidad quelante

- Lavado de paredes pintadas para quitar precipitados de carbonatos metálicos, evitar la corrosión.
- Formulación del cemento controlar los tiempos de asentado de la construcción, mejorar la resistencia

2.3. Aplicaciones



- Reciclar catalizadores metálicos desgastados de Mo, Ni y Al
- Eliminar los óxidos alcalinos residuales de la industria metalúrgica



- Detectar la madurez de la uva y hacer controles de calidad
- Cantidad en el vino no puede superar los 300 mg/L → Conseil du Vigne et du Vin



Agente quelante de iones Fe y Cl → retirar sustancias cloradas a pH neutro

Reacción de Fenton



- Evitar la formación de depósitos de hierro en los tejidos
- Desencolado de poliésteres y fibras de poliamida.

Gran
capacidad
quelante

3. MICROORGANISMOS PRODUCTORES

Microorganismos productores

3.1. Hongos

➤ *Aspergillus niger*

 Es el m.o más utilizado en la industria

 Muy sensible al pH ácido → desactiva glucosa oxidasa

Limitar efecto

- Neutralización con NaOH // CaCO₃ u otros → según producto
- Eliminación H₂O₂ por catalasa

➤ *Penicillium luteum*

 Limitación de pH no es tan crítica en subespecies de *Penicillium*

 El rendimiento no es tan alto y tarda más tiempo en convertir

 Concentración inicial de glucosa baja

Desventaja General: no se puede trabajar en continuo → micelio

3.1. Hongos

Gluconate-producing fungi	References
<i>Aspergillus niger</i>	Ajala et al., 2017 Chuppa-Tostain et al., 2018 Ahmed et al. (2015)
<i>Aspergillus carneus</i>	Lim and Dolzhenko, (2021)
<i>Aspergillus terreus</i>	Ahmad Anas et al. (2012)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Anastassiadis and Rehm, 2006a Anastassiadis and Rehm, 2006b Anastassiadis et al., 2003 Ma et al. (2018)
<i>Penicillium variable</i>	Crognale et al. (2008)
<i>Penicillium puberulum</i>	Ahmed et al. (2015)
<i>Penicillium frequentans</i>	Ahmed et al. (2015)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Ramachandran et al. (2006)
<i>Penicillium glaucum</i>	Ramachandran et al. (2006)
<i>Penicillium notatum</i>	Ramachandran et al. (2006)
<i>Penicillium oxalicum</i>	Han et al. (2018)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kapat et al. (2001)

Tabla 2. Hongos productores de gluconato con aplicaciones valiosas [2].

3.1. Hongos

➤ *Aureobasidium pullulans*

- Levadura tipo hongo

✚ Rendimiento del 97%

✚ Concentraciones iniciales de glucosa muy altas (~400 g/L)

✚ Recuperación sencilla pues células libres

↓
métodos continuos

■ No se ha probado escala industrial

■ No hay demasiada literatura al respecto

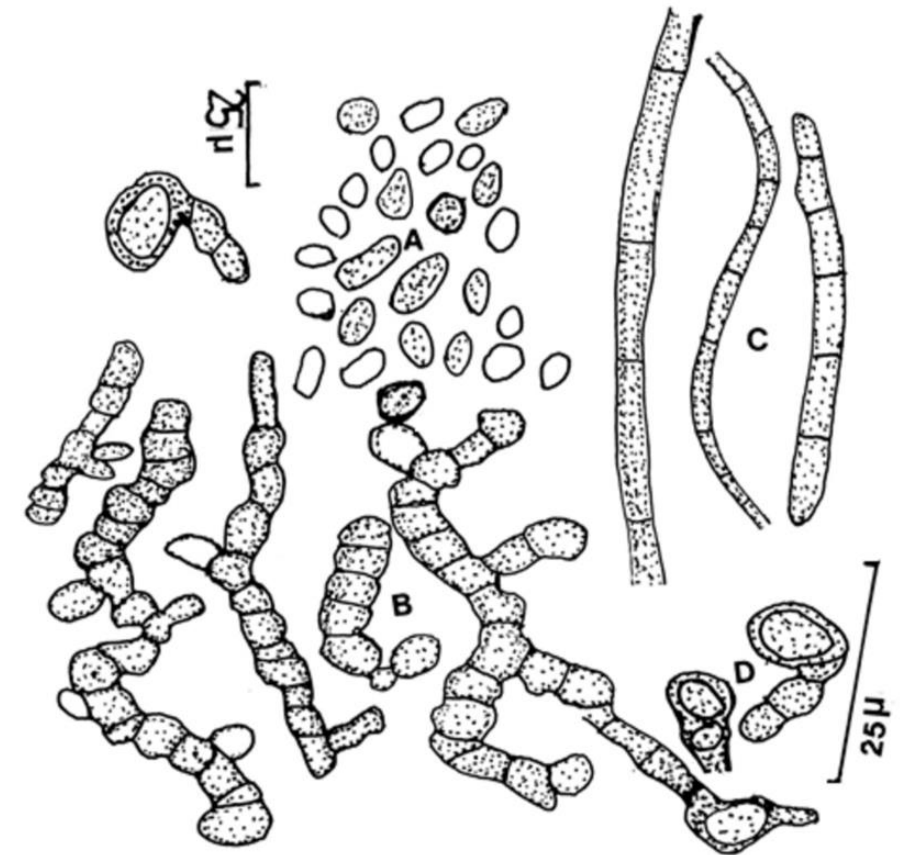


Fig 1. *Aureobasidium pullulans* (A) Conidia (B) Conidiophores (C) Hyphae (D) Chlamydospore-like cells [3].

3.2. Bacterias

- ¿Por qué? → Nuevas rutas metabólicas y regímenes de producción
- **Gluconobacter oxydans** es la bacteria más estudiada
- Enzima encargada de la biotransformación distinta → **Glucosa deshidrogenasa (GDH)**
- Oxidación glucosa por 2 rutas
 - [Glucosa] < 15mM → ruta de las pentosas fosfato
 - [Glucosa] > 15 mM → ruta reprimida y acumulación GA
 - Oxidación directa de glucosa usando varias DH NADP-dependientes
 - Cofactor PQQ
 - Se obtiene ácido glucónico, ácido 2-ketoglucónico y ácido 2,5- diketoglucónico

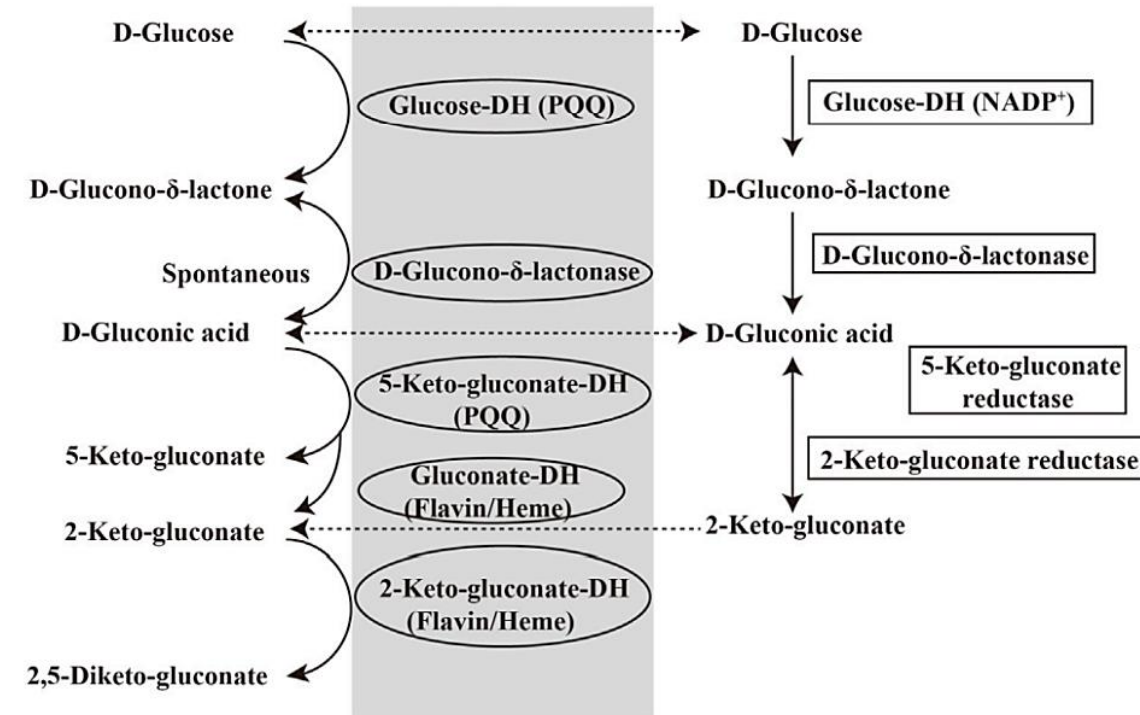


Fig 2. Ruta general bacteriana para la oxidación de glucosa a ácido glucónico [2]

• Tolerancia a pH ácidos

• Muy sensibles a la concentración inicial de glucosa
• Altos requerimientos vitaminas

3.2. Bacterias

- **Acetobacter diazotrophicus**

■ Rendimiento alto pero menor que G. Oxydans

+ Mucho más tolerante al pH

- **Acetobacter methalonicus**

+ Fuente de carbono barata → metanol

+ GA producido es final de ruta → no oxidación a Ketogluconatos

- **Zymomonas mobilis**

+ Mezcla glucosa + fructosa → Transforma ácido glucónico + sorbitol

+ Rendimiento cercano al 100%

■ Inmovilización de las células siguen bajo estudio → escala industrial

Gluconate-producing bacteria	References
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	Pal et al. (2016)
<i>Acetobacter methanolicus</i>	Pal et al. (2016)
<i>Gluconobacter oxydans</i>	Pal et al., 2017 Hou et al., 2018 Yao et al., 2017 Zhou and Xu, 2019 Jiang et al. (2016)
<i>Gluconobacter japonicus</i>	Cañete-Rodríguez et al. (2016)
<i>Pseudomonas taetrolens</i>	Alonso et al. (2015)
<i>Zymomonas mobilis</i>	Ferraz et al. (2001)
<i>Azospirillum brasiliensis</i>	Rodríguez et al. (2004)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Wang et al. (2016)
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	Wang et al., 2018
<i>Pseudomonas ovalis</i>	Pal et al. (2016)
<i>Pseudomonas acidovorans</i>	Ramachandran et al. (2017)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sun et al. (2015)
<i>Rhodotorula rubra</i>	Ramachandran et al. (2017)

Tabla 3. Bacterias productoras de gluconato con aplicaciones valiosas [2]

3.2. Bacterias

- **Pseudomonas ovalis**



Rendimientos del 99%



Mucha dependencia de la tasa de aireación.

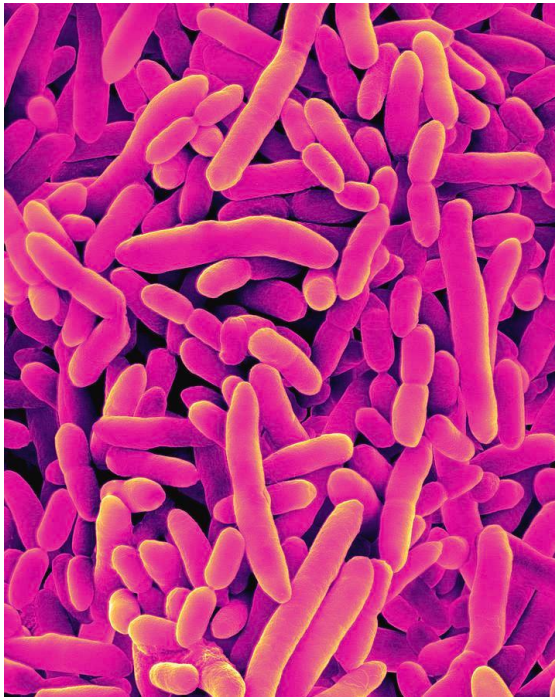


Fig 3. Cultivo de *Pseudomonas Ovalis* [4].

- **Otras especies *Gluconobacter* y *Pseudomonas*** tienen rutas metabólicas favorecidas → producción industrial **gluconolactonas**

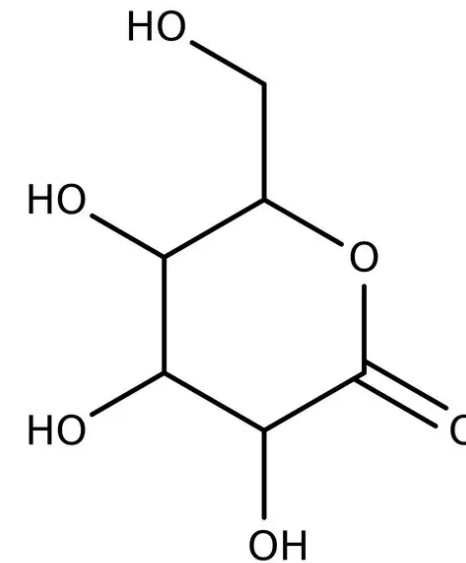


Fig 4. Uno de las varias gluconolactonas que podemos producir [5].

4. *ASPERGILLUS NIGER*

Aspergillus niger

4.1. Taxonomía

- Familia Aspergillus consta de 340 especies
 - 2 grandes secciones {
 - Aspergillus Nigri → *A. Niger*
 - Aspergillus Flavi
- Reproducción asexual por conidiospóras
- Clasificación:
 - Morfología
 - Color de las conidiósporas
 - Células de Hulle
 - Sclerotia
- Algunas subespecies de Aspergillus pueden liberar **micotoxinas** →
→ **Registro del potencial genético y fisiológico** de la cepa industrial

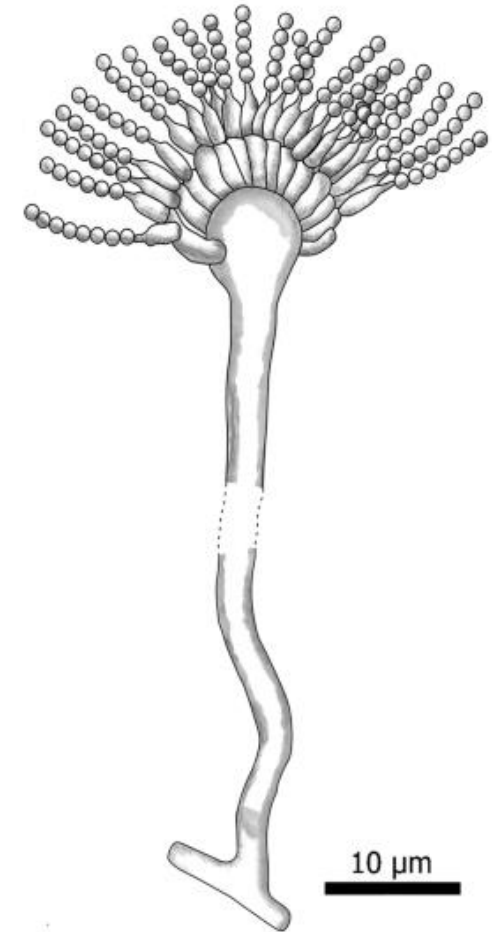


Fig 5. Morfología de estructuras reproductoras de *A. Niger* [6].

4.1. Taxonomía

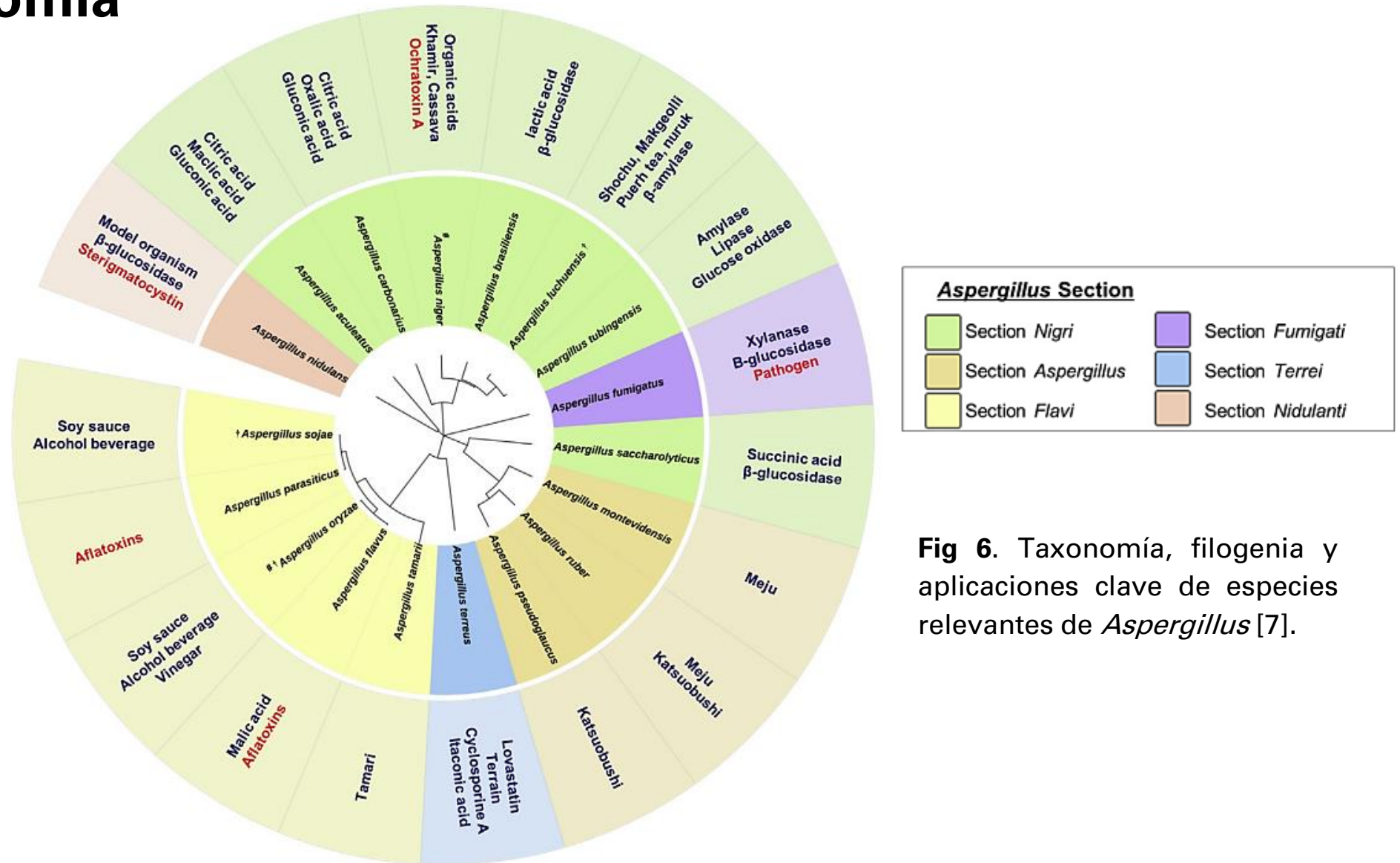



Fig 6. Taxonomía, filogenia y aplicaciones clave de especies relevantes de *Aspergillus* [7].

4.2. Glucosa Oxidasa (GOD)

- Proteína globular oxidorreductasa
- 2 dominios principales:
 - Dominio FAD-binding
 - Dominio de enlace a sustrato ★
- Alta actividad, especificidad y estabilidad → 
 - ↳ GOD baja tasa de reacción con otros azúcares
 - ↳ Ácido glucónico muy puro sin productos 2arios
- Natural en *A. niger*, más accesible y económica

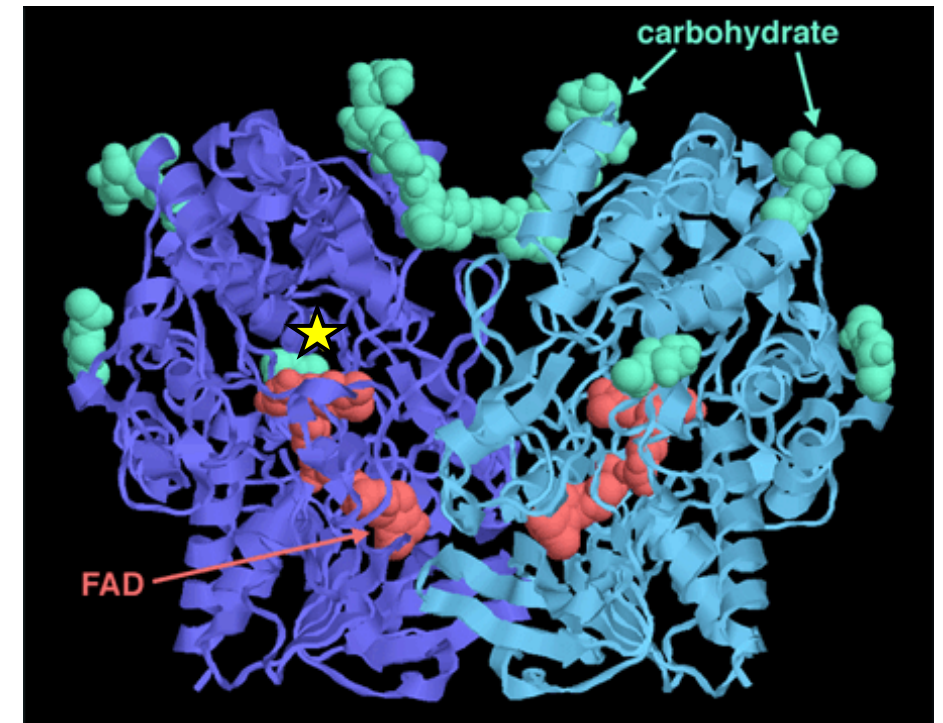


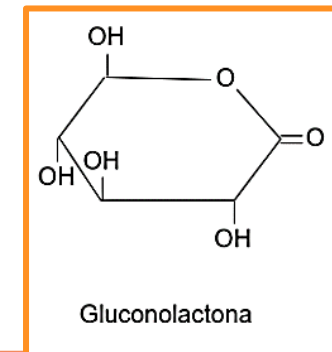
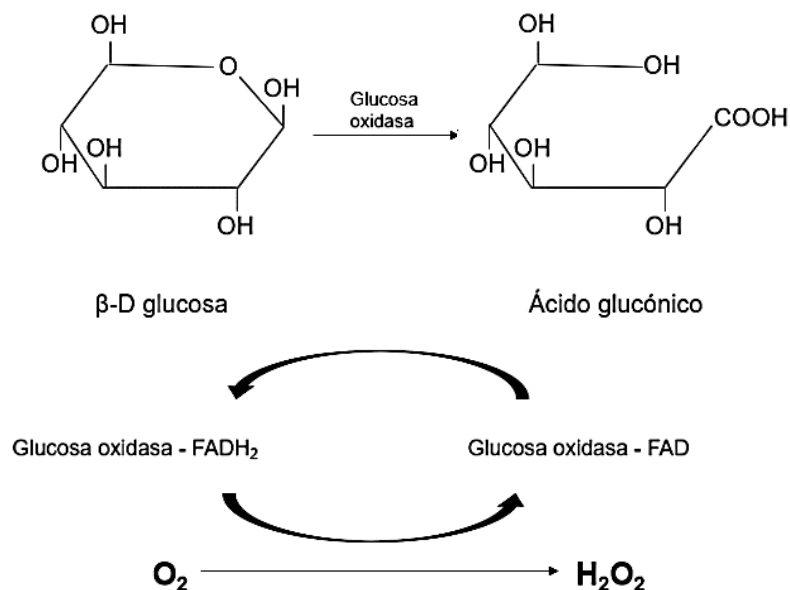


Fig 7. Morfología y partes importantes de GOD [8].

4.2. Glucosa Oxidasa (GOD)

Durante la biotransformación:

1. GOD se auto-reduce retirando $2H^+$ de la glucosa  aldehído C1.
2. Forma reducida de GOD oxidada por $O_2 \rightarrow H_2O_2$  $H_2O + O_2$



En realidad, se genera un producto intermedio

Glucono-d-lactona



Equilibrio dependiente de la hidratación y la deshidratación

Fig 8. Reacción de biotransformación de la glucosa a GA [9].

4.2. Glucosa Oxidasa (GOD)

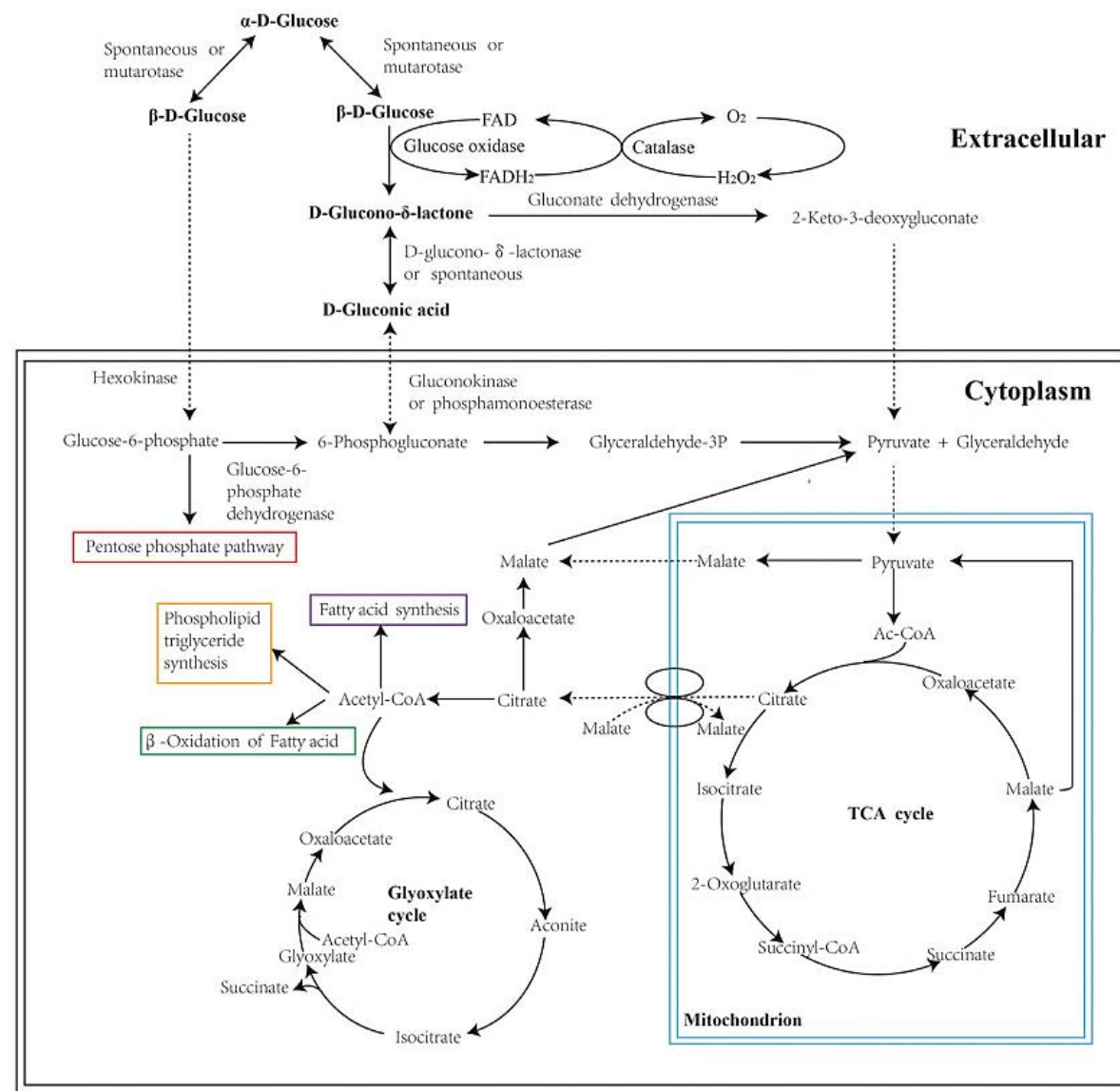
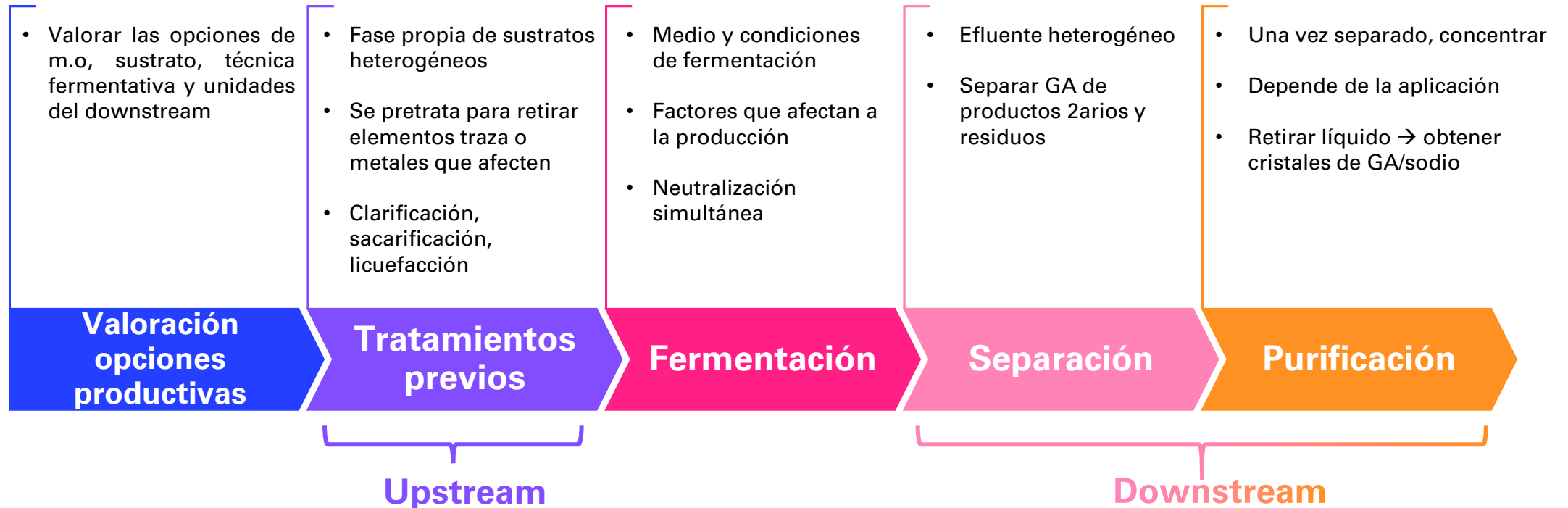


Fig 9. Ruta metabólica general del ácido glucónico partiendo de glucosa en hongos [2]

5. PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE ÁCIDO GLUCÓNICO

Producción industrial de ácido glucónico



5.1. Qué podemos producir y cómo

➤ Qué producir

- Ácido glucónico, gluconolactonas o sales derivadas
- Sales derivadas: GA-hierro, GA-calcio y GA-sodio

Más producido

- ✓ Más aplicaciones
- ✓ Menor tiempo de fermentación
- ✓ Neutralización más eficaz

➤ Cómo producir

1. **SmF**: Fermentación sumergida aireada con *A. Niger*

- + Mucha literatura y experiencia
- + Buen rendimiento → 95-98%
- Discontinuo → micelio

2. **SSF**: Fermentación superficial en estado sólido con *A. Niger*

- + Semicontinuo
- + Mejor rendimiento → ~100%
- + Downstream más simple
- + Menos requerimientos de O₂
- Poca literatura al respecto

5.2. Tratamientos previos (Upstream)

- Producción **cara** → restringe aplicaciones → Abaratar costes



Sustituir fuente carbono por **fuentes heterogéneas**

Mejores rendimientos

- Melazas caña azúcar
- Mosto de uva

- Deben ser clarificadas →  elementos traza y metales pesados



Método del ferrocianuro potásico (HFC) → **K₄Fe(CN)₆**

- Inhibir crecimiento
- Dificulta downstream

- Otros pretratamientos: sacarificación y licuefacción

5.2. Tratamientos previos (Upstream)

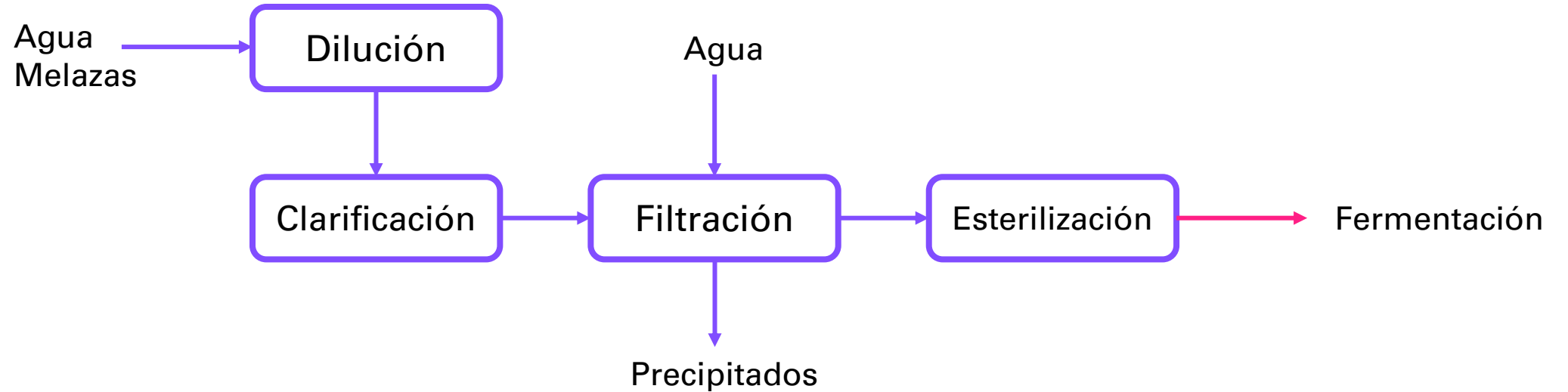


Fig 10. Diagrama del upstream

5.3. Fermentación

➤ Fermentador:

- Fermentadores agitados sumergido → ↑ viscosidad
- Solución → morfología cultivo pellet
- [O₂] ↓ centro pellet → recurrimos aireación + agitación

➤ Efecto del pH:

- Etapa Crecimiento pH = 6.5 → Etapa Productiva pH = 5.5.
 - pH ↓ baja al liberar GA + H₂O₂ → + NaOH progres. ✗ Inactiva GOD a pH 3

- Etapa Productiva GA (max) = Etapa Productiva GOD (max) → Parámetros similares
- η 90-98% → baja 2-4% tras el downstream
- Otras cepas viables: depende producto, fuente de C, regimen producción...

Condiciones fermentación	Otras cepas posibles
[O ₂]ini = 200–300 g/L	A. Niger ORS-4.410
30C	A. Niger CCM8004
pH = 6.5	A. Niger AN151
Vel_aire_ini=0.15vvm	Pseudomonas Ovalis
Vel_aire_fin = 1vvm	G. Oxydans NBIMCC

Factores
Temperatura
Tasa de aireación
[Glucosa] (ini)
[Mg] & [P]
Espuma

5.3. Fermentación

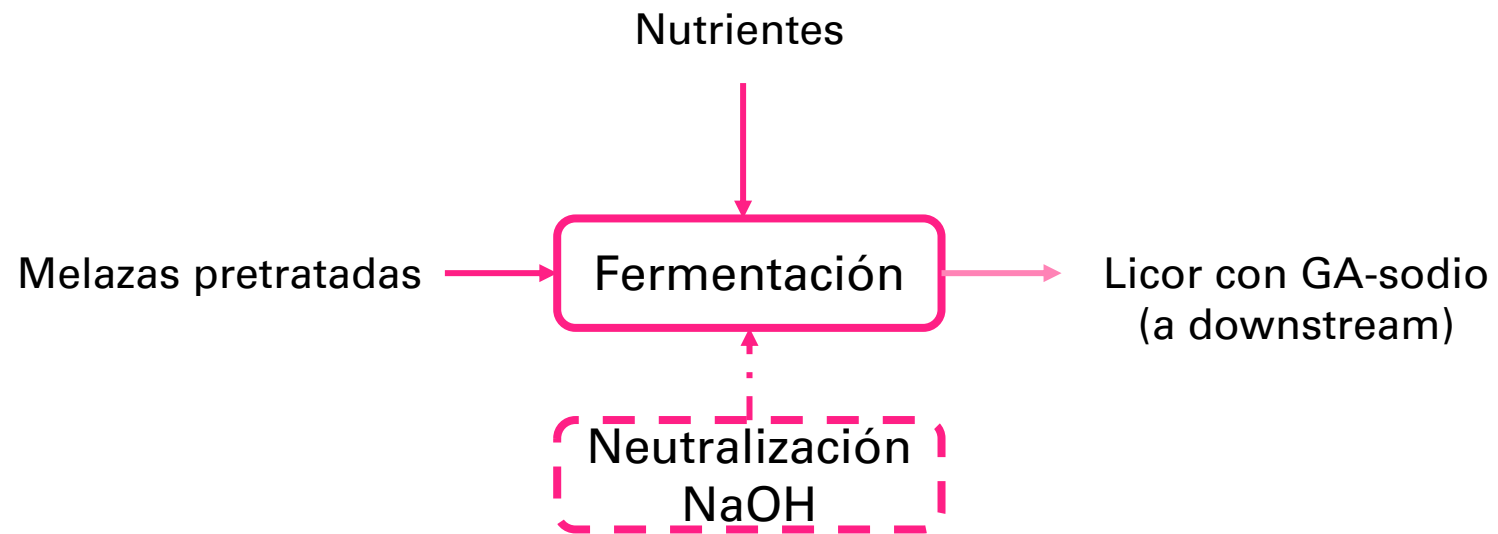



Fig 11. Diagrama de la fermentación

5.4. Downstream

- El downstream varía en función 

- Fuente de carbono
 - Método de fermentación
 - Microorganismo usado
- El downstream no varía demasiado si variamos la sal a producir
- **Reto:** downstream sostenible → Más difícil a **más pureza**
 - Uso fuentes de carbono heterogéneas
 - **Muchas unidades** operando + costes asociados
- **Unidades operativas de la separación:**
 1. Filtración → micelio
 2. Nanofiltración → impurezas y productos secundarios
 3. Decoloración → columna de carbón activado

5.3. Separación (Downstream)

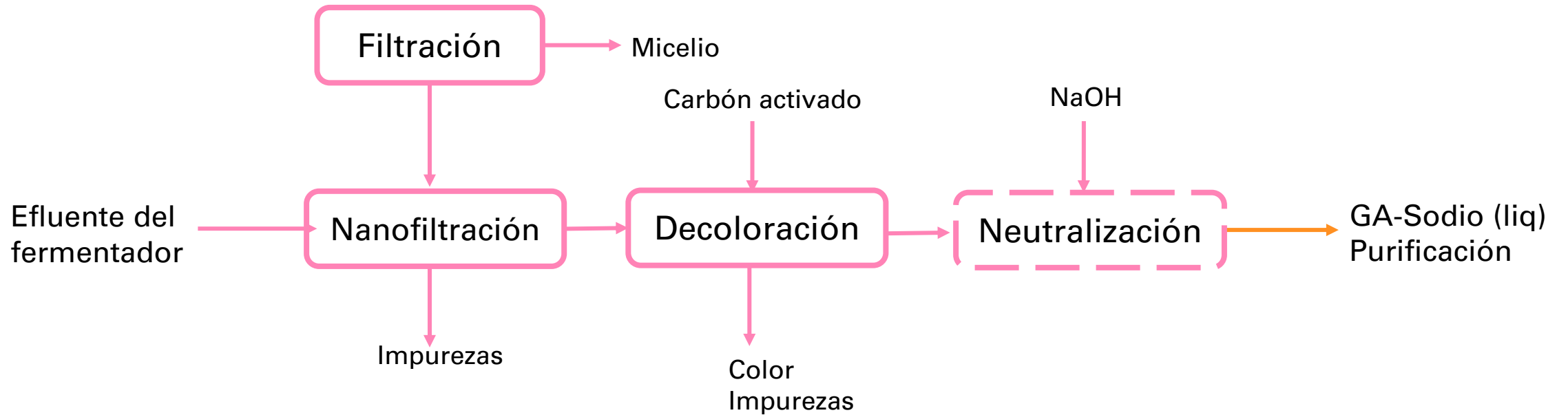


Fig 12. Diagrama de la separación

5.4. Purificación (Downstream)

- **Unidades operativas de la purificación:**
 4. Evaporación → concentramos en casi el 50% el caldo
 5. Cristalización → concentramos los sólidos en cristales que separamos del caldo restante
 6. Secado → se retira el agua restante de los cristales

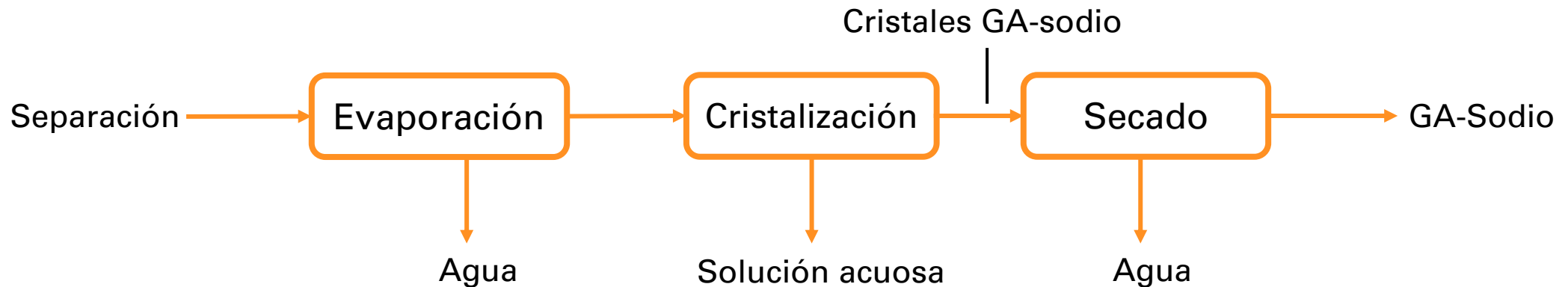


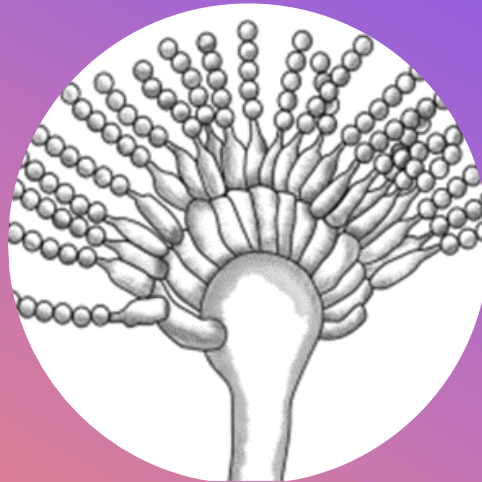
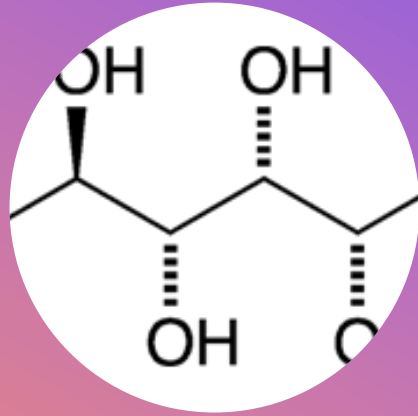
Fig 13. Diagrama de la purificación

6. CONCLUSIÓN

Conclusión

- Incremento sostenido de la producción, fomentado por biotransformaciones
- El método más extendido y con mayor productividad volumétrica es **SmF** empleando **A. Niger** como m.o fermentador
- La enzima glucosa oxidasa es la enzima clave que cataliza la reacción glucosa \rightarrow GA
- **Mejoras futuras:**
 - Fuentes de nutrientes alternativas más baratas \rightarrow metanol, melazas, mostos...
 - Screening e ingeniería genética sobre microorganismos conocidos y por conocer
 - Nuevas técnicas fermentativas \rightarrow SSF, inmovilización celular o enzimática, airlift...
 - Nuevos regímenes de producción \rightarrow régimen continuo con bacterias o *A. Pullulans*
 - Nuevas tecnologías de downstream \rightarrow membranas a medida, disolventes sostenibles, biorremediación
 - Simular y modelizar los procesos \rightarrow SuperPro Designer y ASPEN Hysys



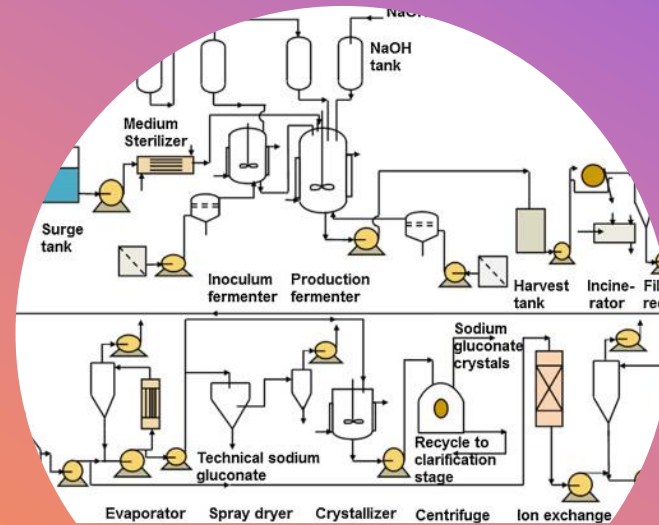
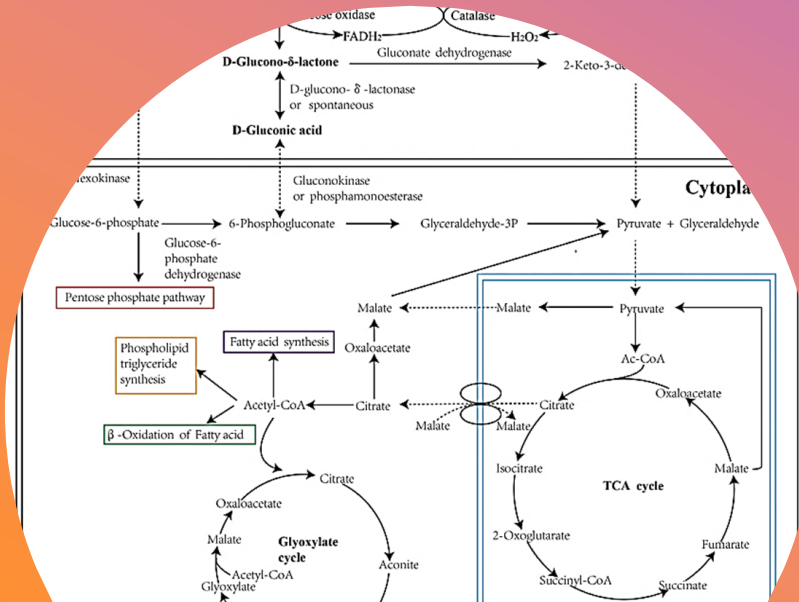


GRACIAS

Álvaro Moreno Sevilla

Producción Industrial de Ácido Glucónico

2022 / 2023



Referencias

1. Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., & Larroche, C. (2006). Gluconic acid: properties, applications and microbial production. *Food Technology & Biotechnology*, 44(2)
2. Ma Y, Li B, Zhang X, Wang C and Chen W (2022) Production of Gluconic Acid and Its Derivatives by Microbial Fermentation: Process Improvement Based on Integrated Routes. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10:864787. doi: 10.3389/fbioe.2022.864787
3. Abdulwehab, Sohair & El-Nagerabi, Saifeldin & Elshafie, Abdulqadir. (2015). Leguminicolous fungi associated with some seeds of Sudanese legumes. *Biodiversitas*. 16. 269-280.
4. <https://fineartamerica.com/featured/2-pseudomonas-putida-dennis-kunkel-microscopyscience-photo-library.html>
5. <https://www.fishersci.es/shop/products/gluconolactone-99-thermo-scientific/10461481>
6. Barros Correia, A. C. R., Barbosa, R. N., Frisvad, J. C., Houburken, J., & Souza-Motta, C. M. (2020). *The polyphasic re-identification of a Brazilian Aspergillus section Terrei collection led to the discovery of two new species. Mycological Progress*, 19(9), 885–903. doi:10.1007/s11557-020-01605-4
7. Park, H. S., Jun, S. C., Han, K. H., Hong, S. B., & Yu, J. H. (2017). Diversity, application, and synthetic biology of industrially important *Aspergillus* fungi. *Advances in applied microbiology*, 100, 161-202.
8. https://www.pianetachimica.it/mol_mese/mol_mese_2006/05_GlucosioOx/GlucosioOx_1_ita.htm
9. Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, S. R. & Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase - An overview. *Biotechnology Advances*. 27(4), 489-501