



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

---

**Facultad de Ciencias**

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**PRODUCCIÓN INDUSTRIAL  
DE ÁCIDO GLUCÓNICO**

Presentado por:

**D. Álvaro Moreno Sevilla**

Curso académico 2022/2023

# ÍNDICE

<b>Abstract</b>	<b>4</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>5</b>
1.1. Objeto y justificación de la tesis .....	5
1.2. Ácidos Orgánicos .....	5
1.2.1. Ácido cítrico .....	6
1.2.2. Ácido láctico .....	6
1.2.3. Ácido itacónico .....	7
1.3. Ácido glucónico .....	7
1.3.1. Propiedades .....	8
1.3.2. Aplicaciones .....	9
1.3.3. Evaluación de mercado .....	11
<b>2. Microorganismos y enzimas</b>	<b>12</b>
2.1. Microorganismos productores .....	12
2.1.1. Hongos .....	12
2.1.2. Bacterias .....	13
2.1.3. Levaduras tipo hongo .....	14
2.2. Hongos y Glucosa oxidasa (GOD) .....	15
2.2.1. <i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i> .....	15
2.2.2. Glucosa oxidasa en <i>A. Niger</i> .....	16
2.2.3. <i>Aspergillus Niger</i> .....	16
• Taxonomía .....	17
• Mejora de cepas: Cepa AN-151 y Cepa ARNU-4 .....	18
<b>3. Producción de ácido glucónico</b>	<b>20</b>
3.1. Qué podemos producir y cómo .....	20
3.2. Tratamientos previos .....	21
3.3. Fermentación .....	22
3.3.1. Medio y Condiciones de fermentación .....	22

3.3.2. Factores que afectan a la producción .....	24
• Tasa de aireación (Intercambio de oxígeno) .....	24
• Efecto del pH .....	25
• Temperatura .....	26
• Presencia de glucosa .....	26
• Efecto del Magnesio y el Fósforo .....	26
• Efecto de la espuma .....	27
3.4. Separación y Purificación .....	27
<b>4. Conclusión</b>	<b>30</b>
<b>5. Bibliografía</b>	<b>31</b>
5.1. Bibliografía de las figuras .....	41
5.2. Bibliografía de las tablas .....	41

## ***Abstract***

Gluconic acid is a multifunctional weak carbonic acid with numerous chemical and physiological properties. Gluconic acid, its derived salts (sodium gluconate, calcium gluconate and other alkali metal salts) and gluconolactones have numerous applications in the construction, food, chemical, pharmaceutical and many other industries. The industrial production of gluconic acid has experienced sustained growth since the 1950s. The most widely implemented production model in the industry is the aerated submerged fermentation of glucose refined by *Aspergillus niger*, which through its enzymatic collection (especially glucose oxidase) oxidizes glucose to gluconic acid. For some time, other production methods such as chemicals, using petroleum derivatives, have partially displaced the use of fermentations, restricting their market niche. For this reason, new studies are being carried out on the subject and, with this, new technologies appear that will increase the benefits of using biotransformation, making the most polluting chemical method obsolete. Some of the new technologies that are being developed to improve the production of gluconic acid include: the use of cheaper alternative sources of nutrients, such as methanol or some agro-industrial residues, the screening of new microorganisms and genetic engineering on those already known, the use of bacteria or *Aureobasidium Pullulans* in a continuous production regime, the implementation of new fermentation techniques such as the airlift fermenter, solid state surface fermentation, cell or enzymatic immobilization, the use of simulators and modelers of industrial processes such as SuperPro Designer or ASPEN Hysys and the implementation of new membrane systems for separation and purification. These new technologies have the potential to make gluconic acid production more sustainable, efficient, and profitable. As a result, they could help displace the use of more polluting chemical methods and expand the market for gluconic acid.

***Keywords:*** gluconic acid, glucose oxidase, *Aspergillus niger*, fermentation

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Objeto y justificación de la tesis

Ante la creciente necesidad de un desarrollo sostenible, la industria de las biotransformaciones ha visto aumentada su demanda y está sustituyendo la producción de químicos derivados del petróleo. Este el caso de muchos ácidos orgánicos, entre ellos el ácido D-glucónico [1, 2]. El ácido D-glucónico es uno de los 16 isómeros del ácido 2,3,4,5,6-pentahidroxihexanoico, que deriva de la oxidación de la glucosa por la acción enzimática de la glucosa oxidasa o glucosa deshidrogenasa presentes en hongos y bacterias respectivamente [3, 5]. De aquí en adelante denominaremos al ácido D-glucónico como “ácido glucónico”. El ácido glucónico es un ácido carbónico débil multifuncional con numerosas propiedades químicas y fisiológicas [4]; por lo que éste, sus sales derivadas (gluconato de sodio, gluconato de calcio y sales metálicas alcalina) y las gluconolactonas tienen numerosas aplicaciones en las industrias de la construcción, alimentaria, química, farmacéutica y muchas otras. Además, estos son compuestos naturales que se encuentran muy presentes en la naturaleza [1, 6].

El presente trabajo tiene por objeto explicar cómo es la producción industrial de ácido glucónico revisando la bibliografía publicada hasta la fecha sobre las diferentes técnicas productivas desarrolladas durante los últimos 80 años, sus ventajas y desventajas, así como los problemas actuales y los avances que podrían solucionarlos en el futuro [7]. Se trata, principalmente, de analizar los mejores métodos de producción que hagan uso de fermentaciones microbianas continuas o discontinuas en sus diferentes configuraciones utilizando hongos, levaduras tipo hongo o, en menor medida, bacterias [4, 8, 9]. Actualmente el ácido glucónico es mayormente producido mediante *Aspergillus Niger* en una fermentación sumergida aireada empleando glucosa refinada como fuente de carbono. Este proceso tiene un rendimiento de entre el 95-98% [1, 6].

## 1.2. Ácidos Orgánicos

Los ácidos orgánicos son una clase de compuestos orgánicos con propiedades ácidas conferidas por uno o más grupos carboxilo ( $-\text{COOH}$ ) unidos a un esqueleto de carbono. Dicha acidez también puede ser dada por grupos hidroxilo, tiol, enol, sulfonato o fenol; aunque la

acidez aportada por estos grupos es menor que aquella aportada por el grupo carboxilo [10]. Los ácidos orgánicos son metabolitos primarios, es decir, son moléculas clave para el crecimiento y el metabolismo del microorganismo. Por esta razón casi cualquier microorganismo es un potencial productor [1, 11]. En general, los ácidos orgánicos son ácidos débiles que se encuentran comúnmente en la naturaleza y juegan un papel importante en muchos procesos biológicos como el metabolismo energético o el mantenimiento del microbioma intestinal [11, 12]. La producción de estos compuestos usando biotransformaciones ha mejorado su implantación en el mercado encontrando multitud de aplicaciones [10]. En el presente estudio trataremos con algo más de profundidad aquellos ácidos orgánicos con una mayor aplicabilidad e importancia en nuestras vidas, estos son el ácido cítrico, el ácido láctico y el ácido itacónico. Sin embargo, muchos otros ácidos poseen numerosas aplicaciones como son el ácido acético, ácido oxálico, ácido succínico y los ácidos polihidroxicarboxílicos [13, 14].

#### **1.2.1. Ácido Cítrico**

El ácido cítrico es un ácido orgánico débil tricarboxílico que se encuentra naturalmente en frutas cítricas. Es producido comercialmente, en mayor proporción, por *A. Niger* en una fermentación sumergida aireada que usa melazas como fuente de carbono [15, 16]. El producto comercial es un polvo cristalino blanco de sabor agrio y soluble en agua que se emplea como buffer, antioxidante, anticoagulante y conservante en la industria alimentaria, así como en productos farmacéuticos, agentes de limpieza y cosméticos [12-14].

#### **1.2.2. Ácido Láctico**

El ácido láctico es un ácido orgánico carboxílico producido por multitud de organismos durante el metabolismo anaerobio y naturalmente presente en los productos lácteos fermentados. Su producción industrial se consigue mayoritariamente empleando diferentes subespecies de *Lactobacillus* en una fermentación de azúcares como fuente de carbono [10, 17]. Tiene aplicaciones en la industria alimentaria como conservante, aromatizante y regulador del pH; además de usarse en las fermentaciones lácticas para obtener queso, yogur y otros productos lácteos fermentados. En la industria farmacéutica el ácido láctico se utiliza como agente hidratante, exfoliante, emulsificante, estabilizante y en productos antiacné. También se

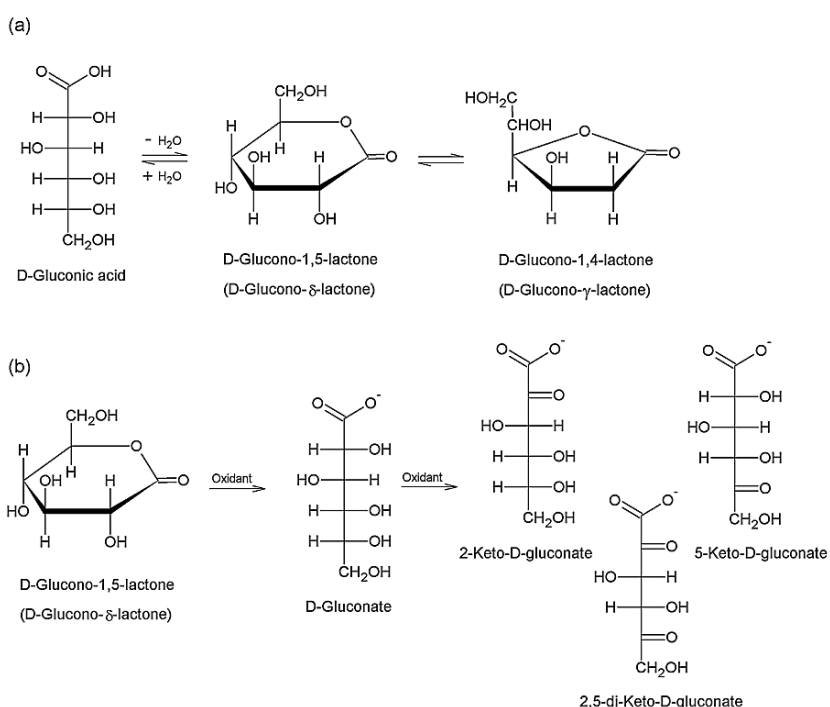
emplea en la industria química para la producción de plásticos biodegradables y como materia prima en la síntesis de otros productos químicos [17, 18].

### 1.2.3. Ácido Itacónico

El ácido itacónico es un ácido orgánico dicarboxílico insaturado cuya producción en la actualidad es llevada a cabo por medio de una fermentación sumergida aireada con *Aspergillus Terreus* o, en menor medida, *Aspergillus Itaconicus* [13]. Este compuesto tiene aplicaciones principalmente en la producción de plásticos, fibras, resina y derivados; también se emplea en la producción de pinturas, detergentes y más recientemente en las industrias alimentaria y farmacéutica [1].

### 1.3. Ácido Glucónico

El ácido glucónico (ácido 2,3,4,5,6-pentahidroxihexanoico) deriva de la oxidación del grupo aldehído del carbono 1 de la glucosa por la acción enzimática de la glucosa oxidasa o glucosa deshidrogenasa que se encuentran en hongos y bacterias respectivamente [3, 5]. El ácido glucónico es un ácido carbónico débil multifuncional con numerosas propiedades químicas y fisiológicas; por lo que éste, sus sales derivadas (gluconato de sodio, gluconato de calcio y sales metálicas alcalina) y las gluconolactonas tienen numerosas aplicaciones [4].



**Fig 1.** (a) Equilibrio químico del ácido glucónico y sus lactonas en solución acuosa [9].  
(b) Oxidación química del ácido glucónico por un oxidante fuerte [9].

Actualmente el ácido glucónico es mayormente producido mediante *A. Niger* en una fermentación sumergida aireada empleando glucosa refinada como fuente de carbono. Este proceso tiene un rendimiento de entre el 95-98% [1, 6]. Sin embargo, no es el único microorganismo capaz de sintetizarlo con altos rendimientos, pudiendo usarse en su lugar hongos de la especie *Penicillium* o bacterias como *Gluconobacter Oxydans* [19, 6]. También se investiga la posibilidad de que una levadura tipo hongo como *A. Pullulans* pueda obtener en un futuro, cuando se estudie más y se conozca mejor su metabolismo, mejores rendimientos volumétricos en menos tiempo [20, 21].

### 1.3.1. Propiedades

El ácido glucónico es un ácido orgánico débil no corrosivo, no tóxico, no volátil, muy biodegradable y estable en condiciones normales. [4]. La fórmula química es  $C_6H_{12}O_7$  y su peso molecular es de 196.16 g/mol [11]. El punto de fusión está por debajo de los 12°C, el punto de ebullición se encuentra entre 130 – 132 °C y es soluble en agua y etanol, pero no en éteres o disolvente orgánicos [1]. El ácido glucónico se suele comercializar como una solución acuosa al 50% con un pH de 1.82 y densidad 1.23 g/cm<sup>3</sup> [9], aunque también se comercializa en polvo.

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 [11]

Debido a que el ácido glucónico es a la vez un ácido y un alcohol, se puede producir, en solución acuosa, una pérdida espontánea de una molécula de agua que da lugar a una esterificación intramolecular entre los carbonos 1 y 5 que producirá un éster cíclico conocido como gluconolactona (D-glucono- $\delta$ -lactona y D-glucono- $\gamma$ -lactona) [Fig. 1a, 22, 9]. El complejo equilibrio establecido entre las gluconolactonas y con el ácido libre estará influenciado por la disociación del ácido libre (constante de disociación a 25°C  $K_a =$



$1.99 \times 10^{-4}$  y pKa de 3.70) y favorecido cuando el pH del medio se torne más ácido [11]; sin embargo, la velocidad de establecimiento del equilibrio es muy lenta porque la D-glucono- $\gamma$ -lactona se forma unas 100 veces más rápido que la D-glucono- $\delta$ -lactona [9]. Para acelerar el proceso podemos añadir una base que ataque rápidamente el éster cíclico escindiendo el anillo aldólico, dando como resultado una sal gluconato de cadena abierta [Fig 1b, 9]. La sal gluconato (gluconato de sodio o gluconato de calcio) tiene un poder quelante incluso mayor que el EDTA, NTA y otros, siendo capaz de unir metales di y trivalentes [11]. La determinación de ácido glucónico puede realizarse por el método del hidroxamato [23], método isotacoforético [24] o por medio de una cromatografía de gases del trimetilsilil (TMS) derivado preparado de acuerdo con Laker and Mount [25] utilizando inositol como referencia.

### **1.3.2. Aplicaciones**

Gracias a la multitud de propiedades expuestas anteriormente y a los numerosos efectos beneficiosos para la salud el ácido glucónico tiene aplicaciones en una gran cantidad de industrias y usos cotidianos. En la industria alimentaria tiene un uso generalizado como probiótico [9], se utiliza para el tratamiento de carnes, la coagulación del tofu [26], la obtención de productos lácteos y alimentos horneados formando parte de los agentes leudantes (levaduras industriales); además, se emplea como acidulante, endulzante, agente antiséptico, agente saborizante en bebidas y como agente reductor de la absorción de grasas en la bollería industrial [4, 5]. En la industria farmacéutica se usa como excipiente en la formulación de medicamentos con azúcares o alcoholes en su matriz, impidiendo así la cristalización en frío de la mezcla y su saponificación [27]. El ácido glucónico es usado también en la producción vinícola para detectar la madurez de la uva y hacer controles de calidad. La cantidad de ácido glucónico en el vino no puede superar los 300 mg/L [22]. El ácido tiene aplicaciones también en el tratamiento de aguas residuales gracias a sus propiedades como quelante de iones  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ ; de forma que se usa para retirar sustancias cloradas a pH neutro por medio de la reacción de Fenton [28]. Además, el ácido glucónico se ha usado para reciclar catalizadores metálicos desgastados de Mo, Ni y Al; siendo un éxito la recuperación de hasta un 99% del Molibdeno [29].

Las sales de ácido glucónico tienen numerosas aplicaciones en la industria farmacéutica como suplementos de ciertos minerales, reguladores del pH...etc. El gluconato de sodio tiene una poderosa capacidad quelante que lo hace ideal como principio activo en la formulación de detergentes y productos de limpieza para quitar depósitos calcáreos de cualquier tipo de superficie [9, 30-32]. La capacidad quelante de esta sal se aplica también a la industria textil donde es utilizada para evitar la formación de depósitos de hierro en los tejidos y el desencolado de poliésteres y fibras de poliamida. En la industria metalúrgica su uso permite eliminar los óxidos alcalinos. También se emplea en el lavado de paredes pintadas para quitar sólidos precipitados de carbonatos metálicos, evitando así la corrosión. Por último, en la industria cementera, se añade a la formulación del cemento para controlar los tiempos de asentado de la construcción y mejorar la resistencia a fuerzas y al agua [1, 4, 11, 30-35]. El gluconato de calcio es usado principalmente como fuente de calcio para tratar deficiencias del mismo en humanos y animales [11]. Las inyecciones de gluconato de calcio podrían tener un efecto anti-necrosis en tejidos profundos [36]. El gluconato de hierro y el fosfogluconato de hierro se usan para tratar la anemia [11, 37]. El gluconato de zinc se utiliza para acelerar la curación de heridas, tratar el resfriado común y otras enfermedades causadas por la deficiencia de este mineral como la maduración sexual retardada, la susceptibilidad a infecciones, alteraciones en la piel o decaimiento mental [1, 38]. Las inyecciones de gluconato de zinc también se emplean como método anticonceptivo y en la esterilización de animales de compañía como perros y gatos [40]. Otra sal derivada como el gluconato de quinina es inyectado intramuscularmente para tratar la malaria [39].

Components	Applications
Gluconic acid	Prevention of milkstone in dairy industry Cleaning of aluminium cans
Glucono- $\delta$ -lactone	Latent acid in baking powders for use in dry cakes and instantly leavened bread mixes Slow acting acidulant in meat processing such as sausages Coagulation of soybean protein in the manufacture of tofu In dairy industry for cheese curd formation and for improvement of heat stability of milk
Sodium salt of gluconic acid	Detergent in bottle washing Metallurgy (alkaline derusting) Additive in cement Derusting agent Textile (iron deposits prevention) Paper industry
Calcium salt of gluconic acid	Calcium therapy Animal nutrition
Iron salt of gluconic acid	Treatment of anaemia Foliar feed formulations in horticulture

**Tabla 2.** Aplicaciones industriales del ácido glucónico y derivados [5]

### 1.3.3. Evaluación del mercado

Los ácidos orgánicos son el tercer producto más sintetizado en el mundo utilizando fermentaciones y biotransformaciones, solo tras los antibióticos y aminoácidos [41]. El mercado global de ácidos orgánicos tiene un valor estimado de 12 Billion US\$ y se espera que siga creciendo gracias a una incesante demanda [42]. La producción de ácidos orgánicos está dominada por el ácido cítrico, siendo la implantación de mercado del ácido glucónico y sus derivados susceptiblemente menor (90,000 toneladas en 2009) [Tabla 2, 43]. El gluconato de sodio es el derivado del ácido con más aplicaciones, supone el 80% de la cuota productiva de ácido glucónico [44].

Usage	Quantity (in tonnes)	Total consumption (%)
Pharmaceutical industries	8,000	9.2
Food industries	30,000	34.5
Construction industries	40,000	46.0
Other usage	9,000	10.3
Total	87,000	100.0

**Tabla 3.** Consumo global de ácido glucónico en las distintas aplicaciones industriales [6]

Hoy en día la producción de ácido glucónico y sus derivados se realiza fundamentalmente a través de fermentaciones que emplean *A. Niger* y glucosa como fuente principal de carbono. Este es un proceso que rinde por encima del 95% [1, 45]. El coste productivo sigue siendo hoy día poco competitivo y va desde 1.2 US\$/kg para el ácido glucónico hasta 8.5 US\$/kg para el gluconato de calcio y las gluconolactonas [6, 9]. Por esta razón se investigan programas de mejora genética, el uso de subproductos agroindustriales como fuente de carbono, modificaciones en la fermentación para hacerla continua, mejoras en la separación-purificación o emplear enzimas inmovilizadas; todo para intentar hacer la producción de ácido glucónico más rentable y con ello que éste encuentre nuevos mercados y aplicaciones [4, 6].

## 2. MICROORGANISMOS Y ENZIMAS

### 2.1. Microorganismos productores

Existen multitud de artículos que revisan la producción de ácido glucónico y sus sales por varias especies de hongos y bacterias. Las especies bacterianas más estudiadas son *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Zymomonas* y *Gluconobacter*; mientras que los hongos considerados más aptos para la producción de ácido glucónico son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Aureobasidium* [48].

Gluconate-producing fungi	References	Gluconate-producing bacteria	References
<i>Aspergillus niger</i>	Ajala et al., 2017 Chuppa-Tostain et al., 2018 Ahmed et al. (2015)	<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	Pal et al. (2016)
<i>Aspergillus carneus</i> <i>Aspergillus terreus</i>	Lim and Dolzhenko, (2021) Ahmad Anas et al. (2012)	<i>Acetobacter methanolicus</i> <i>Gluconobacter oxydans</i>	Pal et al. (2016) Pal et al., 2017 Hou et al., 2018 Yao et al., 2017 Zhou and Xu, 2019 Jiang et al. (2016) Cañete-Rodríguez et al. (2016)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Anastassiadis and Rehm, 2006a Anastassiadis and Rehm, 2006b Anastassiadis et al., 2003 Ma et al. (2018)	<i>Gluconobacter japonicus</i>	
<i>Penicillium variable</i> <i>Penicillium puberulum</i> <i>Penicillium frequentans</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Penicillium glaucum</i> <i>Penicillium notatum</i> <i>Penicillium oxalicum</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Crognale et al. (2008) Ahmed et al. (2015) Ahmed et al. (2015) Ramachandran et al. (2006) Ramachandran et al. (2006) Ramachandran et al. (2006) Han et al. (2018) Kapat et al. (2001)	<i>Pseudomonas taetrolens</i> <i>Zymomonas mobilis</i> <i>Azospirillum brasiliensis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> <i>Pseudomonas ovalis</i> <i>Pseudomonas acidovorans</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Rhodotorula rubra</i>	Alonso et al. (2015) Ferraz et al. (2001) Rodríguez et al. (2004) Wang et al. (2016) Wang et al., 2018 Pal et al. (2016) Ramachandran et al. (2017) Sun et al. (2015) Ramachandran et al. (2017)

**Tabla 4.** Microorganismos productores de gluconato con aplicaciones valiosas [46]

#### 2.1.1. Hongos

Molliard, en 1922, descubrió ácido glucónico en un cultivo de *Sterigmatocytocytis nigar*, hoy conocido como *A. niger* [47, 48]. Tras esto Muller descubrió por primera vez la actividad de la enzima glucosa oxidasa (GOD) encargada de la biotransformación [11, 48]. De aquí en adelante, se demostró la presencia de ácido glucónico en cultivos de bacterias (*Pseudomonas*, *Gluconobacter* y *Acetobacter*), en cultivos de hongos (*Aspergillus* y *Penicillium*) y en cultivos de levaduras tipo hongo (*Aerobasidium*). Financiado por el departamento de agricultura de USA, en 1933, Currie et al. [49] consiguió rendimientos del 90% en 48-60h usando cepas genéricas de *A. niger* y *Penicillium luteum*. Mas adelante, se consiguió aislar una cepa de *A. niger* (cepa 67) haciendo tests fermentativos y Moyer la empleó consiguiendo rendimientos del 95% en 24 horas partiendo de soluciones de glucosa de 150-200 g/L, usando aire altamente comprimido (2 – 4 bar) y

neutralizando el producto con carbonato de calcio [50]. Posteriormente, Porges et al. [51] propuso una producción semicontinua usando *A. niger* en lugar de bacterias que mejoraba la reutilización del microorganismo al recuperar parte del micelio por filtración o centrifugación.

En 1952, Blom desarrolló un nuevo modelo productivo para obtener gluconato de sodio, neutralizando el ácido glucónico con hidróxido de sodio hasta pH 6.5 [52]. El gluconato de sodio es el derivado con mayor aplicabilidad comercial [1]. Hasta el día de hoy, aplicando los resultados obtenidos de estos estudios, la fermentación sumergida aireada utilizando *A. niger* es el método productivo de ácido glucónico y gluconatos más extendido [1, 4]. Por otro lado, en los últimos años se han hecho multitud de pruebas con otros métodos productivos y en muchos de los experimentos la fermentación superficial en estado sólido resultó ser más eficiente que cualquier otro tipo de fermentación [6, 53]. Sin embargo, aunque esto sea así, todavía es difícil determinar cuál es mejor por dos razones. La primera es que los datos de rendimientos publicados en la literatura actual varían mucho según el recurso de carbono y la cepa que usamos. La segunda razón es que si bien Singh et al. [47, 53] consiguió mejores rendimientos para la fermentación superficial en estado sólido, lo consiguió a escala de laboratorio, no a escala industrial. Además, las mejoras fueron mínimas respecto de la fermentación sumergida aireada.

### **2.1.2. Bacterias**

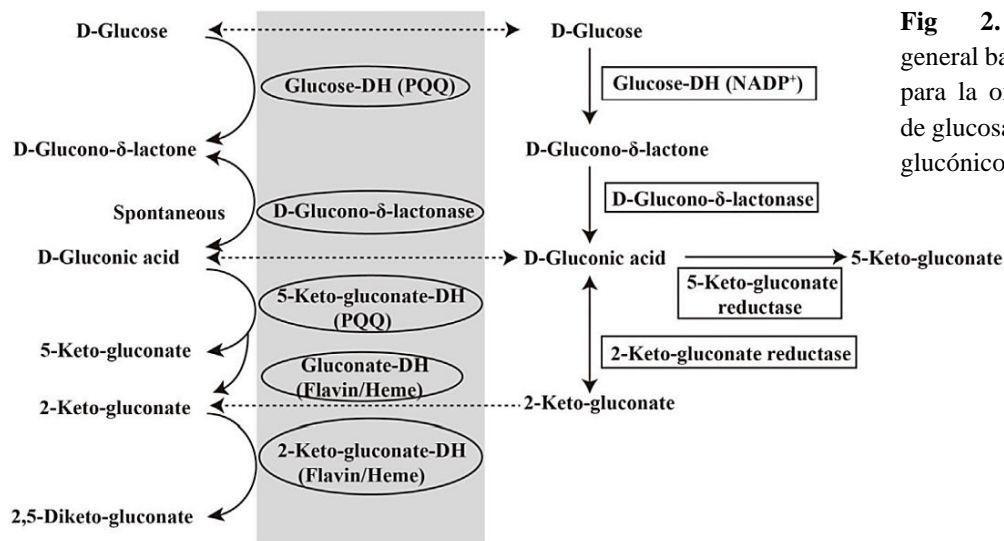
Sin embargo, pese a que *A. niger* domine la manufactura de ácido glucónico y sus derivados, se está investigando cómo mejorar los bioprocesos cuando empleamos *G. oxydans* o *Acetobacter diazotrophicus*. Además, en los últimos años han aparecido nuevas especies de bacterias como *Acetobacter methalonicus* y *Zymomonas mobilis* que prometen abrir nuevas rutas para la producción de ácido glucónico [9, 54]. Sin embargo, es importante mencionar que la razón del desplazamiento de los métodos productivos que emplean bacterias por parte de *A. niger* se debe principalmente a los altos requerimientos de vitaminas que tienen las bacterias como *Gluconobacter* y *Acetobacter* [19, 55]. A esta desventaja hay que añadir un menor rendimiento debido a la oxidación que sufre el ácido glucónico a ácido a 2-ceto-gluconato y 2,5-dicetogluconato [9, 19]. Ambos factores afectan mucho a la rentabilidad del ácido glucónico cuando es producido usando bacterias, fundamentalmente las vitaminas, que aumentan demasiado el coste productivo.

La bacteria *G. oxydans* es la mas estudiada. A diferencia de los hongos, la enzima que lleva a cabo

la biotransformación de la glucosa a ácido glucónico es la glucosa deshidrogenasa (GDH) [10, 53]. *G. oxydans* puede oxidar glucosa por dos rutas alternativas; cuando la concentración de glucosa es menor a 15mM se emplea la ruta de las pentosas fosfato. Por encima de este valor esta ruta es reprimida y el ácido glucónico se acumula. Otra opción es la oxidación directa de glucosa usando las 3 deshidrogenasas NADP-dependientes que usan PQQ como cofactor unidas a la membrana externa. Se obtiene de esta ruta ácido glucónico, ácido 2-ketoglucónico y ácido 2,5-diketoglucónico, como se puede ver en la figura 2 [10, 56, 57]. De hecho, la bacteria más utilizada en la biofermentación de ácido glucónico con bacterias es la cepa *G. oxydans* ATCC621H [57].

Por otra parte, *A. diazotrophicus* demostró altos rendimientos siendo mucho más tolerante al pH que *G. oxydans*, lo que la podría hacer una mejor candidata para la producción de ácido glucónico en el futuro [9-11]. Otra bacteria, *A. methanolicus*, tiene la ventaja de poder usar como única fuente de carbono el metanol, que es muy barato. Además, el ácido glucónico formado es un producto final de la ruta que no se sigue oxidando, como ocurre en *G. Oxydans* [9, 58].

Otras bacterias del género *Gluconobacter* y algunas *Pseudomonas* son usadas industrialmente para la producción de gluconolactonas, para las que poseen rutas metabólicas favorecidas [11]. *Z. mobilis* también fue considerado un candidato apto pues es capaz de consumir mezclas de glucosa y fructosa produciendo al mismo tiempo ácido glucónico y sorbitol con un rendimiento cercano al 100%; sin embargo, el tratamiento celular y la inmovilización de las células siguen bajo estudio para la producción a gran escala [59]. Por último, Tsao y Kempe [60] trabajando con *Pseudomonas ovalis*, observaron que podían conseguir rendimientos del 99%, aunque con mucha dependencia de la eficiencia de aireación.



**Fig 2.** Ruta general bacteriana para la oxidación de glucosa a ácido glucónico [46]

### **2.1.3. Levaduras - Hongos**

*A. niger* es más sensible al pH ácido y genera atascos debido al crecimiento del micelio, lo que dificulta la recuperación en el método continuo y reduce el rendimiento de la producción [61, 62]. Por otra parte, aunque las bacterias no tienen este problema, son muy sensibles a la concentración inicial de glucosa en el medio y necesitan vitaminas, de nuevo factores limitantes [62, 63]. Debido a que ningún microorganismo está exento de desventajas se empezó a investigar con microorganismos que no fueran hongos ni bacterias. En 2003, Anastassiadis et al. [20] descubrió que una levadura tipo hongo llamada *Aureobasidium pullulans* era capaz de alcanzar rendimientos del 97% con concentraciones iniciales de glucosa muy altas (~400 g/L) y, además, la recuperación era sencilla al estar las células productoras libres; permitiendo así métodos de producción continuos en quimiotasto (400 g/) o semicontinuos (505 g/L). [4, 20-21].

## **2.2. Hongos y Glucosa Oxidasa (GOD)**

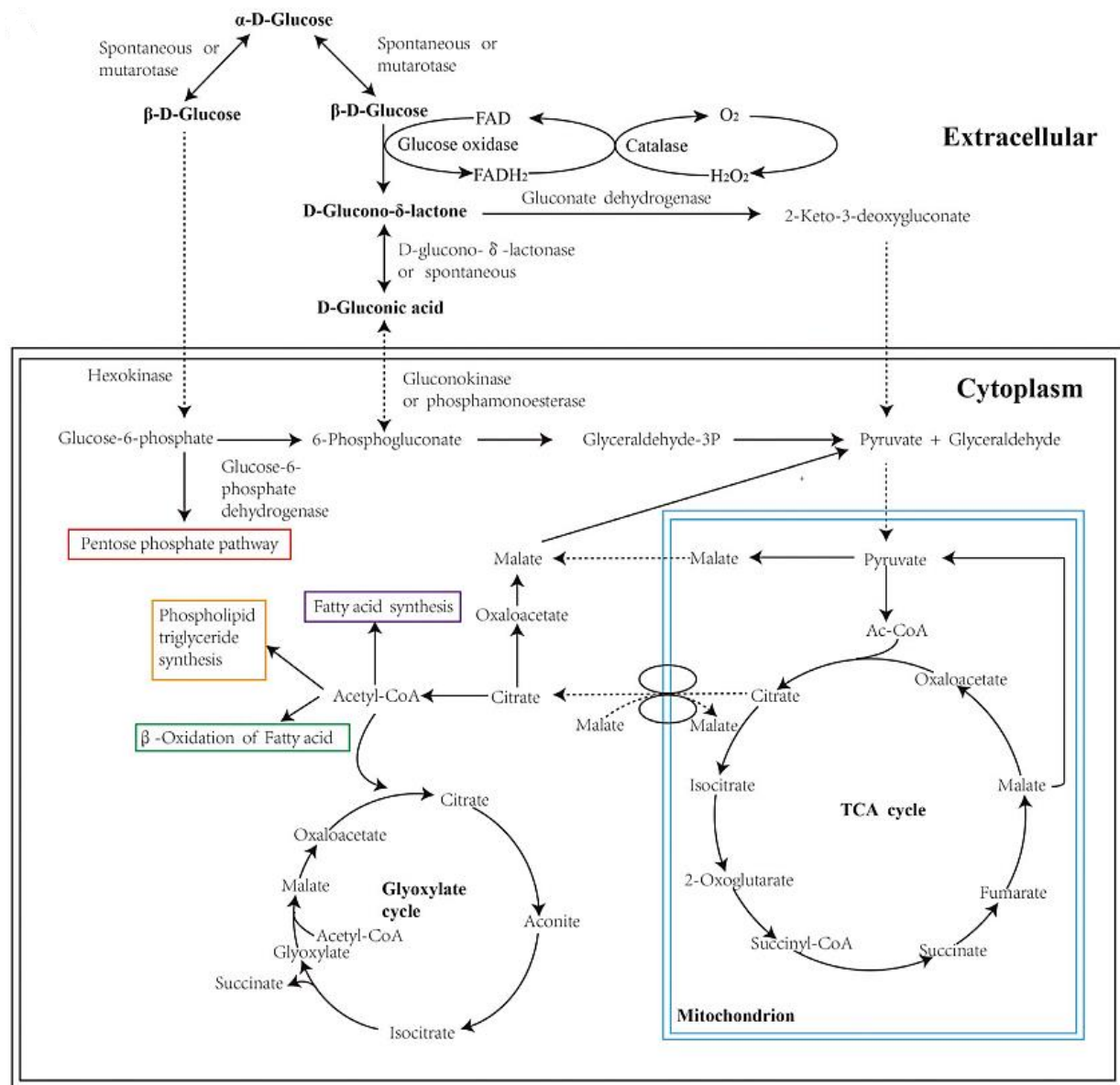
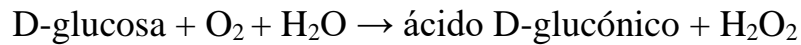
### **2.2.1. Aspergillus y Penicillium**

Los estudios realizados por Bernhauer [58] demostraron que *A. niger* tiene altos rendimientos cuando el ácido glucónico producido es neutralizado por carbonato de calcio o hidróxido sódico, siendo este proceso muy dependiente del pH. El pH ácido inhibe la actividad de GOD y el crecimiento del hongo, por eso necesitamos la neutralización. Además, para limitar este efecto el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido es eliminado por una catalasa [62, 64]. Esta limitación de pH no es tan crítica en subespecies de *Penicillium* como *P. luteum* [11, 61]. Sin embargo, la literatura publicada hasta día de hoy indica claramente que *A. niger* es el microorganismo dominante en la bioproducción de ácido glucónico y sus sales (no es así para las glucolactonas) empleando soluciones de glucosa o maltosa [4, 64]. En relación con el método de producción, la mayoría de biofermentaciones industriales para obtener ácido glucónico utilizan fermentaciones batch sumergidas aireadas discontinuas o semicontinuas. Aunque es cierto que se siguen desarrollando estudios sobre la fermentación superficial en estado sólido [6, 53].

### **2.2.2. Glucosa oxidasa en *A. Niger***

La enzima glucosa oxidasa es una oxidorreductasa que cataliza la oxidación de la D-glucosa a ácido D-gluconico y peróxido de hidrógeno. La enzima glucosa oxidasa de *A. niger* es una de las

enzimas más utilizadas en la industria debido a su alta actividad, especificidad y estabilidad [53, 65]. Esto implica que GOD tiene una baja tasa de reacción con otros azúcares, permitiendo así la obtención de ácido glucónico muy puro y sin productos secundarios que dificulten la separación y purificación. Además, al ser producida naturalmente por *A. niger*, es más accesible y económica para su uso industrial [65, 66]. La reacción química que ocurre es la siguiente:



**Fig 3.** Ruta metabólica general del ácido glucónico partiendo de glucosa en hongos [46]



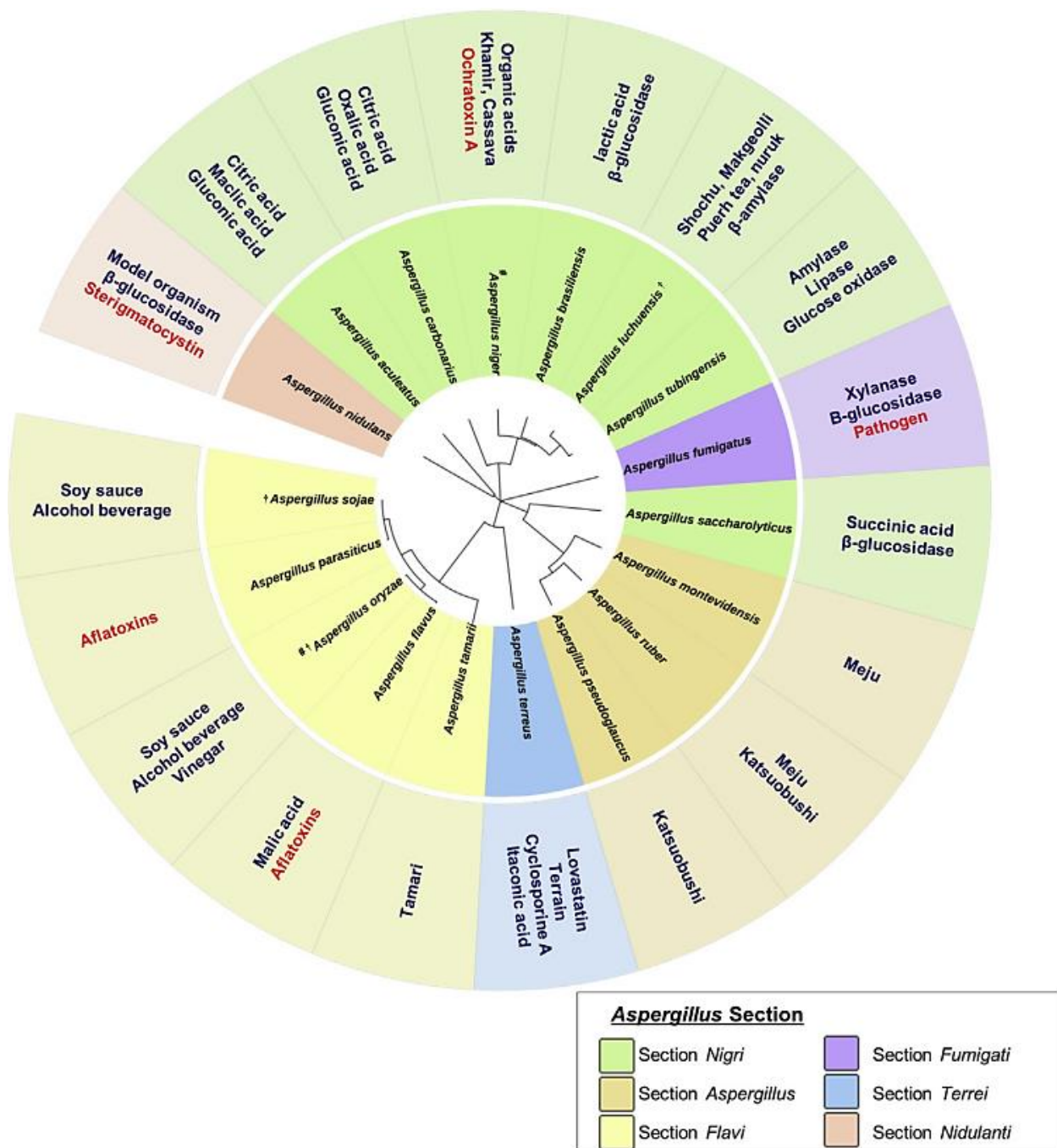
La enzima glucosa oxidasa de *A. niger* es una proteína globular con una estructura tridimensional característica [2, 66]. La estructura de la enzima consta de dos dominios principales: un dominio FAD-binding (unión de FAD) y un dominio de enlace a sustrato [22, 67]. Durante la biotransformación de la glucosa a ácido glucónico la glucosa oxidasa se auto-reduce retirando dos hidrógenos [2, 22]. Esta forma reducida es oxidada más adelante por el oxígeno, lo que da lugar a peróxido de hidrógeno. Este peróxido debe ser eliminado por catalasas producidas naturalmente por *A. niger* [11]. Por otro lado, en dicha oxidación se genera también glucono-d-lactona que, en un segundo paso, es catalizado por la flavoproteína glucosa oxidasa a ácido glucónico de nuevo. Esto sería imposible si al cofactor FAD no le fuese transferido un hidrógeno [22].

### 2.2.3. *Aspergillus Niger*

#### ● Taxonomía

La familia de hongos filamentosos *Aspergillus* consta de 340 especies y aquellos con mayor aplicabilidad se dividen en 2 grandes secciones: *Aspergillus Nigri* y *Aspergillus Flavi* [68]. Los hongos *Aspergillus* se reproducen mediante esporas asexuales (conidiósporas) que se producen en las hifas [12]. La clasificación de los hongos *Aspergillus* se realiza atendiendo a la morfología y color de las conidiósporas, las células de Hulle o la sclerotia [69, 70].

*A. Niger* pertenece a la sección *Negri* y tiene multitud de aplicaciones. No obstante, esta y otras subespecies de *Aspergillus* pueden llegar a ser peligrosas pues pueden liberar micotoxinas [12]. En concreto, en estudios recientes, se demostró el potencial dañino de ciertas cepas de *A. niger* que pueden producir metabolitos secundarios del tipo micotoxinas como la ocratoxina A y la fumonisina B1 [71-73]. Por esta razón es importante mantener un registro del potencial genético y fisiológico de cada cepa industrial de *A. niger* y examinar su capacidad productiva de micotoxinas de vez en cuando [69, 72].



**Fig 4.** Taxonomía, filogenia y aplicaciones clave de especies relevantes de *Aspergillus* [12]

#### • Mejora de cepas: Cepa AN-151 y Cepa ARNU-4

Existen numerosas cepas que mejoran los rendimientos de cepas genéricas. Son capaces de trabajar mejor en procesos productivos distintos a la fermentación batch sumergida o son capaces de asimilar azúcares de fuentes de carbono reutilizadas provenientes de residuos agro-industriales

[22, 90]. Dos cepas destacan: AN-151 y ARNU-4.

La cepa ARNU-4 obtuvo altos rendimientos cuando se emplearon melazas de caña azúcar como fuente de carbono en la fermentación [74, 75]. Probablemente la cepa AN-151, modificada por radiación UV sea el microorganismo modificado más usado industrialmente para la obtención de ácido glucónico [Tabla 5, 90]. La cepa AN-151 superó con creces los rendimientos volumétricos de otras cepas de *A. niger*, también cuando se utilizan fuentes de carbono alternativas en procesos discontinuos [47, 91] y semicontinuos [90, 91]. La cepa ORS-4.410 también fue mejor al medir los rendimientos cuando las células están libres y cuando están inmovilizadas [9].

### 3. PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE ÁCIDO GLUCÓNICO

#### 3.1. Qué podemos producir y cómo

La producción de ácido glucónico incluye la manufactura del propio ácido y, además, sus derivados. Estos derivados son la glucono- $\delta$ -lactona y las sales de gluconato de sodio, gluconato de calcio y gluconato de hierro [11]. De entre los derivados del ácido glucónico el más producido es el gluconato de sodio; no solo debido a que tiene una mayor aplicabilidad [2], sino también gracias al menor tiempo necesario para el crecimiento del microorganismo productor y al menor tiempo de fermentación requerido [63].

En relación a los diferentes medios de producción que podemos usar, la fermentación con *A. niger* es el método más utilizado desde hace más de 50 años en la producción industrial a gran escala [9, 53]. Dentro de las fermentaciones con *A. niger* la fermentación batch sumergida aireada (SmF) es la más empleada [1]. Sin embargo, recientes estudios demuestran que la fermentación en estado sólido (SSF) podría ser una opción más rentable cuando trabajamos con *A. niger* gracias al menor requerimiento de oxígeno, la formación del micelio en la superficie del medio en lugar de en el seno de este, la mayor productividad volumétrica y la simplificación de la separación y purificación [6, 53]. Sin embargo, SSF no podría emplearse para fermentación continua debido a la baja tasa de transferencia de O<sub>2</sub> a la fase líquida [53]. Otra nueva metodología sobre la que se está investigando son las técnicas de inmovilización, celular y enzimática [6]. Aunque los resultados poco claros y la poca literatura al respecto dificultan la adopción de las técnicas por parte de la industria [11].

Pero eso no es todo, otros artículos han demostrado que en un futuro tal vez sea mejor utilizar otros microorganismos como *A. pullulan*, *G. oxydans* o *Z. mobilis* [4, 9]. Estos microorganismos nos permitirían trabajar en régimen continuo, facilitando así el reciclado del microorganismo productor y eliminando las desventajas de las operaciones batch [6]. Por otro lado, el screening de microorganismos y la manipulación genética sobre estos microorganismos o el propio *A. niger* han conseguido mejores rendimientos cuando además se utilizan residuos agro-industriales como fuente de carbono [4, 53]. Como vemos muchas nuevas alternativas productivas están en proceso de expansión y otras están todavía por descubrir [1].

Strains	Fermentation Type	GA (g/L)	Volumetric Productivity (g/L/h)	References
<i>A. niger</i>	batch culture in air-lift bioreactor	150	2.3	Klein et al. (2002)
<i>A. niger</i> AN151	submerged fermentation	330	21.0 ± 0.9	Lu et al. (2015)
<i>A. niger</i> JCM 5549	immobilization/batch	272	6.1	Matsui et al. (2013)
<i>A. niger</i> SIIM M276	batch	76.67	0.86	Zhang et al. (2016)
<i>A. niger</i> NCIM 548	immobilization/batch	92	2.04	Mukhopadhyay et al. (2004)
<i>A. niger</i> IAM 2094	batch	80–100	1.13	Ikeda et al. (2006)
<i>A. niger</i> ORS-4410	batch	80.60	0.131	Singh et al. (2003)
<i>A. niger</i> ORS-4410	semi-continuous batch	110.94	0.9375	Singh, (2008)
<i>A. pullulans</i> (De Bary) DSM 7085	continuous batch in a cascading operation of two bioreactors	350–370	12.7–13.9	Anastassiadis and Rehm, (2006b)
<i>P. variabile</i> P16	double feeding fed-batch	240	2.02	Crognale et al. (2008)
<i>G. oxydans</i> NBIMCC 1043	batch	148.5	9.03	Velizarov and Beschkov, (1994)
<i>G. oxydans</i> DSM2003	cascade hydrolysis/batch fermentation	118.9	1.65	Hou et al. (2018)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Agad	fed-batch	422	4.22	Wang et al. (2016)

**Tabla 5.** Microorganismos que han reportado altos rendimientos en años recientes [46]

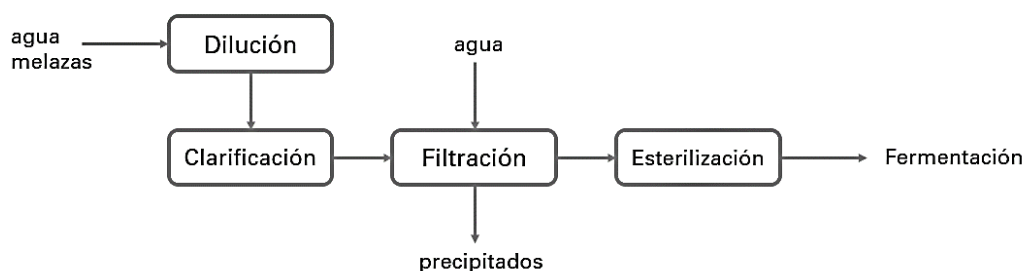
### 3.2. Tratamientos previos

Actualmente la manufactura de ácido glucónico es cara, de forma que sus aplicaciones están limitadas por su coste. Para hacer el proceso más económico se ha estudiado el uso de residuos agro-industriales como fuente de carbono [11, 22]. Como hemos mencionado anteriormente, los residuos agro-industriales que obtuvieron mejores rendimientos para el método de producción elegido fueron las melazas de caña de azúcar y el mosto de uva cuando son asimilados por *A. Niger* ORS-4.410 [9]. *A. niger* AN-151 bajo el régimen discontinuo SmF, obtuvo los mayores rendimientos volumétricos a un mayor concentración inicial de glucosa, reduciendo así el tiempo y el coste de producir ácido glucónico [6, 90]. La contrapartida de utilizar estas fuentes de carbono tan heterogéneas es que deben ser clarificadas para así eliminar elementos traza y metales pesados que podrían ser perjudiciales para *A. niger*, inhibir la producción o dificultar la separación y purificación [22]. Otros pretratamientos que algunos residuos agro-industriales pueden requerir para ser usados como fuente de carbono son la sacarificación y licuefacción [77].

La clarificación de fuentes de carbono heterogéneas es uno de los retos por resolver de la industria. Sin embargo, algunos métodos efectivos han conseguido desarrollarse, de entre estos, el método del ferrocianuro de potasio ( $\text{HCF} \rightarrow \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) ha resultado ser el más efectivo. El HFC consigue precipitar los elementos traza y metales pesados sin afectar la composición en carbono o nitrógeno del medio de cultivo; pudiendo así aumentar considerablemente el rendimiento [78, 79]. Dicha precipitación se lleva a cabo a pH 4.5 y 90°C durante 15 minutos en un tanque de mezcla [80]. También se descubrió que el mutante de *A. niger* ORS-4.410 aumentó el plegamiento de GOD en 3.43 veces cuando se clarificaron el mosto de uva o los residuos de caña de azúcar, aumentando

con ello la actividad de la enzima [66]. Por lo tanto, la clarificación de residuos agro-industrial es un requisito esencial para la fermentación de ácido glucónico [47]. Antes de añadir el ferrocianuro de potasio se debe diluir con agua los residuos agro-industriales hasta 120g/l [80, 81]. Una vez precipitados los iones metálicos traza se pasa la solución por un filtro de placas para retirar los precipitados residuales [81].

Otra opción para clarificar los residuos agro-industriales es el método enzimático. En el experimento realizado por Singh et al. [47] el cóctel enzimático estaba formado por citolasa, klerenzima (pectinasa) y rapidasa (acelerador de la clarificación). Se observó un aumento del 20-25% del rendimiento cuando se usaron residuos de uva clarificados por este método respecto de residuos de uva sin clarificar [47]. Sin embargo, las enzimas son recursos caros por lo que se están buscando sustratos de carbono simples que no requieran clarificación previa [22].



**Fig 5.** Diagrama del pretratamiento de la materia prima [80]

### 3.3. Fermentación

#### 3.3.1. Medio y Condiciones de fermentación

Pese a los mejores datos obtenidos por los experimentos de Singh et al. [47] para la producción de ácido glucónico usando fermentación superficial en estado sólido (SSF); estos no se han replicado todavía a escalas piloto o industrial y la mejora en el rendimiento es mínima. Por consiguiente, revisaremos la única opción vigente para producir ácido glucónico a escala industrial vía fermentaciones, la fermentación batch sumergida aireada (SmF) [11]. El ácido glucónico es un producto que *A. niger* excreta, lo que facilita la separación y purificación y permite recuperar parte del micelio sin necesidad de ser lisado; sin embargo, como el crecimiento del hongo y la producción de ácido glucónico no están relacionados, las operaciones en continuo son imposibles de

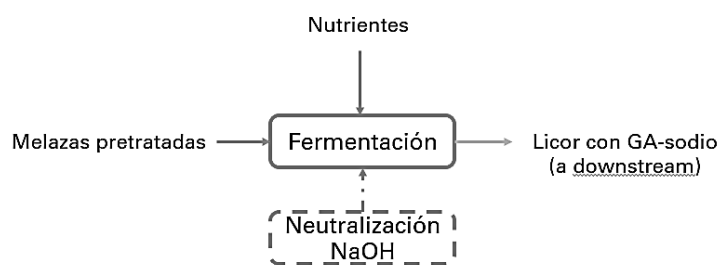
implementar [9, 11]. Esta es la razón de operar en lotes o en semicontinuo cuando empleamos hongos.

Las fuentes de carbono heterogéneas con mejores relaciones costo-productividad fueron obtenidas por las melazas de caña de azúcar y el mosto de uva; para ambos el microorganismo más productivo fue *A. niger* ORS-4.410 [1, 9]. Sin embargo, otros mutantes también han conseguido buenos resultados bajo estas condiciones operativas gracias a la mayor actividad y cantidad de las enzimas glucosa oxidasa y catalasa, estos son las cepas mutantes de *A. niger* ARNU-4 [49, 74] y CCM8004 [82, 83]. En el biorreactor agitado el medio de cultivo líquido estará formado por los efluentes de la fase de pretratamiento, idealmente la concentración de glucosa liberada por la caña de azúcar en el pretratamiento debería estar entre los 120-250 g/L, mientras que la presencia natural de nitrógeno y fósforo en el medio de cultivo se suplementó con fosfato diamónico  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  [57, 80]. Sin embargo, esta concentración deberá mantenerse baja, no puede superar los 20 mM [6]. Debido a que el medio de cultivo es producto del pretratamiento de un residuo agro-industrial heterogéneo, este debería contener la suficiente cantidad de microelementos, si no fuera así se puede acudir a la adición de sales como KCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  y  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  [82]. La concentración de estos iones metálicos debe ser muy limitada y supervisada para que no tenga efectos nocivos sobre el cultivo del hongo [6].

Cuando se cultiva *A. niger* en biorreactores agitados donde el microorganismo está sumergido en el medio de cultivo, *A. niger* presenta diferentes morfologías que nos pueden indicar en qué fase del cultivo nos encontramos o la capacidad productiva que este tendrá [9, 22]. Las propiedades reológicas del cultivo, que vienen condicionadas en última instancia por la morfología de las células que lo componen y la cantidad de estas, condiciona la transferencia de masas en la fermentación sumergida aireada [22]. Las morfologías de *A. niger* observadas van desde filamentos micelares con poca cantidad de biomasa hasta micelio con forma de pellets entretejidos con una alta concentración de biomasa [80]. Los pellets son la morfología más empleada para evitar los problemas de tener una gran cantidad de biomasa dispersa que aumenta la viscosidad del medio [22, 80]. Sin embargo, la concentración de oxígeno en el centro de los pellets es inferior a la ideal; de forma que para aumentar la tasa de transferencia de oxígeno habrá que recurrir a la agitación y aireación [22, 80].

Por otro lado, las condiciones del cultivo durante la fermentación fueron las siguientes. La

temperatura se mantuvo a 30°C y el pH a 6.5 durante 48-72h, además, se introdujo aire al caldo con un compresor G-101 a 4 bar de presión y una velocidad de 0.15 vvm que se incrementó gradualmente hasta 1 vvm (volumen de aire por volumen de líquido por minuto), es decir, tasas muy altas de aireación [11, 80, 82]. Por otro lado, el pH se mantuvo en 6.5 durante la etapa de crecimiento y se mantuvo en 5.5 añadiendo hidróxido de sodio o carbonato de calcio durante la etapa productiva [63]. La sal empleada depende de la sal de ácido glucónico que vayamos a producir [82]. Para evitar que el producto, gluconato de sodio o gluconato de calcio precipite, tendremos que mantener la cantidad total de carbonato de calcio o hidróxido sódico por debajo de los 2/3 del requerimiento estequiométrico [1]. El proceso de neutralización comienza cuando empieza a acumularse ácido glucónico y baja el pH, pero se completa ya en la separación y purificación [9]. Por debajo de pH 3 la glucosa oxidasa se desactiva, esto provoca un aumento en la glicólisis y provoca que el metabolismo de *A. niger* vire hacia la formación de ácido cítrico que, por otro lado, en condiciones normales, solo es un subproducto minoritario fácil de separar [65, 66]. La etapa productiva de ácido glucónico coincide con el momento de máxima actividad de la glucosa oxidasa [66, 82]. Por esta razón, los parámetros de producción óptima de ácido glucónico coinciden en muchos puntos con las condiciones óptimas para producir glucosa oxidasa [1, 11]. Finalmente, si se cumplen las condiciones expuestas anteriormente se obtendrán rendimientos del 90-98%; esta variación depende fundamentalmente de la fuente carbono empleada y la cepa de *A. niger* seleccionada [63, 80].



**Fig 6.** Diagrama de la fermentación

### 3.3.2. Factores que afectan a la producción

- **Tasa de aireación (Intercambio de Oxígeno)**

La disponibilidad de oxígeno es uno de los factores clave en la producción de ácido glucónico debido a que es uno de los reactivos de la reacción de oxidación de la glucosa a ácido



glucónico. Siendo además fundamental para el crecimiento de hongos aerobios como *A. niger* [6]. La cantidad de oxígeno disponible en el seno del caldo de cultivo viene condicionada por el gradiente de concentración de oxígeno, el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno y la viscosidad del medio [11]. Estos tres factores van a determinar como de efectiva es la transferencia de oxígeno de la fase gaseosa a la fase acuosa, es decir, al caldo de cultivo en el fermentador [1]. Este es el verdadero cuello de botella en la manufactura de ácido glucónico por biofermentación e idealmente la saturación de oxígeno en un cultivo de *A. niger* debe ser superior al 90% [4].

La producción de ácido glucónico es un proceso que consume mucho oxígeno, razón por la cual la tasa de aireación y la velocidad de agitación van a condicionar el rendimiento de la producción de ácido glucónico [11]. Basándonos en los datos recogidos por Sakuri et al. [84] y Lee et al. [85] la mayor productividad volumétrica de ácido glucónico usando *A. niger* se consiguió con aire atmosférico introducido con un compresor a alta presión (4-6 bar) a una velocidad entre 0.25 y 1 vvm. Estas condiciones de aireación y una velocidad de agitación entre 300-400 rpm [11] permitieron alcanzar y mantener concentraciones ideales de oxígeno de 150 ppm. Sin embargo, tras varios días de fermentación el micelio crece tanto que la viscosidad aumenta y reduce rápidamente la disponibilidad de oxígeno con las mismas condiciones de aireación [86].

### ● Efecto del pH

El segundo factor clave que condiciona el rendimiento de la producción de ácido glucónico es el pH del medio de cultivo. *A. niger* secreta como producto final un ácido y peróxido de hidrógeno, además produce otros ácidos como productos secundarios, lo que reduce el pH del medio [11]. La acumulación de estos ácidos dependerá también del pH del medio de cultivo. Según H. Zand et al. [82] el pH ideal para la producción de ácido glucónico por *A. niger* es pH 5.6. En este valor de pH Franke et al. [87] reportó la mayor actividad de la enzima glucosa oxidasa; cayendo dicha actividad exponencialmente conforme el pH se hace más ácido. El pH cercano a la neutralidad cuando se está produciendo ácido glucónico se consigue neutralizando progresivamente el ácido con carbonato de calcio o hidróxido sódico [6]. Por otro lado, si se emplean residuos agro-industriales como base del medio de cultivo, se deberá empezar el cultivo a un pH algo superior (pH 6-7) para compensar la ligera acidez que estas fuentes de nutrientes heterogéneas suelen tener [6, 11].

### ● Temperatura

En general la mayoría de los microorganismos testados, ya sean hongos, bacterias o levaduras tipo hongo como *A. Pullulans*; todas comparten un rango de temperaturas ideal para la producción de ácido glucónico entre 24 y 32 °C [4]. Para *A. niger* este rango es de entre 29 y 30°C, aunque puede variar ligeramente dependiendo de la cepa, por lo que será necesario experimentar con diferentes temperaturas antes de empezar a producir [4]. Debido a que la mayor cantidad de biomasa se consigue a menores temperaturas, la razón del aumento en la productividad es el aumento en la actividad enzimática y la secreción de más ácido glucónico [ 11].

### ● Presencia de glucosa

El efecto de la glucosa en la fabricación de ácido glucónico usando *A. niger* es significativo. La glucosa es el sustrato principal para la producción de ácido glucónico y la cantidad de glucosa disponible afectará directamente la cantidad de ácido glucónico producido [11]. En general, las concentraciones más altas de glucosa conducirán a una mayor producción de ácido glucónico. Sin embargo, es importante señalar que existe una concentración de glucosa óptima para la producción de ácido glucónico. Demasiada glucosa puede inhibir el crecimiento de *A. niger*, que no es muy osmotolerante [47], y muy poca glucosa limitará la cantidad de ácido glucónico que se puede producir [47]. Se considera que el rango óptimo de glucosa presente inicialmente en el caldo de cultivo para *A. niger* es entre 120 g/L y 250 g/L, este valor variará dentro de este rango en función de la cepa y el método fermentativo [11, 47, 80].

### ● Efecto del Magnesio y el Fósforo

El magnesio y el fósforo son nutrientes esenciales para el crecimiento y metabolismo del hongo *A. niger*. El magnesio es necesario para la actividad de varias enzimas implicadas en la gluconeogénesis y el fósforo es esencial en la producción de ATP y la síntesis de ADN/ARN [ 46].

Anastassiadis S. et al. [4] descubrió que la adición de sales de magnesio y fósforo a cultivos de *A. niger* aumentaban entre un 20-30% el rendimiento en la producción de ácido glucónico [46]. Las concentraciones iniciales ideales de magnesio fueron de 0.1-0.5 g/L y las de fósforo 0.2-0.5 g/L [4]. Los rangos de valores hacen referencia a las variaciones que puede haber en los datos valores en función de la cepa; puesto que no hay demasiada literatura específica sobre el tema para cada

una de las cepas comerciales de *A. niger*.

#### ● Efecto de la espuma

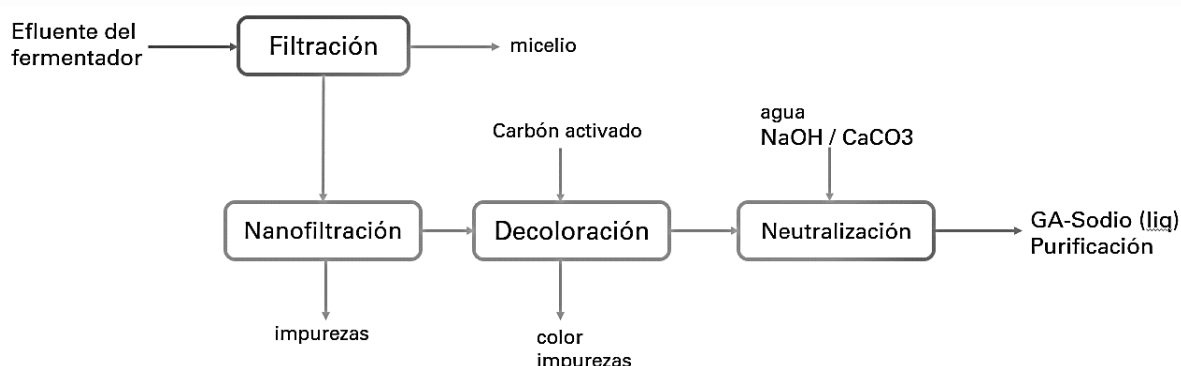
La espuma suele formarse por la agitación, aireación y secreción de productos por parte de *A. niger* [88]. La espuma afecta la tasa de transferencia de oxígeno al seno del caldo de fermentación y, puesto que la disponibilidad de oxígeno es el factor limitante en la producción de ácido glucónico, reduce el rendimiento de la producción [4, 88]. Para evitar la formación de espuma añadimos antiespumantes como MAZU DF6000 (PPG/Mazer Chemicals) a 80 – 120 ppm [88].

### 3.4. Separación y Purificación

El proceso de separación y purificación posterior a la fermentación varía dependiendo del método de fermentación empleada, del producto glucónico a separar y purificar y de la fuente de carbono empleada; no varía tanto, sin embargo, cuando cambiamos el microorganismo fermentador (fungi o bacteria) [6, 22]. Desarrollar una separación y purificación rentable y sostenible para el medio ambiente sigue siendo un reto por resolver, especialmente cuando el ácido glucónico es requerido con un alto grado de pureza [22]. Esto se debe principalmente a las numerosas unidades operativas que trabajan al mismo tiempo, y lo que esto implica en relación con el gasto de energía asociado y otros costes operativos como reactivos y mano de obra [4]. Además, hay que añadir que la separación y purificación se complica aún más cuando empleamos residuos agro-industriales como fuente de carbono [6].

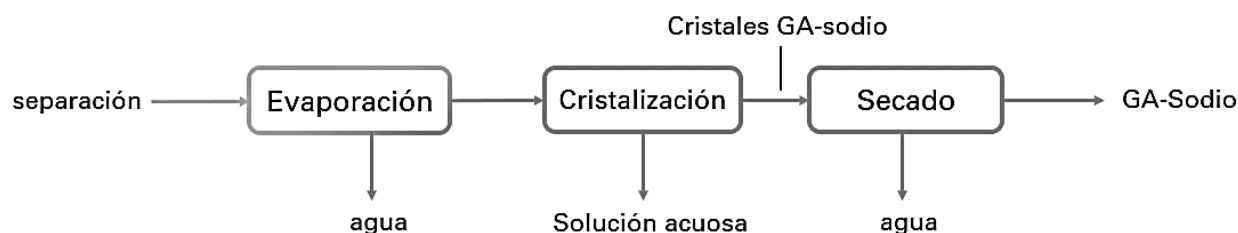
Con el objetivo de resolver estos problemas que reducen la rentabilidad de la producción de ácido glucónico y con ello su aplicabilidad, han aparecido múltiples tecnologías [11]. La tecnología que mejores resultados ha mostrado para rebajar el costo de la manufactura de ácido glucónico son las membranas hechas a medida y altamente selectivas [22]. Otras tecnologías como la biorremediación y el uso de disolventes no contaminantes también están sobre la mesa. La biorremediación se puede utilizar para tratar las aguas residuales generadas por el proceso de purificación y los disolventes sostenibles pueden reemplazar los productos químicos agresivos [4, 11]. Sin embargo, se necesita investigar más antes de probarse a nivel industrial.

La separación convencional consta de los siguientes pasos: 1. Filtración, 2. Nanofiltración y 3. Decoloración [4, 52]. Primero filtramos el caldo obtenido tras la fermentación con el objetivo de retirar la biomasa y los productos secundarios [11]. En ocasiones el uso de fuente de carbono heterogéneas u otras eventualidades nos pueden obligar a hacer una nanofiltración [89]. Tras esto se decolora el caldo con una columna de carbón activado [11, 22]. Después, el caldo decolorado puede neutralizarse con algo más de NaOH, llevando el caldo hasta pH 7.5; por si quedara ácido glucónico no neutralizado durante la fermentación [22, 80].



**Fig 7.** Diagrama de la separación del efluente del fermentador

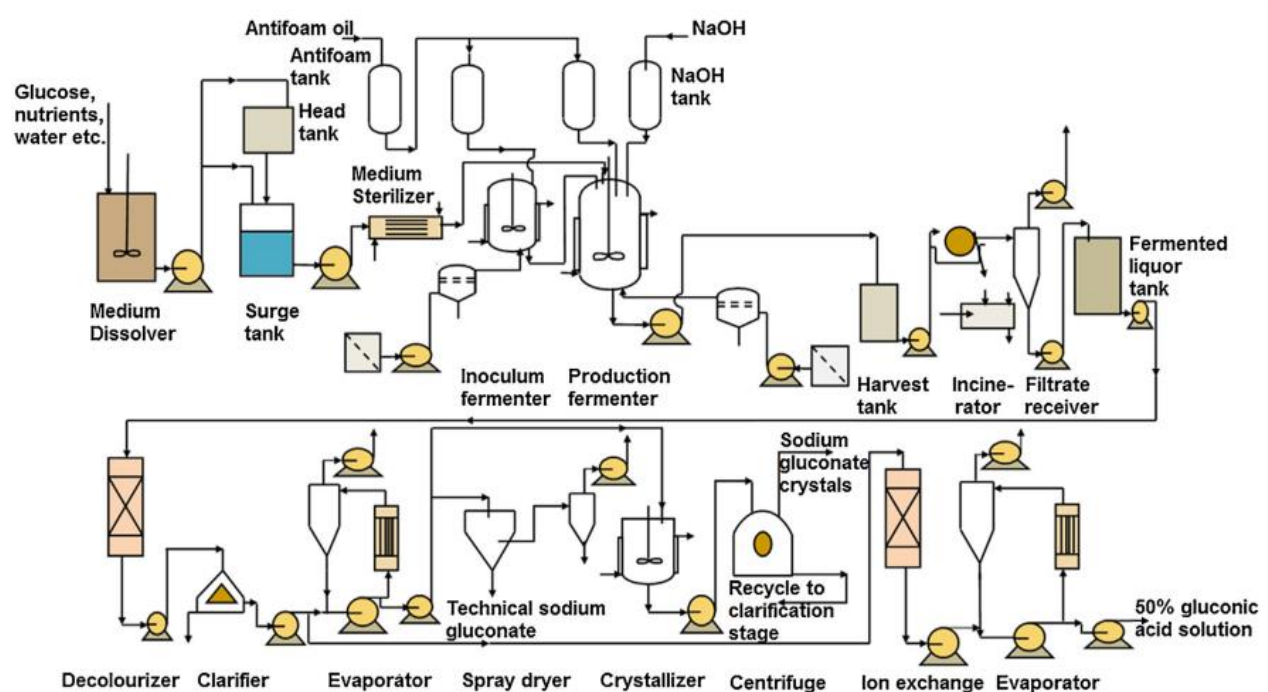
La purificación, es decir, la concentración del caldo y la obtención de los cristales de gluconato de sodio comienza con la evaporación de gran parte del agua del caldo, tras esto se concentran las sales disueltas en el caldo por medio de la formación de sólidos cristalinos que cuando son lo suficientemente grandes se separan del caldo [89]. Finalmente se secan los cristales en un secador de tambor o por pulverización [80]. Parte del ácido glucónico obtenido en la fermentación se pierde en la separación y purificación, especialmente en la decoloración; bajando así el rendimiento del 96% al 89% [6].



**Fig 8.** Diagrama de la separación y la purificación, partiendo del efluente de la fermentación

En otros estudios se propuso la adición de un último paso en el que el gluconato de sodio seco es introducido en una columna de intercambio aniónico [4, 6]. Este proceso patentado empleó una resina Amberlite IRS400 [6]. El objetivo de esta unidad operativa es la de mejorar la pureza del producto, por lo que es un paso necesario cuando la aplicación del gluconato de sodio es farmacéutica [22]. Con todo, este no es el único paso adicional que necesita el gluconato de sodio con aplicación sanitaria, pero si es el más relevante [4].

Basándonos en el estudio realizado por Blanch H. W. et al [89] el proceso global (pretratamiento → fermentación → separación → purificación) se vería de la siguiente forma:



**Fig 9.** Diagrama convencional sobre el proceso global de producción de ácido glucónico empleando glucosa pura como fuente de carbono. No hay por tanto una sección de pretratamiento [89]

## 4. CONCLUSION

The production of gluconic acid at an industrial level experienced a sustained growth since the 50s of the last century. Later, the intervention of new techniques explored in previous years, biotransformations, allowed to increase sustainability and reduce production costs, thereby increasing the applicability of gluconic acid in the pharmaceutical, food and other industries. At the end of the twentieth century, the most widely implemented production model in the industry was the aerated submerged fermentation of refined glucose by *A. niger*, which through its enzymatic collection (especially glucose oxidase) oxidizes glucose to gluconic acid.

For some time now, other production methods such as chemicals, using petroleum derivatives, have partially displaced the use of fermentation, restricting its market niche. For this reason, new studies are being carried out on the subject and, with this, new technologies appear that will increase the benefits of using biotransformations, making the chemical method, a more polluting method, obsolete. Some of these technologies include the use of cheaper alternative nutrient sources such as methanol or some agro-industrial residues, the screening of new microorganisms and genetic engineering on those already known, the use of bacteria or *Aureobasidium Pullulans* in a continuous production regime, the implementation of new fermentation techniques with *A. niger* mutants using the airlift, solid state surface fermentation, cell or enzyme immobilization; the use of industrial process simulators such as SuperPro Designer or ASPEN Hysys and the implementation of new membrane systems for separation and purification.

### 4.1. Personal opinion

After the writing of this work and all the acquisition of knowledge and all the reading that this has entailed, I have obtained an overview, not only of the production process, but also of the organic acids market, its applicability and properties, as well as the technologies that are currently being tested to improve the productivity of a bioprocess that must necessarily prevail over more polluting alternatives. On the other hand, I have also acquired practical knowledge when it comes to writing great papers; learning how to manage time, consult and organize sources and write in a scientific language.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Kirimura, K., & Yoshioka, I. (2019). Gluconic and itaconic acids. In *Comprehensive biotechnology* (pp. 166-171). Elsevier.
2. Lu, F., Wang, Z., Zhao, W., Chu, J., & Zhuang, Y. (2016). A simple novel approach for real-time monitoring of sodium gluconate production by on-line physiological parameters in batch fermentation by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 202, 133-141.
3. Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., & Prust, C. (2002). Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 233-242.
4. S. Anastasiadis & I. G. Morgunov (2007). Gluconic Acid Production. *Recent Patents on Biotechnology* 2007, 1, 167-180
5. Goswami, R., & Mishra, V. K. (2016). Sugar-derived industrially important C6 platform chemicals. In *Platform Chemical Biorefinery* (pp. 229-248). Elsevier.
6. Singh, O. V., & Kumar, R. (2007). Biotechnological production of gluconic acid: future implications. *Applied microbiology and biotechnology*, 75, 713-722.
7. Saito, H., Ohnaka, S., Fukuda, S.: US4,843,173 (1989).
8. Deller, K., Krause, H., Peldszus, E., Despeyroux, B.: US5132452 (1992).
9. Canete-Rodriguez, A. M., Santos-Duenas, I. M., Jimenez-Hornero, J. E., Ehrenreich, A., Liebl, W., & Garcia-Garcia, I. (2016). Gluconic acid: Properties, production methods and applications—An excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste biovalorization. *Process biochemistry*, 51(12), 1891-1903.

10. Rogers, P., Chen, J. S., & Zidwick, M. J. Organic acids and solvent production, PartI: Acetic, lactic, gluconic succinic and polyhydroxyalkanoic acids. *The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria. Symbiotic Associations, Biotechnology, Applied Microbiology*, 511-755.
11. Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., & Larroche, C. (2006). Gluconic acid: properties, applications and microbial production. *Food Technology & Biotechnology*, 44(2).
12. 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.
13. Leung, H. W., & Paustenbach, D. J. (1990). Organic acids and bases: review of toxicological studies. *American journal of industrial medicine*, 18(6), 717-735.
14. Berovic, M., & Legisa, M. (2007). Citric acid production. *Biotechnology annual review*, 13, 303-343.
15. Vandenberghe, L. P., Soccol, C. R., Pandey, A., & Lebeault, J. M. (1999). Microbial production of citric acid. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 42, 263-276.
16. Yang, L., Lübeck, M., & Lübeck, P. S. (2017). *Aspergillus* as a versatile cell factory for organic acid production. *Fungal Biology Reviews*, 31(1), 33-49.
17. Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., González, J. M. D., Converti, A., & de Souza Oliveira, R. P. (2013). Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in food science & technology*, 30(1), 70-83.



18. Datta, R., Tsai, S. P., Bonignore, P., Moon, S. H., & Frank, J. R. (1995). Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS microbiology reviews*, 16(2-3), 221-231.
19. Milson PE, Meers JL (1985) Gluconic acid, itaconic acid. In: Blanch HW, Drew S, Wang DIC (eds) *Comprehensive biotechnology*, vol. 3. Pergamon, Oxford, pp 681–700
20. Anastassiadis S, Aivasidis A, Wandrey C (2003) Continuous gluconic acid production by isolated yeast-like mould strains of *Aureobasidium pullulans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:110–117
21. Anastassiadis S, Rehm HJ (2006a) Continuous gluconic acid production by the yeast-like *Aureobasidium pullulans* in a cascading operation of two bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:541– 548
22. Parimal P, Ramesh K, Subhamay B (2016) Manufacture of gluconic acid: A review towards process intensification for green production. *Chemical engineering and processing: Process Intensification*, Volume 104: 160-171
23. O.G. Lien Jr., Determination of gluconolactone, galactolactone and their free acids by hydroxamate method, *Anal. Chem.* 31 (1959) 1363–1366
24. M. Everaerts, J.L Beckers, T.P.E.M. Verheggen: *Isotachophoresis – Theory, Instrumentation and Applications*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands (1976)
25. M.F. Laker, J.N. Mount, Mannitol estimation in biological fluids by gas liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives, *Clin. Chem.* 26 (1980) 441–443.
26. Food Chemical Codex (FCC) (1996).
27. Gergely, G., Gergely, I., Gergely, T.: US20036541034B1 (2003).

28. D.K. Ahuja, L.G. Bachas, D. Bhattacharyya, Modified Fenton reaction for trichlorophenol dechlorination by enzymatically generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and gluconic acid chelate, *Chemosphere* 66 (2007) 2193–2200.
29. F. Amiri, S.M. Mousavi, S. Yaghmaei, M. Barati, Bioleaching kinetics of a spent refinery catalyst using *Aspergillus niger* at optimal conditions, *Biochem. Eng. J.* 67 (2012) 208–217.
30. J. Gustavsson, C. Cederberg, U. Sonesson, R. Van Otterdijk, A. Meybeck, *Global Food Losses and Food Waste*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2011
31. Hustede et al. 1989, ULLMANN'S Encyclopedia of industrial chemistry, Weinheim Vol. A 1989; 12; 449-456.
32. Znad H, Marko J, Bale V. 2004. Production of gluconic acid from glucose by *Aspergillus niger*: Growth and non-growth conditions. *Proc Biochem* 2004; 39:1341-1345.
33. Lantero, O. J., Shetty, J. K.: US20056,942,997 (2005).
34. Ouyang, J., Rodzewich, E. A., Harpel, W. L.: US5,545,347 (1996).
35. Singh NB. Effect of gluconates on the hydration of cement. *Cem Concr Res* 1976; 6(4): 455-460
36. Thomas, D., Jaeger, U., Sagoschen, I., Lamberti, C., Wilhelm, K., 2009. Intra-arterial calcium gluconate treatment after hydrofluoric acid burn of the hand. *Cardiovascular and Interventional Radiology* 32 (1), 155–158.

37. Paul, R., Walther, F.G., 1937. The preparation of ferrous gluconate and its use in the treatment of hypochromic anemia in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 59 (2), 182.
38. Chatterjee, C., Chatterjee, N.P., Furtado, E. D.: US20046,828,130 B2 (2004).
39. Julie, K., Levy, P., Crawford, C., Appel, L.D., Clifford, E.L., 2008. Comparison of intratesticular injection of zinc gluconate versus surgical castration to sterilize male dogs. *American Journal of Veterinary Research* 69 (1), 140–143.
40. Hernandez C., Moran W. (2022) Efficacy of intratesticular glycerol and zinc gluconate as a contraceptive method in cats. *Rev Colombiana Cienc Anim. Recia.* 2022 enero-junio; 14(1):e908
41. Saito, H., Ohnaka, S., Fukuda, S.: EP0142725 (1985).
42. Jha S.N. (2023). Organic acids market Outlook 2023 – 2033.  
<https://www.factmr.com/report/4285/organic-acids-market>
43. Business Communication Co. (BCC) (2004) GA-103R-World markets for fermentation ingredients. Norwalk, CT, USA
44. M. Roehr, C.P. Kubicek, J.C. Komínek, Gluconic acid, in: H.J. Rehm, G. Reed (Eds.), *Biotechnology Set*, second ed., Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 2001, pp. 347–362.
45. M.J. Climent, A. Corma, S. Iborra, Converting carbohydrates to bulk chemicals and fine chemicals over heterogeneous catalysts, *Green Chem.* 13 (2011) 520–540.

46. 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
47. Singh OV, Kapur N, Singh RP (2005) Evaluation of agro-food byproducts for gluconic acid production by *Aspergillus niger* ORS-4.410. *World J Microb Biot* 21:519–524
48. M. Molliard, Sur une nouvelle fermentation acide produite par le *Sterigmatocystis nigra* (A new acidic fermentation by *Sterigmatocystis nigra*), *CR Acad. Sci.* 174 (1922) 881–883.
49. Currie JN and Carter RH (1933) U.S. Patent 1896811; Currie JN and Finlay A (1933) U.S. Patent 1908225; Currie JN, Kane JH and Finlay A (1933) U.S. Patent 1893819.
50. A.J. Moyer, P.A. Welss, J.J. Stubbs, H.T. Herrick, O.E. May, Gluconic acid production – Development of inoculum and composition of fermentation solution for gluconic acid production by submerged mold growths under increased air pressure, *Ind. Eng. Chem.* 29 (1937) 777–781.
51. N. Porges, T.F. Clark, E.A. Gastrock, Gluconic acid production – Repeated use of submerged *A. niger* for semi-continuous production, *Ind. Eng. Chem.* 32 (1940) 107–111
52. Blom RH, Pfeifer VF, Moyer AJ, et al. (1952) Sodium gluconate production – Fermentation with *Aspergillus niger*. *Industrial & Engineering Chemistry.* 44: 435–440
53. Singh, O. V., Jain, R. K., & Singh, R. P. (2003). Gluconic acid production under varying fermentation conditions by *Aspergillus niger*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 78(2-3), 208-212.

54. Rogers\*, P., Chen, JS., Zidwick, M.J. (2013). Organic Acid and Solvent Production: Acetic, Lactic, Gluconic, Succinic, and Polyhydroxyalkanoic Acids. In: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg.
  
55. Roehr M, Kubicek CP, Kominek J (1996) Gluconic acid. In: Roehr M (ed) *Biotechnology*, 2nd edn. VCH, New York, pp 348–362
  
56. M. Röhr, C.P. Kubicek, J. Kominek: Gluconic Acid. In: *Biotechnology*, Vol. 3, H.J. Rehm, G. Reed (Eds.), Verlag Chemie, Weinheim, Germany (1983) pp. 455–465
  
57. S. Velizarov, V. Beschkov, (1998) Biotransformation of glucose to free gluconic acid by *Gluconobacter oxydans*: substrate and product inhibition situations, *Process Biochemistry*, Volume 33, Issue 5, Pages 527-534
  
58. BERNHAUER, K.: *Biochem. Z.* 153 (1924). 517 und *Biochem. Z.* 172 (1926), 313 in: *Oxydative GSirungen. Handbuch der Enzymologie.* (eds. NORD, F. F., WEIDENHACEN, R.). Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft. 1940, 103.
  
59. Zachariou M, Scopes RK (1986) Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. *J Bacteriol* 167:863–869
  
60. W. Sun, F. Xiao, Z. Wei, F. Cui, L. Yu, S. Yu, Q. Zhou, Non-sterile and buffer-free bioconversion of glucose to 2-keto-gluconic acid by using *Pseudomonas fluorescens* AR4 freeresting cells, *Process Biochem.* 50 (2015) 493–499.
  
61. A. J. Moyer, P. A. Wells, J. J. Stubbs, H. T. Herrick, and O. E. May (1937) GLUCONIC ACID PRODUCTION. Development of Inoculum and Composition of Fermentation Solution for Gluconic Acid Production by Submerged Mold Growths under Increased Air Pressure. *Industrial & Engineering Chemistry* **1937** 29 (7), 777-781

62. Markwell, J., Frakes, L.G., Brott, E.C. *et al.* *Aspergillus niger* mutants with increased glucose oxidase production. *Appl Microbiol Biotechnol* **30**, 166–169 (1989).
63. Subba Rao, D., Panda, T. Comparative analysis of calcium gluconate and sodium gluconate techniques for the production of gluconic acid by *Aspergillus niger*. *Bioprocess Engineering* **8**, 203–207 (1993).
64. Klein, Jaroslav & Rosenberg, Michal & Markoš, Jozef & Dolgoš, Ondrej & Krošlák, Marek & Krištofiková, L'udmila. (2002). Biotransformation of glucose to gluconic acid by *Aspergillus niger* - Study of mass transfer in an airlift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal - BIOCHEM ENG J.* 10. 197-205.
65. Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S., & Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase—an overview. *Biotechnology advances*, 27(4), 489-501.
66. Q. Mu, Y. Cui, Y. Tian, et al., Thermostability improvement of the glucose oxidase from *Aspergillus niger* for efficient gluconic acid production via computational design, *International Journal of Biological Macromolecules*
67. Wong, C. M., Wong, K. H., & Chen, X. D. (2008). Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 78, 927-938.
68. Bennett, J. W. (2010). An overview of the genus *Aspergillus*. *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*, 1e17.
69. Houbroken, J., de Vries, R. P., & Samson, R. A. (2014). Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Advances in Applied Microbiology*, 86, 199e249.

70. Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbaken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H., ...Frisvad, J. C. (2014). Phylogeny, identification, and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78, 141e173.
71. Frisvad, J. C., Larsen, T. O., Thrane, U., Meijer, M., Varga, J., Samson, R. A., & Nielsen, K. F. (2011). Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. *PLoS One*, 6, e23496.
72. Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Samson, R. A., Larsen, T. O., & Thrane, U. (2007). Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9727e9732.
73. Lamboni, Y., Nielsen, K. F., Linnemann, A. R., Gezgin, Y., Hell, K., Nout, M. J., ...Frisvad, J. C. (2016). Diversity in secondary metabolites including mycotoxins from strains of *Aspergillus section nigri* isolated from raw cashew nuts from benin, west Africa. *PLoS One*, 11, e0164310.
74. A. Sharma, V. Vivekanand, R.P. Singh, Solid-state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 3444–3450.
75. O.V. Singh, A. Sharma, R.P. Singh, Gluconic acid production by *Aspergillus niger* mutant ORS-4.410 in submerged and solid state surface fermentation, *Indian J. Exp. Biol.* 39 (2001) 691–696.
76. O.V. Singh, B.M.J. Pereira, R.P. Singh, Isolation and characterization of a potent fungal strain *Aspergillus niger* ORS-4 for gluconic acid production, *J. Sci. Ind. Res.* 58 (1999) 594–600.

77. P. Pal, D. Vikramachakravarthi, R. Kumar, Fermentative production of glutamic acid from renewable carbon source: process intensification through membrane-integrated hybrid bio-reactor system, *Chem. Eng. Process.* 92 (2015) 7–17.
78. Kundu P, Das A (1984) Utilization of cheap carbohydrate sources for production of calcium gluconate by *Penicillium funiculosum* mutant MN 238. *Indian J Exp Biol* 22:279–281
79. Clark DS, Ito K, Horitsu H (1966) Effect of manganese and other heavy metals on submerged citric acid fermentation of molasses. *Biotechnol Bioeng* 8:465–471
80. A. Piza Morales (2017) Evaluación tecno-económica para la producción de ácido cítrico y ácido glucónico. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
81. Rao D, Panda T, Rao DS (1994) Critical analysis of the effect of metal ions on gluconic acid production by *Aspergillus niger* using a treated cane molasses. *Bioprocess Biosyst Eng* 10:99–107
82. Znad, H., Markoš, J., & Baleš, V. (2004). Production of gluconic acid from glucose by *Aspergillus niger*: growth and non-growth conditions. *Process Biochemistry*, 39(11), 1341-1345.
83. Rosenberg M, Šturdík E, Gomory J, Stanek S, Kacina R, Škárka B. Microorganism strain *Aspergillus niger* CCM 8004. Czechoslovakia, Patent no. 262877; 1988. p. 5.
84. H. Sakurai, H.W. Lee, S. Sato, S. Mukataka, J. Takahashi, Gluconic acid production at high concentrations by *Aspergillus niger* immobilized on a nonwoven fabric, *J. Ferment. Bioeng.* 67 (1989) 404–408.
85. H.W. Lee, S. Sato, S. Mukataka, J. Takahashi, Studies on the production of gluconic acid by *Aspergillus niger* under high dissolved oxygen concentration, *Hakkokogaku Kaishi*, 65 (1987) 501–506



86. R. Steel, W.D. Maxon, Some effects of turbine size on novobiocin fermentations, *Biotechnol. Bioeng.* 4 (1962) 231–240.
87. W. Franke, Zur Physiologie und enzymatischer Gluconsäuregärung durch *Aspergillus niger* (About physiology and enzymatic fermentation of gluconic acid by *Aspergillus niger*), *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.* 191 (1963) 194–200.
88. Lantero, O. J., Shetty, J. K.: US20056,942,997 (2005).
89. H.W. Blanch, S. Drew, D.I.C. Wang, The practice of biotechnology: current commodity products, first edition, in: M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology*, vol. 3, Pergamon Press, New York, 1985, pp. 593–600.
90. Lu, F., Ping, K., Wen, L., Zhao, W., Wang, Z., Chu, J., et al. (2015). Enhancing Gluconic Acid Production by Controlling the Morphology of *Aspergillus niger* in Submerged Fermentation. *Process Biochem.* 50 (9), 1342–1348. doi:10.1016/j. procbio.2015.04.010
91. Lu, F., Wang, Z., Zhao, W., Chu, J., and Zhuang, Y. (2016a). A Simple Novel Approach for Real-Time Monitoring of Sodium Gluconate Production by OnLine Physiological Parameters in Batch Fermentation by *Aspergillus niger*. *Bioresour. Technol.* 202, 133–141. doi:10.1016/j.biortech.2015.11.077

## 5.1. Bibliografía de las figuras

Fig 1. [9]	Fig 5. [80]
Fig 2. [46]	Fig 6. [80]
Fig 3. [46]	Fig 7. [80, 89]
Fig 4. [12]	Fig 8. [80]
	Fig 9. [89]

## 5.2. Bibliografía de las tablas

Tabla 1. [11]	Tabla 4. [46]
Tabla 2. [5]	Tabla 5. [46]
Tabla 3. [6]	