

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
DE LOS RECURSOS NATURALES

*Trabajo de titulación previo
a la obtención del título de Ingeniera
en Biotecnología de los Recursos Naturales*

TRABAJO EXPERIMENTAL:

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO
MEDIANTE FERMENTACIÓN SUMERGIDA DE BAGAZO DE CAÑA
(*Saccharum officinarum* L.) UTILIZANDO *Rhizopus* sp. COMO
BIOCATALIZADOR**

AUTORA:

DANIELLE DEL CISNE NOVILLO QUIROLA

TUTORA:

DRA. INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS, Ph.D

CUENCA - ECUADOR

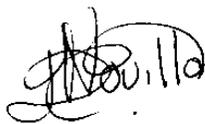
2020

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Danielle del Cisne Novillo Quirola con documento de identificación N° 0104008974, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación: **“EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO MEDIANTE LA FERMENTACIÓN SUMERGIDA DE BAGAZO DE CAÑA (*Saccharum officinarum* L.) UTILIZANDO *Rhizopus sp.* COMO BIOCATALIZADOR”**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora, me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que entrego el trabajo en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, marzo del 2020



.....
Danielle del Cisne Novillo Quirola

C.I. 0104008974

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO MEDIANTE LA FERMENTACIÓN SUMERGIDA DE BAGAZO DE CAÑA (*Saccharum officinarum* L.) UTILIZANDO *Rhizopus sp.* COMO BIOCATALIZADOR”**, realizado por Danielle del Cisne Novillo Quirola, obteniendo el *Trabajo Experimental* que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, marzo de 2020



.....

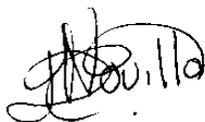
Dra. Inés Patricia Malo Cevallos, Ph.D

C.I. 0102291044

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Danielle del Cisne Novillo Quirola con documento de identificación N° 0104008974, autora del trabajo de titulación: **“EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO MEDIANTE LA FERMENTACIÓN SUMERGIDA DE BAGAZO DE CAÑA (*Saccharum officinarum* L.) UTILIZANDO *Rhizopus* sp. COMO BIOCATALIZADOR”**, certifico que el total contenido del *Trabajo Experimental*, es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, marzo del 2020



.....
Danielle del Cisne Novillo Quirola

C.I. 0104008974

DEDICATORIA

A mis padres por haber sido el pilar fundamental y el más importante de mi vida; este logro se los debo a ustedes, por todo el esfuerzo y sacrificio que han realizado para darme la mejor herencia que ha sido la oportunidad de formarme como profesional. Por su apoyo y comprensión, por haber fomentado en mí el deseo de superación, por haber festejado pequeñas y grandes victorias junto a mí y haberme cobijado con amor ante pequeñas tristezas. Por su paciencia con la que día a día se preocupaban por mi avance y desarrollo de esta tesis y nunca me dejaron sola.

Son mi modelo a seguir...

AGRADECIMIENTOS

Primero agradezco a Dios, por bendecirme a diario con una nueva oportunidad, por haberme regalado unos padres que me han permitido conocer de ÉL y de su infinito amor. Gracias a Dios por siempre mantenerme en su camino, por protegerme y cuidarme a través del tiempo. Le agradezco por aumentar mi fe y confianza de creer en mí misma y darme la sabiduría para llevar a cabo esta tesis.

A mis padres porque a más de haberme dado la oportunidad de crecer profesionalmente, me formaron como persona con su inmenso amor, enseñanzas, reglas y sobre todo los valores inculcados a lo largo de mi vida. Gracias por enseñarme que las cosas se pueden lograr con sacrificio, responsabilidad y dedicación. Les agradezco por haber depositado su confianza en mí y nunca haber dudado de mi inteligencia para lograr este trabajo. Gracias sobre todo por haberme educado con el ejemplo.

A mis hermanas mayores Cristina y Joanna que a pesar de la distancia siempre me han brindado su amor, consejos y apoyo incondicional y a mi hermana menor Pamela por siempre haber estado conmigo y enseñarme que por más contratiempos que la vida te ponga se puede salir adelante.

Extiendo mi sincero agradecimiento a mi tutora, Dra. Inés Malo, por su colaboración desinteresada a través de su conocimiento, apoyo, carisma y buena voluntad para guiarme en el desarrollo de esta tesis. Le agradezco también por el tiempo brindado a enseñarme el manejo del equipo HPLC, y sobre todo haberme brindado su amistad, risas y anécdotas. Gracias por que durante este periodo estudiantil ha demostrado ser una docente ejemplar y sobre todo una excelente persona.

A Samantha Rosales y Carolina Meriño por haberme apoyado y compartido sus conocimientos, por haberme brindado su colaboración y su gran apoyo. De igual manera agradezco a mis amigos que estuvieron siempre pendientes de mí, por su cariño y amistad en el transcurso de mi vida.

A la Ingeniera Sandy Gavilanes y la Dra. Mónica Espadero por la ayuda brindada en mi tiempo dentro del laboratorio, por la confianza y amistad que han depositado en mí.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A.C.: antes de Cristo

Acetil: acetilo

ANOVA: análisis de varianza

atm: atmosférica

ATP: adenosín trifosfato

cc: concentración

cm: centímetros

cm³: centímetros cúbicos

C₃: ácido propiónico

C₄: ácido butírico

CO₂: dióxido de carbono

CoA: coenzima A

DCA: diseño completamente al azar

D-glucosa: monosacárido

g: gramos

h: hora

kg: kilogramos

kt: kilotonelada métrica

L: litro

mg: miligramo

mm: milímetro

mmHg: milímetro de mercurio

mL: mililitro

MPa: megapascal

nm: nanómetro

OD: oxígeno disuelto

PDA: siglas en inglés de Potato Dextrose Agar, agar Papa Dextrosa

pH: potencial de hidrógeno

ppm: partes por millón

PM₁₀: tamaño de partícula menor a 10 micrones

p/v: porcentaje peso volumen

rpm: revoluciones por minuto

t: toneladas

TCN: tratamiento con nutrientes

TR: tiempo de retención

TSN: tratamiento sin nutrientes

°C: grados Celsius

μ: micro

β-1,4: enlace glucosídico

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN	1
1.1 El problema de Investigación	2
1.2 Antecedentes	3
1.3 Justificación.....	4
1.4 Objetivos	5
1.4.1 <i>Objetivo general</i>	5
1.4.2 <i>Objetivos específicos</i>	5
1.5 Hipótesis.....	6

CAPÍTULO 2

MARCO DE REFERENCIA.....	7
2.1 Caña de azúcar.....	7
2.1.1 <i>Generalidades</i>	7
2.1.2 <i>Origen de la caña de azúcar</i>	7
2.1.3 <i>Producción de caña de azúcar en Ecuador</i>	8
2.2 Bagazo de caña.....	8
2.2.1 <i>Propiedades físicas y químicas del bagazo</i>	9
2.2.2 <i>Composición de la materia prima</i>	9
2.2.3 <i>El bagazo de caña como potencia biotecnológica</i>	10

2.2.4	<i>Impacto Ambiental</i>	10
2.3	Pretratamientos de los materiales lignocelulósicos	11
2.3.1	<i>Pretratamiento físico</i>	11
2.3.2	<i>Pretratamiento fisicoquímico</i>	11
2.3.3	<i>Pretratamiento químico</i>	12
2.3.4	<i>Pretratamiento biológico</i>	14
2.4	Ácido Fumárico	14
2.4.1	<i>Definición y propiedades</i>	14
2.4.2	<i>Usos del ácido fumárico</i>	16
2.4.3	<i>Biosíntesis del ácido fumárico: Vías Metabólicas</i>	17
2.4.4	<i>Vías de producción de ácido fumárico</i>	18
2.4.5	<i>Proceso fermentativo y factores influyentes</i>	21
2.5	Género <i>Rhizopus</i>	22
2.5.1	<i>Rhizopus stolonifer</i> V.	23
2.5.2	<i>Clasificación taxonómica de Rhizopus stolonifer</i> V.	24
CAPÍTULO 3		
MATERIALES Y MÉTODOS		25
3.1	Procedimiento.....	25
3.1.1	<i>Aislamiento del hongo Rhizopus stolonifer</i> V. <i>a partir de frutillas contaminadas - Fragaria sp.</i> -.....	25
3.2	Elaboración de medio nutritivo con bagazo de caña	30

3.2.1	<i>Pretratamiento del bagazo de caña</i>	30
3.2.2	<i>Hidrólisis ácida</i>	31
3.2.3	<i>Formulación del medio nutritivo</i>	34
3.2.4	<i>Fermentación en matraces</i>	35
3.2.5	<i>Fermentación en Biorreactor</i>	36
3.3	Método de análisis.....	38
CAPÍTULO 4		
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		41
4.1	Aislamiento y caracterización de <i>Rhizopus stolonifer</i> V.	41
4.1.1	<i>Identificación macroscópica en frutilla</i>	41
4.1.2	<i>Caracterización de la colonia identificada como Rhizopus stolonifer V.</i>	41
4.2	Formulación de medios de cultivo mediante bagazo de caña con y sin suplementos nutritivos para fermentación en matraces y biorreactor	48
4.2.1	<i>Cuantificación de azúcares reductores</i>	48
4.2.2	<i>Fermentación en matraces y biorreactor</i>	49
4.3	Análisis de las concentraciones obtenidas de ácido fumárico de las distintas fermentaciones por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	50
4.4	Evaluación de las variables de estudio mediante método estadístico ANOVA	58
CAPÍTULO 5		
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		62
5.1	Conclusiones	62
5.2	Recomendaciones.....	64

BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXOS.....	76

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Estructura de ácido fumárico	15
Figura 2. Flujo de la producción de ácido fumárico vía isomerización de ácido málico.....	20
Figura 3. Esporangiosporas típicas de <i>Rhizopus</i> y otros mucoraceos.	22
Figura 4. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de <i>Rhizopus</i> <i>sp.</i> : a) esporangio, b) columela, c) columela colapsada, d) esporangióforo, e) rizoides.....	23
Figura 5. Frutillas desinfectadas para su almacenamiento en funda plástica negra.....	26
Figura 6. Cajas Petri con medio PDA y pedazos de tejido contaminado	26
Figura 7. Impronta de muestras con cinta adhesiva colocadas en KOH y azul de lactofenol.	27
Figura 8. Caja Petri con <i>Rhizopus stolonifer</i> V. para su resiembra en matraces.	28
Figura 9. a) Micelio esporulado, b) Cuadrículas en cajas Petri, c) Tubos de ensayo con suspensión de lavado de esporas, d) Gotas del lavado en cada cuadrícula.....	28
Figura 10. Crecimiento de estructura transcurridas cuatro horas.	29
Figura 11. a) Lavado del bagazo de caña con agua, b) Picadora mecánica de la Universidad Politécnica Salesiana, c) Trituración del bagazo.....	30
Figura 12. Trituradora Retsch SM 100 y malla 2mm.....	31
Figura 13. Tamizado en tamizadora Retsch AS 200.	31
Figura 14. Control de temperatura del ácido en el baño térmico.	33
Figura 15. Bagazo de caña en papel aluminio para pesaje y colocación en el ácido.	33
Figura 16. Filtrado de hidrólisis ácida de bagazo de caña.....	33
Figura 17. Ajuste de pH a 5.0 con hidróxido de sodio.....	33

Figura 18. a) Reactivo de fehling A y B, b) Tubo con reactivos y muestra en ebullición, c) Titulación de la muestra para prueba cuantitativa.	34
Figura 19. Matraces con inóculo, con y sin medio nutritivo listos para la fermentación. ...	36
Figura 20. Proceso de hidrólisis ácida de bagazo de caña: a) Bagazo en papel de aluminio, b) Bagazo con ácido en baño maría, c) Proceso de filtrado, d) Filtrado resultante, e) Ajuste de pH.....	37
Figura 21. Biorreactor LAMBDA MININOFR de 3L cargado con el medio preparado.....	37
Figura 22. Parámetros: a) Temperatura, b) pH, c) Oxígeno, d) Aire L/min, d) Agitación.	38
Figura 23. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC Breeze QS Waters 1525).....	39
Figura 24. a) Filtrado de los solventes A y B, b) Desgasificador Fisher Scientific FS20D.....	39
Figura 25. a) Filtro de 45 um para filtrado, b) Viales con diferentes muestras.	40
Figura 26. Tejido de frutilla contaminado: a) Color café característico de contaminación, b) Micelio algodonoso de color blanco.	41
Figura 27. Color blanco de las colonias en primeros estadíos.	42
Figura 28. a) Desarrollo de la colonia b) Parte posterior de la cepa presenta un color blanco en primeros estadios, c) En su madurez color gris.....	42
Figura 29. Abundante micelio cubriendo la caja con medio PDA. Micelio aéreo con esporangios negros.	42
Figura 30. Presencia de numerosos rizoides bien desarrollados.	44
Figura 31. Estolón hialino y bien desarrollado.....	44

Figura 32. a) Desarrollo de esporangi6foro desde estol6n, b) hialino, no septado, recto, largo.....	45
Figura 33. Esporangio6foro: a) Solo, b) Dos, c) Grupo de tres.....	45
Figura 34. Forma de esporangio: a) globoso, b) subgloboso, multiesporados de color negro.....	46
Figura 35. Columela: a) globosa, b) subglobosa, c) columela dentro de esporangio, d) “Sombrero chino”, e) Uno de los di6metros tomados para sacar promedio.....	47
Figura 36. Esporangiosporas fuera del esporangio, formas globosas, subglobosas y ovaladas.	47
Figura 37. a) L6quido incoloro sobre el precipitado, b y c) Viraje de color rojo ladrillo.....	48
Figura 38. Pellets blanquecinos en fermentado	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de la caña de azúcar	7
Tabla 2. Propiedades físico-químicas del ácido fumárico	15
Tabla 3. Taxonomía de <i>Rhizopus stolonifer</i> V.	24
Tabla 4. Equipos, materiales y reactivos para el aislamiento del hongo <i>Rhizopus stolonifer</i> V.	29
Tabla 5. Formulación del medio con nutrientes	34
Tabla 6. Suplementación de medios para Fermentación Sumergida	35
Tabla 7. Condiciones para HPLC	39
Tabla 8. Características microscópicas de <i>Rhizopus stolonifer</i> V.	43
Tabla 9. Cálculo en Excel de las concentraciones de cada muestra corrida.....	52
Tabla 10. Concentraciones obtenidas con nutrientes y sin nutrientes.	53
Tabla 11. Concentración obtenida de la fermentación en biorreactor	54
Tabla 12. Planteamiento de hipótesis para ANOVA	59
Tabla 13. Información del factor	59
Tabla 14. Prueba de ANOVA	60
Tabla 15. Medias de los distintos tratamientos	61
Tabla 16. Método de Tukey aplicado a los tratamientos para las medias de las cc obtenidas en cada uno.	61

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Leve crecimiento de pico en tiempo de retención 2.1.	51
Gráfica 2. Pico en TR 2.1 correspondiente al ácido fumárico.....	51
Gráfica 3. Concentraciones de ácido fumárico con <i>Rhizopus stolonifer</i> V. en diferentes tratamientos: (SN y CN).	53
Gráfica 4. Diferencia de picos entre los dos tipos de tratamientos: a)TSN y b) TCN	54
Gráfica 5. Curva de calibración con estándares 5, 20, 50, 100 ppm de ácido fumárico.....	56
Gráfica 6. Dato correspondiente a la muestra con mayor rendimiento de ácido dentro de la curva de calibración.	57
Gráfica 7. Dato correspondiente a la muestra del fermentado en biorreactor dentro de la curva de calibración.....	57
Gráfica 8. Normalidad obtenida mediante el programa estadístico Minitab ®18.	58
Gráfica 9. Intervalos de CC vs. Tratamiento.	60

RESUMEN

El petróleo es utilizado como fuente principal para la producción de ácidos orgánicos, entre ellos, el ácido fumárico. Dado el agotamiento de este recurso alrededor del mundo, con la presente investigación se buscó sustituir este hidrocarburo por la reutilización de residuos agroindustriales que generan en gran cantidad las industrias azucareras del Ecuador, y que, a largo plazo, ocasionan contaminación ambiental. Se aprovechó el bagazo de caña como materia prima para disminuir la dependencia de los derivados del petróleo, utilizándolo en la producción de ácido fumárico por medio de fermentación sumergida aplicando una cepa aislada a partir de frutillas caracterizada como *Rhizopus stolonifer* V. Se planteó un Diseño de Análisis de Varianzas Completamente al Azar (ANOVA), mediante el cual se evaluó el efecto de la adición de nutrientes a los medios fermentativos. Durante el proceso de fermentación en matraces Erlenmeyer se obtuvo un rendimiento de 23.9358 mg/L de ácido fumárico en el tratamiento sin nutrientes que contenía la hidrólisis ácida del bagazo de caña. Además de una concentración de 8×10^4 esporas/L, a un pH de 5.0 y con una agitación de 130 rpm. En un biorreactor de 3 L y bajo las mismas condiciones, el rendimiento de ácido fumárico alcanzó 235 mg/L debido a que se realizó a una mayor escala, por lo tanto, se demostró que se puede obtener de manera biotecnológica dicho ácido, tanto a escala de laboratorio como industrial.

Palabras clave: ácido fumárico, agitación, bagazo de caña, biorreactor, fermentación sumergida, pH, *Rhizopus stolonifer* V.

ABSTRACT

Petroleum is used as the main source for the production of organic acids, including fumaric acid. Because of the depletion of this resource around the world, this research sought to replace this hydrocarbon with the reuse of agro industrial waste that the ecuadorian sugar industries generates in large amount, and which, in a long term, cause environmental pollution. Cane bagasse was used as a raw material to reduce dependence on petroleum derivates, using it in the production of fumaric acid through submerged fermentation, applying an isolated strain from strawberries characterized as *Rhizopus stolonifer* V. A Completely Random Variance Analysis Design (ANOVA) was proposed, by which the effect of adding nutrients to the fermentation media was evaluated. During the fermentation process in Erlenmeyer flasks, a yield of 23.9358 mg/L of fumaric acid was obtained in the nutrient-free treatment that contained the acid hydrolysis of sugarcane bagasse. In addition to a concentration of 8×10^4 spores/L, at a pH of 5.0 and with a stirring of 130 rpm. In a 3 L bioreactor and under the same conditions, the yield of fumaric acid reached 235 mg/L because it was performed on a larger scale, therefore, it was demonstrated that said acid could be obtained biotechnologically, both on a scale laboratory as industrial.

Key words: agitation, bioreactor, cane bagasse, fumaric acid, pH, *Rhizopus stolonifer* V., submerged fermentation

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Menciona Zweigerdt (2009) más de 80 millones de toneladas de químicos industriales, estimados en aproximadamente dos trillones de dólares, son elaborados de materia prima a base de petróleo; no obstante, no es sustentable debido al agotamiento del petróleo y a la seria contaminación que involucra especialmente la emisión de gases de efecto invernadero, ocasionados por la actual industria petroquímica.

En los últimos años, dado el crecimiento de la biotecnología, se han desarrollado procesos microbianos que ayudan a la biodegradación y transformación de residuos en materias primas importantes para obtener productos de consumo, siendo un método ambiental y económicamente sustentable (Ramírez, 2017).

El ácido fumárico es obtenido por medio de la fermentación del azúcar con hongos, y por síntesis química de derivados del petróleo, siendo esta última la que mayor uso tiene; a nivel mundial se realizan investigaciones sobre la utilización de recursos renovables que sustituyan el petróleo, teniendo así una opción biotecnológica, el aprovechamiento de residuos agroindustriales utilizando microorganismos capaces de producir dicho ácido en cantidades pequeñas (Giraldo, 2013).

Un enfoque biológico en la producción de ácido fumárico se debe a los hongos filamentosos de la especie *Rhizopus* que producen este ácido a partir de la vía del ácido pirúvico (Zhang, Zhang & Yang, 2013). Estos organismos concentran grandes cantidades de ácidos orgánicos gracias a que la piruvato descarboxilasa se encuentra en el citosol (Mondala, 2015).

La fermentación sumergida consiste en el crecimiento de microorganismos en sistemas completamente líquidos, en la cual el agua es el componente mayoritario en el medio (Parzanese, 2016).

En esta investigación se evaluará la producción de ácido fumárico mediante la cepa *Rhizopus sp.* utilizando bagazo de caña *Saccharum officinarum* L. como sustrato, mediante fermentación sumergida.

1.1 El problema de Investigación

Hoy en día, el 3% de la síntesis química basada en derivados del petróleo es utilizada para la producción de ácido fumárico, siendo este el método comercial disponible, contando con una producción anual de aproximadamente 90 000 toneladas (Roa, Straathof, Zijlmans, Van Gulik & Van Der Wielen, 2008). El petróleo es un recurso no renovable que está acabándose alrededor del mundo, en el año 2002 existía a nivel mundial aproximadamente 1 billón de barriles de crudo por extraer, lo que representa un agotamiento de las reservas de petróleo hacia el año 2043 debido al actual ritmo de consumo mundial (Zuluaga & Antoñana, 2004).

El consumo de ácido fumárico ha tenido un crecimiento en los últimos años a una tasa promedio anual de 1.1%, teniendo un mayor uso en la síntesis de una variedad de resinas, incluyendo resinas de papel en un 35% de producción anual de ácido fumárico, resinas alquídicas en un 6% y en resinas de poliéster insaturado en un 15%; además, el ácido fumárico es utilizado como acidulante en alimentos y bebidas en un 22% (Yang, Zhang, Zhang & Huang, 2011). Como menciona Papadaki *et al.* (2018), la demanda mundial del ácido fumárico se estimó en 225.2 kt en 2012 y se espera que supere las 300 kt este año 2020.

A pesar de que, se puede obtener un alto rendimiento de producción por método químico a base de petróleo, la demanda actual y potencial del ácido fumárico junto a la escasez del

petróleo, y la necesidad de disminuir la dependencia de productos derivados del mismo, han despertado interés por obtener bioproductos utilizando métodos de producción biotecnológica a partir de materias primas renovables (Giraldo, 2013).

La fermentación sumergida se presenta como un proceso biotecnológico de interés, ofreciendo fuentes alternativas para el suministro de ácidos orgánicos de importancia comercial como lo es el ácido fumárico. Debido a esta situación, el presente estudio tiene como finalidad evaluar la producción de ácido fumárico utilizando residuos agroindustriales de la caña de azúcar como sustratos menos costosos, y sustituir el petróleo como fuente primaria de obtención de este ácido. Además de mitigar el ambiente, aporta herramientas y nuevos conocimientos para su aplicación en industrias que hacen uso del mismo (Kenealy, Zaady, du Preez, Stieglitz & Goldberg, 1986).

1.2 Antecedentes

El ácido fumárico fue el primer ácido insaturado aislado como producto del metabolismo hidrocarbonado de un microorganismo, tal descubrimiento se debe al químico Felix Ehrlich (1877 - 1942) quien inició a la producción de ácido fumárico por vías biotecnológicas en cultivos de *Rhizopus nigricans* E., al identificarlo como principal producto de degradación de la glucosa (Ehrlich, 1911).

En base al estudio de Foster y Waksman (1938) en el cual utilizaron 41 cepas de 8 géneros diferentes de Mucorales como productores de ácido fumárico, identificaron la cepa con mayor rendimiento de dicho ácido; siendo los géneros identificados: *Rhizopus (nigricans o stolonifer, arrhizus, oryzae y fomorosa)* los que mejor resultado dieron en la producción de ácido fumárico en condiciones aerobias y anaerobias (Roa *et al.*, 2008).

Durante 1940, la empresa Pfizer en los Estados Unidos realizó la primera producción comercial mediante fermentación utilizando una cepa de *Rhizopus arrhizus* F., generando 4000 toneladas de producción anual (Goldberg, Rokem & Pines, 2006).

La fermentación fumárica fue estudiada antes de la época de los 50's previo al inicio de la industria petroquímica; en los últimos años se ha retomado el estudio de este proceso biotecnológico, principalmente por investigadores asiáticos, europeos, estadounidenses y brasileños (Vasco, 2007).

1.3 Justificación

La presente investigación tiene como fin dar una alternativa biotecnológica para la producción de ácido fumárico a nivel de laboratorio, aprovechando como sustrato bagazo de caña (subproducto desechado por agricultores, pequeñas y grandes industrias paneleras y azucareras) utilizando la cepa de *Rhizopus stolonifer* V. como biocatalizador en fermentación sumergida, tomando en cuenta la investigación de Koutinas *et al.* (2014), *Rhizopus sp.* fue utilizada para producir este ácido pero ha sido reemplazada debido a la alta producción por síntesis petroquímica.

El ácido fumárico se obtiene mediante la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos a partir de hongos filamentosos de la especie *Rhizopus sp.*, siendo las cepas que dan mayor rendimiento en la producción de dicho ácido (Carta, Soccol, Ramos & Fontana, 1999).

La bioproducción por medio de fermentación, en comparación con el método de síntesis química, provee ventajas tales como: minimizar la emisión de gases de efecto invernadero y los desechos tóxicos, debido a que es ambientalmente amigable (Yang, 2007). Al utilizar como materia prima la biomasa renovable y los residuos orgánicos, hacen que el proceso sea sostenible y más económico (Roa *et al.*, 2008).

El desconocimiento sobre los usos que se pueden dar a los residuos orgánicos genera una pérdida en su aprovechamiento en procesos y estudios, debido a su alto contenido en carbohidratos, azúcares y distintos componentes que pueden ser utilizados en diferentes métodos para beneficiar al país en la elaboración de productos de interés industrial (Rosas & Terán, 2015).

En Ecuador la agroindustria produce una enorme masa de subproductos, los cuales son desechados a botaderos a cielo abierto, quemados, o colocados en terrenos secos o vacíos, los mismos que son arrastrados por el viento representando así un problema ambiental (Gavilanes *et al.*, 2016). Según CINCAE (2013), la industria azucarera produce una cantidad relevante de subproductos teniendo que en el año 2008 se generaron aproximadamente 1 300 000 t de bagazo y 140 000 t de cachaza o melaza, por lo que utilizarlos para desarrollar productos de interés industrial, representa una alternativa prometedora, imponiendo retos para lograr desarrollo y crecimiento, buscando relaciones equilibradas entre el sistema económico y el ambiente, aprovechando la variedad y disponibilidad de los recursos, sin descuidar su sostenibilidad (Alviar, 2012).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar la producción de ácido fumárico mediante fermentación sumergida de bagazo de caña (*Saccharum officinarum* L.) utilizando *Rhizopus sp.* como biocatalizador.

1.4.2 Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar cepas de *Rhizopus sp.* obtenidas de frutillas (*Fragaria sp.*) utilizando claves taxonómicas para su aplicación como biocatalizador.

- ✓ Desarrollar medios de cultivo mediante bagazo de caña con y sin suplementos nutritivos para usarlos como sustratos durante la fermentación en matraces y en biorreactor.
- ✓ Determinar la concentración de ácido fumárico mediante cromatografía líquida de alta resolución evaluando la aptitud de los medios de cultivo.
- ✓ Evaluar las variables de estudio con herramientas estadísticas determinando su influencia en la producción de ácido fumárico.

1.5 Hipótesis

Los suplementos nutritivos adicionados al medio de cultivo influyen en el rendimiento de ácido fumárico.

CAPÍTULO 2

MARCO DE REFERENCIA

2.1 Caña de azúcar

2.1.1 Generalidades

Pertenece a la familia de las Gramíneas, es común encontrarla alrededor del mundo en países tropicales y subtropicales, la caña de azúcar tiene un crecimiento entre 243.84 a 609.6 cm de alto y un grosor de 2 60.96 cm; Brasil es el país con mayor producción, representando el 25% de la producción mundial y la India es el segundo país con mayor producción de caña de azúcar (Parameswaran, 2009). La taxonomía de la caña de azúcar se indica en la tabla 1.

Tabla 1

Taxonomía de la caña de azúcar

División:	Magnoliophyta
Clase:	Monocotiledónea
Orden:	Poales
Familia:	Poaceae (Gramíneas)
Género:	<i>Saccharum</i>
Especie:	<i>Saccharum officinarum</i> Linn.

Fuente: Autora.

El cultivo de caña de azúcar es un cultivo agroindustrial con gran importancia ya que genera empleo directo, el 20% se destina a la producción de panela y el 80% se destina a la producción de azúcar y alcohol etílico (Marmol & Liviapoma, 2014).

2.1.2 Origen de la caña de azúcar

El científico Carlos Linneo dio el nombre de *Saccharum officinarum* a la caña de azúcar, el origen de la caña se da en Nueva Guinea gracias al hallazgo de una gran variedad de caña

tipo césped y al clima tropical, se creía que era una especie de bambú con un sabor dulce y con crecimiento silvestre; el cultivo de la caña de azúcar es el más antiguo del mundo ya que entre los años 100 y 800 A.C. ha sido mencionada en textos antiguos mitológicos y poéticos indios (Avila, 2011).

En la India se escuchó por primera vez acerca de una caña que producía miel sin ayuda de abejas, siendo ellos los primeros en degustarla (Marmol & Liviapoma, 2014).

En la antigüedad los romanos tenían conocimiento sobre la caña de azúcar, pero por medio de estacas los árabes propagaron por distintos países como Palestina, Egipto, Sicilia, España y Marruecos (Dávila, 2014).

Cristóbal Colón en 1493 introdujo el cultivo de caña de azúcar en América (Dávila, 2014), y su producción y consumo se expandió alrededor de todo el mundo a finales del siglo XVII (Marmol & Liviapoma, 2014).

2.1.3 Producción de caña de azúcar en Ecuador

Según INEC (2019), menciona que la superficie plantada de caña de azúcar a nivel nacional en 2018 fue de 101 898 hectáreas, distribuidas en las siguientes provincias: 88.2 % en Guayas, 6% en Cañar, 2.5% en Loja, 1.1% en Los Ríos y 0.2% en otras provincias; por lo tanto, la producción anual que se obtuvo fue de 7.5 millones de toneladas, teniendo que las provincias del Guayas, Cañar e Imbabura generaron un 96.6% de producción total.

2.2 Bagazo de caña

Bagazo es un residuo o subproducto fibroso lignocelulósico que se obtiene al extraer el jugo de la caña, el porcentaje de humedad con el que sale de la extracción es de 50%; representa entre 25 y 40 % de materia total procesada (Vanegas, 2016). El material

lignocelulósico se encuentra formado por 20% de lignina, y 80% entre celulosa y hemicelulosa (Pozo, 2012).

2.2.1 Propiedades físicas y químicas del bagazo

El bagazo de caña es un residuo sólido fibroso, voluminoso, su color varía entre un amarillo-gris y verde pálido; los tres componentes principales de los que está compuesto el bagazo son: el recubrimiento, los mazos de fibra vascular y el tejido básico o médula; además, una vez que sale de los molinos la composición del bagazo es de: 49% de humedad, 6% de sólidos solubles y 45% de fibra cruda (Herrera, 2005).

2.2.2 Composición de la materia prima

a) Lignina

Es un polímero que tiene estructura tridimensional compleja, ramificada y amorfa (Barroso, 2010). Químicamente mantiene unidas las fibras de la celulosa y hemicelulosa teniendo como función dar soporte, resistencia e impermeabilidad a las plantas ante microbios y ataques de estrés oxidativo (Raspolti & Antonetti, 2012).

b) Celulosa

Es uno de los componentes más simples del material lignocelulósico, es un polisacárido de cadena larga conformado por unidades de D- glucosa unidos por enlaces β -1,4; en su estructura existen partes cristalinas y partes porosas, también están presentes puentes de hidrógeno intermoleculares en la unión de cadenas de celulosa (Raspolti & Antonetti, 2012). Su función es dar estructura y soporte a la planta; y es un polímero insoluble y resistente a hidrólisis (Peña, Matrani, Correa, Cadenas & Munilla, 2000).

c) Hemicelulosa

Son heteropolisacáridos que forman cadenas cortas conformados por pentosas y hexosas; asimismo consta de tres polímeros principales que son los xilanos, los mananos y los arabinogalactanos; tiene un peso molecular bajo comparado a la celulosa y su función es conectar las fibras de la lignina y la celulosa; también, analíticamente se diferencia de los demás componentes debido a: solubilidad en solventes, reactividad frente a los ácidos y descomposición en azúcares y furfural (Raspolti & Antonetti, 2012).

2.2.3 El bagazo de caña como potencia biotecnológica

El bagazo de caña al ser uno de los subproductos agroindustriales más abundantes ha sido utilizado por la biotecnología, pues ha tenido una aplicación significativa en la producción de enzimas y alimentos enriquecidos con proteínas como alimento para ganado; de igual manera, es utilizado para la producción de enzimas de interés industrial y de biocombustibles (Parameswaran, 2009).

2.2.4 Impacto Ambiental

El bagazo se apila en la parte externa de los ingenios para su correcto secado previo a ser enviado a otras industrias para su uso, cuando se apila el bagazo fresco en la intemperie su humedad produce un residuo líquido, en el cual las levaduras son capaces de fermentar, dándose el crecimiento de muchos tipos de hongos, entre los principales los actinomicetos termo y mesofílicos; así mismo en el bagazo seco y viejo aparece moho y puede comprender grandes cantidades de esporas de las cuales una parte es liberada al ambiente, en consecuencia, el 50% de agricultores adquieren la enfermedad de bagazosis, así como también pueden contaminarse las personas que se encuentran alrededor de dichas zonas (Basanta, García, Cervantes, Mata & Bustos, 2007).

El bagazo de caña también tiene un impacto sobre la calidad del aire, ya que como mencionan Carrera, Loyola e Iglesias (2010), la quema de este residuo produce partículas suspendidas menores a 10 micrones (PM_{10}), los contaminantes atmosféricos son gases CO , SO_x y NO_x .

2.3 Pretratamientos de los materiales lignocelulósicos

Los pretratamientos son indispensables para obtener una hidrólisis con buen rendimiento ya que aumenta la porosidad del material, reduce la cristalinidad de las fibras de celulosa, remueve la hemicelulosa y disminuye la cantidad de lignina; siendo los tres últimos factores limitantes, los pretratamientos se clasifican en: físicos, químicos, físico-químicos y biológicos (González *et al.*, 2011).

2.3.1 Pretratamiento físico

Los métodos físicos son: el pulverizado mecánico, pirolisis y agua caliente, es el corte de la materia lignocelulósica teniendo la reducción del tamaño de partícula y también de la cristalinidad; con este pretratamiento se tiene un aumento en la superficie disponible y la reducción del grado de polimerización, por lo tanto, el objetivo del pretratamiento es tener un mayor rendimiento en la hidrólisis total de la materia lignocelulósica (Cortes, 2014). Dentro del pretratamiento físico se encuentran: el pulverizado mecánico o molienda, pirolisis y agua caliente (Gracida & Pérez, 2014).

2.3.2 Pretratamiento fisicoquímico

Es una mezcla de procesos físicos y químicos en donde se reduce el tamaño de partícula gracias a procesos químicos. Teniendo entre los principales:

a. Explosión de vapor

El material lignocelulósico es expuesto a temperaturas entre 160 – 260 °C y a una presión entre 5 - 50 atm; la presión es liberada gradualmente y el vapor se expande dentro de la matriz lignocelulósica, ocasionando la separación individual de las fibras y la ruptura de la pared celular, por otra parte, el ácido es añadido como catálisis durante la explosión de vapor, sin embargo, no es obligatoria (Amin *et al.*, 2017).

b. Radiación de microondas

Los componentes del campo eléctrico y magnético de las microondas aplican fuerzas que cambian rápidamente de orientación; debido al calor y colisiones extensas generadas por la vibración de moléculas polares y movimiento de iones, la radiación de microondas acelera procesos biológicos, químicos y físico (Amin *et al.*, 2017).

c. Explosión con CO₂

El CO₂ se disuelve con agua forma ácido carbónico, lo que ocasiona la hidrólisis; la relación utilizada de material es 4 kg de CO₂/ kg de material, con una presión de 5.62 MPa (Gracida & Pérez, 2014).

2.3.3 Pretratamiento químico

Los pretratamientos químicos son mayormente utilizados que los métodos biológicos y físicos debido a que son más eficaces y mejoran la biodegradación de materiales complejos (Zhou, Zhang & Dong, 2012). Los químicos comunes utilizados son ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido acético, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco acuoso, peróxido de hidrógeno (Amin *et al.*, 2017).

a. Pretratamiento alcalino

Es la adición de bases a la materia prima de manera que haya un aumento de la superficie interna por hinchazón, la disminución del grado de polimerización y cristalinidad, la destrucción de enlaces entre lignina y otros polímeros y el desglose de lignina (Badiei, Asim, Jahim & Sopian, 2014). Este pretratamiento es apto para tratar materias primas con bajo contenido de lignina; las bases más utilizadas son NaOH, KOH y Ca(OH)₂, además, este tipo de pretratamientos son ventajosos para lograr la hidrólisis parcial de las biomásas lignocelulósicas (Amin *et al.*, 2017).

b. Pretratamiento ácido (Hidrólisis)

Hidrólisis posee la finalidad de quebrar los polisacáridos -macromoléculas-, de fácil fermentación, en mono y disacáridos que son más pequeñas y de fácil fermentación en un medio acuoso; dicho proceso se puede realizar utilizando ácidos -hidrólisis ácida- o a través del empleo de enzimas -hidrólisis enzimática- (Pulido, 2003).

La hidrólisis es un proceso químico que a través del uso de catalizadores ácidos que modifica las cadenas de polisacáridos que componen la biomasa en sus elementales monómeros -azúcares reductores-, conforme el proceder del ácido, el poder reductor de los productos crece y, la viscosidad y el peso molecular disminuye (Domínguez, Álvarez, Granados & Hernández, 2012). Interrumpe las fuerzas de Van der Waals provocando la solubilización de la hemicelulosa y la reducción de la celulosa (Li *et al.*, 2010). La reacción principal que se da es la hidrólisis de la hemicelulosa (Hendriks & Zeeman, 2009) .

La tecnología más utilizada para adquirir azúcares fermentables ha sido la hidrólisis ácida de los lignocelulósicos (Sarrouh, Jover & Gonzáles, 2005). De este proceso se consigue una fracción líquida rica en azúcares reductores y una sólida formada principalmente de lignina

y celulosa, cabe recalcar que el método mencionado no es útil para eliminar lignina (Morales, 2015).

Los pretratamientos con ácido diluido pueden mejorar la hidrólisis de celulosa, la lignina se disuelve en la mayoría de los casos, lo que produce que exista mayor susceptibilidad de la celulosa a las enzimas (Mudhoo, 2012).

c. Ozonólisis

Se agrega ozono a una temperatura de 4 °C con una concentración de 10% (p/v), produce la degradación de hemicelulosa y lignina (Gracida & Pérez, 2014).

d. Pretratamiento oxidativo

Se utiliza la enzima peroxidasa en presencia de H₂O₂, eliminando alrededor del 50% de lignina y la mayor parte de hemicelulosa, de esta manera se libera la glucosa durante la sacarificación (Cuervo, Folch & Quiroz, 2009).

2.3.4 Pretratamiento biológico

Se utilizan microbios y/o enzimas para la deconstrucción de las estructuras de lignina en la pared celular que actúan como catalizadores, esto ocurre en la primera etapa de hidrólisis (Tanjore, Shi & Wyman, 2011). La eficacia del pretratamiento biológico requiere de mediadores químicos y enzimas para aproximar las barreras bioquímicas y físicas a la hidrólisis; pues las enzimas expanden los poros pequeños abriendo la matriz de la pared celular y permitiendo el acceso (Jeremic, Goacher, Yan, Karunakaran & Master, 2014).

2.4 Ácido Fumárico

2.4.1 Definición y propiedades

El ácido fumárico es un ácido orgánico dicarboxílico insaturado con diversas utilidades en la industria alimenticia debido a su estructura molecular -figura 1-, entre ellas agente

reductor, mejorador de textura, regulador de pH, agente de leudado (Ochoa, Betancur & Sandoval, 2017). En ocasiones dicho ácido se encuentra en su estado natural por ejemplo en la fumaria, *Fumaria officinalis* L., de la que deriva su nombre (Klages, 2006).

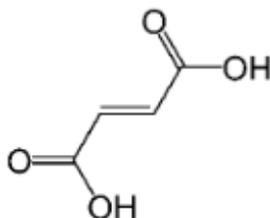


Figura 1. Estructura de ácido fumárico.

Fuente: (Giraldo, 2013: p. 12).

El ácido fumárico es conocido también como ácido 2-butenodioico, ácido trans-1,2-etilendicarboxílico, ácido tumárico, ácido alomaléico, ácido liquénico, ácido boléico; las propiedades físico-químicas de este ácido se observan en la tabla 2 (Giraldo, 2013).

Tabla 2

Propiedades físico-químicas del ácido fumárico

CARACTERÍSTICAS	UNIDAD	VALOR
Color/Forma	-	Prismas monocíclicos o laminillas en agua; cristales incoloros; polvo blanco cristalino, agujas
Punto de Fusión	°C	287
Punto de Ebullición a 760 mmHg	°C	290
Punto de Ebullición a 1.7 mmHg	°C	165 sublima
Peso Molecular	g/mol	116.07
Solubilidad del agua:	-	Ligeramente soluble en agua
En 100 mL de agua a 20 °C	g	0.63
En 100 mL de agua a 25 °C	g	0.70
En 100 mL de agua a 100 °C	g	8.93
Solubilidad en solventes orgánicos		-
En 100 mL de acetona a 20 °C	g	1.29
En 100 mL de acetona a 25 °C	g	4.20
Gravedad específica a 25 °C	g/mL	1.001
Densidad 20/4 °C	g/cm ³	1.635

Fuente: (Giraldo, 2013: p.13).

2.4.2 Usos del ácido fumárico

El ácido fumárico es utilizado a nivel mundial en un 33% como acidulante en alimentos y bebidas, seguido por un 20% para resinas en la industria del papel, 18.6% en resinas de poliéster insaturado y finalmente 12.3% para resinas alquídicas (Giraldo, 2013).

Es utilizado como suplemento en la alimentación del ganado; varias investigaciones indican que se puede conseguir una gran reducción en las emisiones de metano del ganado (hasta un 70%), si dicho ganado adopta un aditivo a base de ácido fumárico como suplemento en su dieta, lo cual podría reducir en una medida considerable la emisión total de metanos, debido a que los animales de granja son causantes del 14% de la emisión de metano causada por la actividad humana (Ochoa *et al.*, 2017).

El ácido fumárico ha sido utilizado como acidulante en comidas y bebidas desde 1946, es utilizado en muchos productos de comida, incluyendo maíz, tortillas de trigo, masas de galletas refrigeradas, gelatinas, ácidos gelificantes, jugos de frutas, bebidas nutracéuticas, y vino; además, investigaciones muestran que el ácido fumárico mejora la calidad y reduce costos de algunos alimentos y productos de bebida (Yang *et al.*, 2011).

Sus ésteres se han aplicado en varios campos. Cabe destacar que el monoetil fumarato y dimetil fumarato son los más utilizados, especialmente en la inhibición de moho (Giménez *et al.*, 2009). También son utilizados como medicina en el tratamiento de psoriasis, una condición anormal de la piel (Moharreggh, Linker, Gold & Stangel, 2009). Según la patente de Joshi y Strebel (2002), las personas que presentan esta enfermedad no pueden producir ácido fumárico normalmente, por lo que deben tomar ácido fumárico por vía oral en forma de dimetil o monoetil fumarato como suplemento; por otra parte, son utilizados para producir medicamentos de trasplante, especialmente productos farmacéuticos para tratar, aliviar y suprimir la reacción del huésped contra el injerto; por último, pero no menos, muchas

medicinas son producidas comercialmente en forma de sales de fumarato, así pues, el fumarato ferroso es muy conocido como suplemento para prevenir y tratar deficiencias de hierro y anemia por deficiencia de hierro con las ventajas de alto contenido de hierro, resistencia a la oxidación y poco efecto secundario (Zlotkin, Arthur, Antwi & Yeung, 2001).

2.4.3 Biosíntesis del ácido fumárico: Vías Metabólicas

En todos los organismos aeróbicos, la producción de ácido fumárico se da en dos vías metabólicas diferentes: la vía de carboxilación reductiva y ciclo de Krebs, en primer lugar, en la carboxilación reductiva, el piruvato es producido de monosacáridos, generalmente glucosa a través del metabolismo de glicólisis común; en segundo lugar, el ciclo de Krebs incluye reacciones en las cuales el oxalacetato interacciona con la Acetil CoA para formar ácido cítrico; al mismo tiempo, el ácido cítrico es sometido a dos pasos de descarboxilación y diversas transformaciones para generar oxalacetatos nuevamente: siendo el ácido fumárico uno de los intermediarios en dichas reacciones, por lo tanto, el ciclo reductivo de Krebs es la principal fuente de ácido fumárico e involucra la fijación de CO₂ de un ácido C₃ a un C₄ (Das, Brar & Verma, 2016).

En la síntesis de ácido fumárico, intervienen tres enzimas principales: piruvato carboxilasa ubicada en el citoplasma, malato deshidrogenasa y fumarasa ambas ubicadas en el citosol y la mitocondria; dado que, la primera enzima cataliza la carboxilación del piruvato a oxalacetato con ayuda de ATP y CO₂, la malato deshidrogenasa induce la transformación del oxalacetato en ácido málico, y la fumarasa isomeriza este último en ácido fumárico (Martin-Dominguez, Estevez, Ojembarrena, Santos & Ladero, 2018).

2.4.4 Vías de producción de ácido fumárico

2.4.4.1 Antecedentes de producción

En 1991 se realizó la producción biotecnológica y extracción de ácido fumárico a partir de subproductos agrícolas como el almidón de yuca no apta para el consumo humano y la cáscara de piña utilizando como biocatalizador *Rhizopus nigricans* E. Como resultado tuvieron que el sustrato de yuca fue el mejor medio debido a la rápida adaptación que tuvo el hongo a dicho medio durante las pruebas preliminares. Obteniendo concentraciones de 42.60 % de ácido fumárico (Zauscher, Barajas, Duarte & Estupiñan, 1991).

En una investigación para producción de ácido fumárico utilizaron bagazo de yuca como fuente de carbono en fermentación sumergida con la cepa *Rhizopus formosa* MUCL 28422 en donde obtuvieron una producción de 2.76 a 21.28 g/L; estos resultados se obtuvieron bajo las siguientes condiciones: relación C/N 168, KNO₃ como fuente de nitrógeno, 20 g/L de CaCO₃, 10µg/L de Biotina, 0.04 g/L de ZnSO₄.7H₂O, 0.25 g/L de MgSO₄.7H₂O, 0.15 g/L de KH₂PO₄, 15mL/L de metanol, a 200 rpm y 32 °C (Carta *et al.*, 1999).

Giraldo (2013), realizó un estudio sobre los desarrollos biotecnológicos para el aprovechamiento de residuos en la producción de ácido fumárico como alternativa a la sustitución de derivados del petróleo, realizó ensayos con el hongo *Rhizopus stolonifer* V. y residuos agrícolas: cáscaras de mango, cáscaras de piña y totumo como sustratos en la fermentación fumárica; obteniendo como resultado que las cáscaras de piña son el residuo más adecuado para la fermentación fumárica teniendo una concentración de 258.39 mg/L con un rendimiento producto/sustrato de 0.85%, 16 veces mayor a la fermentación sin optimizar.

En 2016, investigadores chinos realizaron un estudio de la capacidad de *Rhizopus arrhizus* RH7-13 en la producción de ácido fumárico a base de residuos alimenticios ricos en

carbohidratos y proteínas teniendo un potencial prometedor para productos químicos de base biológica renovables; en dicho estudio comprobaron que la fracción líquida de los desechos alimentarios es el mejor medio, al ser utilizado como medio de fermentación, el rendimiento de ácido fumárico alcanzó 32.68 g/L, en una producción volumétrica de 0.34 g/L por hora, la fracción sólida de desechos alimenticios mezclada con agua también pudiera ser utilizada en el proceso de fermentación y podría reemplazar una parte de carbono común, nitrógeno y nutrientes (Liu *et al.*, 2016).

Fang (2018) evaluó el jarabe lignocelulósico tratado con carbón activado en polvo preparado a partir de bagazo de caña como una materia prima potencial en la producción de ácido fumárico por *Rhizopus oryzae* ATCC 20344, el uso del jarabe lignocelulósico, el efecto de la fuente de nitrógeno, los aditivos del medio, y el pH inicial del medio en la morfología del hongo fueron estudiados; las condiciones óptimas en la producción de ácido fumárico (2.0 g/L urea, pH 3.0) produjo los gránulos de hongos compactos, suaves y uniformes deseados resultantes en la producción de 34.20 g/L de ácido fumárico, con un rendimiento de 0.43 g/g y una productividad de 0.24 L/h; demostrando que el bagazo de caña puede ser utilizado como fuente renovable de carbono para la fermentación de ácido fumárico por *Rhizopus oryzae* W.

2.4.4.2 Métodos de obtención

a. Ruta petroquímica de producción de ácido fumárico

El ácido fumárico es producido de manera comercial por medio de la isomerización del ácido maleico obtenido de hidrólisis del anhídrido maleico, que a su vez se produce mediante la oxidación del benceno (Das *et al.*, 2016). Existen numerosos tipos de catalizadores para la isomerización de ácido maleico, categorizándolos en tres tipos: ácidos minerales, compuestos peroxídicos con bromuros y bromatos, y compuestos con azufre como la tiourea y derivados;

asimismo, la producción de ácido fumárico altamente puro se da por medio de la cristalización de la mezcla acuosa, lavando y secando (Felthouse, Burnett, Horrell, Mummey & Kuo, 2001). En la figura 2 se muestra un diagrama de flujo del proceso simplificado de producción de ácido fumárico.

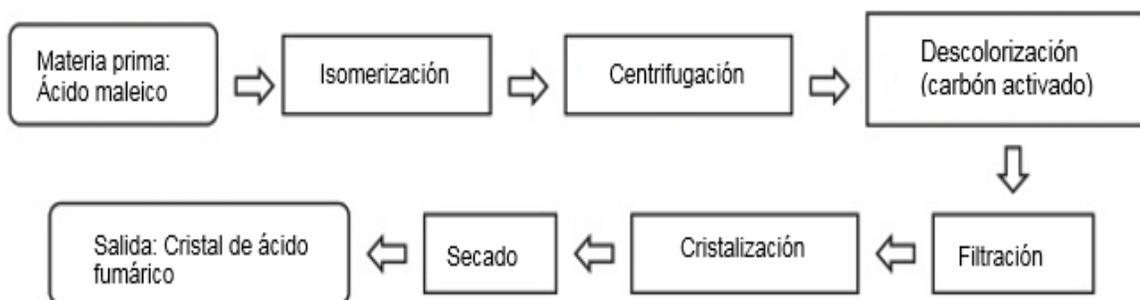


Figura 2. Flujo de la producción de ácido fumárico vía isomerización de ácido málico.

Fuente: Yang, Zhang, Zhang y Huang (2011, p. 166).

b. Fermentación de azúcar

Debido al agotamiento del petróleo convencional y el deterioro del medio ambiente mundial, muchos químicos de plataforma se producen a partir de biomasa renovable en condiciones de proceso moderadas, como la fermentación (Das *et al.*, 2016).

En el año de 1940 antes del aumento de la industria petroquímica, el ácido fumárico se obtenía de la fermentación de azúcares con el hongo *Rhizopus arrhizus* F., la fermentación consta de dos pasos: preparación del cultivo y la producción del ácido, por ello, el proceso de obtención depende del tipo de neutralizante utilizado durante la fermentación, con CaCO_3 en la fermentación se acidifica con H_2SO_4 a un pH de 1.0 y a una temperatura de $160\text{ }^\circ\text{C}$; una vez filtrado se retiran las partículas insolubles y el filtrado se almacena en frío para recuperar el ácido fumárico como precipitado mediante la cristalización, en cambio, cuando se utiliza como agente neutralizante a Na_2CO_3 , el caldo de fermentación se filtra primero y se acidifica para recuperar el ácido fumárico en forma de cristales; por lo tanto, este tipo de proceso es

más simple dado que no se necesita calentar ni enfriar y tampoco se produce un desperdicio sólido de CaSO_4 (Yang *et al.*, 2011).

2.4.5 Proceso fermentativo y factores influyentes

La composición del medio depende de los requerimientos del microorganismo, la glucosa es la fuente de carbono más utilizada debido a que es metabolizada rápidamente por el hongo, sin embargo, aparte de la glucosa, algunos sustratos pueden ser utilizados como materias primas para desarrollar procesos eco amigables: fuentes de carbono como almidón, xilosa de biomasa lignocelulósica, glicerol, etcétera (Martin-Dominguez *et al.*, 2018). La producción de ácido fumárico por medio de fermentación sumergida de diferentes materiales de desperdicio ha adquirido una gran importancia, por lo que se están considerando más sustratos a gran escala debido a la creciente investigación sobre la alternativa de carbón de bajo costo para síntesis de productos de valor agregado (Das *et al.*, 2016).

El pH dado que tiene un efecto regulador sobre las actividades de los microorganismos, es la condición más importante en la producción de ácidos por fermentación y en general, en procesos biotecnológicos (Martin-Dominguez *et al.*, 2018). El pH debe mantenerse en un rango de 4 a 7, según la patente de Ling y Ng (1989).

La continua aeración y agitación son necesarias para mantener un nivel de OD alto para el correcto crecimiento de la célula y el metabolismo; se mantiene dos fases de OD el 80% al principio y un 30% cuando ya hay producción de ácido (Yang *et al.*, 2011). Cuando las células son expuestas al aire, se pueden alcanzar altas tasas de transferencia de oxígeno, mientras que las células pueden tomar sustrato y excretar el ácido fumárico producido cuando se sumergen (Roa *et al.*, 2008). Un exceso de oxígeno puede simular el ciclo de TCA y

conducir a un aumento en el crecimiento celular y el consumo de energía (Xu, Li, Huang & Wen, 2012).

2.5 Género *Rhizopus*

La identificación y clasificación de las especies *Rhizopus* hasta ahora se ha basado de gran manera en la morfología, este género contiene cuatro grupos siendo estos: grupo *Rhizopus lycococcus*, grupo *R. stolonifer* V., grupo *R. oryzae* W. y grupo *R. microsporus* T. (Schipper, 1984); la mayoría de las especies *Rhizopus* son descomponedores y se alimentan de materia orgánica muerta, diversos miembros son usados comúnmente en procesos industriales como por ejemplo *Rhizopus oryzae* W. es usado para la producción de ácido láctico y cortisona, entre otros usos; *Rhizopus stolonifer* V. para la producción de ácido fumárico (Petruzzello, 2016).

Los hongos *Rhizopus* se encuentran en el suelo, o de igual manera pueden ser aislados de individuos con mucormicosis, además algunas de ellas provocan que se pudran frutas como la fresa y el melocotón y otras se usan para procesos industriales (Cepero, Retrepo, Franco, Cárdenas & Vargas, 2012). Esta especie se diferencia de las otras debido a que no es septado y produce esporangiosporas, tiene un crecimiento muy veloz y extenso el cual tiene micelios blancos y esporangios negros. En la figura 3 se observa que estas especies tienen rizoides en la base de los esporangióforos y columelas en el esporangio (Bullerman, 2003).



Figura 3. Esporangiosporas típicas de *Rhizopus* y otros mucoraceos.

Fuente: (Bullerman, 2003: p. 5518).

Los esporangios nacen de esporangióforos apofisados, son globosos a subglobosos, luego de ser dispersadas las esporas, las columelas se rompen y adquieren forma de paraguas como se observa en la figura 4, las esporangiosporas son ovaladas con la superficie surcada; además, estas especies pueden mostrar clamidosporas, la mayoría de estas son heterotáticas; las células suspensoras son similares en las especies heterotáticas (Cepero *et al.*, 2012).

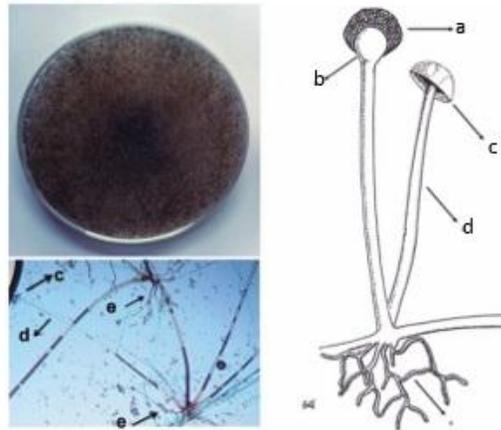


Figura 4. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de *Rhizopus sp.*: a) esporangio, b) columela, c) columela colapsada, d) esporangióforo, e) rizoides.

Fuente: (Cepero *et al.*, 2012: p. 341).

2.5.1 *Rhizopus stolonifer* V.

La especie de *Rhizopus stolonifer* V. es considerada la más importante en el género *Rhizopus*, es el más común y de crecimiento rápido en el *phylum* fúngico *Zygomycota*; desempeña un rol importante en el ciclo del carbono gracias a su trabajo como descomponedor en tierra, estiércol y alimentos desechados (Bautista, Bosquez & Barrera, 2014).

Rhizopus stolonifer V. es un hongo fitopatógeno que crece en diferentes temperaturas y humedades, coloniza productos agrícolas y provoca pudrición blanda es decir, este hongo es el principal en causar enfermedades postcosecha en hortalizas y frutas (Velázquez, Bautista,

Hernández, Guerra & Amora, 2008), la enfermedad más grave es la podredumbre húmeda que agrede a frutos en estado de madurez (Reinoso, 2017).

Este hongo filamentoso muestra esporangióforos sin ramificar, esporangios esféricos negros con columela, esporangiosporas negras, abundantes rizoides y zigosporas, no posee clamidosporas; pues, se encuentra distribuido en todo el mundo y tiene una temperatura de crecimiento de 10 a 33 °C, con una temperatura ideal de 25 °C, además, es fácil encontrarlos debido a sus espolones grises, sus rizoides pardos y sus negros esporangios; se ubican frecuentemente en suelos con arena, compost, estiércol, varios frutos, entre otros (Pontón, Moragues, Gené, Guarro & Quindós, 2002).

2.5.2 Clasificación taxonómica de *Rhizopus stolonifer* V.

La clasificación taxonómica del hongo *Rhizopus stolonifer* V. se muestra en la tabla 3:

Tabla 3
Taxonomía de *Rhizopus stolonifer* V.

Taxonomía <i>R. Stolonifer</i> V.	
Reino	Fungi
Phylum	Zygomycota
Clase	Zygomycetes
Orden	Mucorales
Familia	Mucoraceae
Género	<i>Rhizopus</i>
Especie	<i>Rhizopus Stolonifer</i>

Fuente: sintetizado de (Cepero et al., 2012); (Reinoso, 2017)

La parte bibliográfica es necesaria para poder llevar a cabo las siguientes etapas de esta investigación, ya que brinda los conocimientos necesarios para ponerlos en práctica en la parte experimental.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se divide en cuatro etapas de desarrollo: el aislamiento de la cepa fúngica, preparación de medio nutritivo con bagazo de caña, proceso de fermentación y cuantificación de ácido fumárico.

El presente trabajo de titulación de tipo investigativo – experimental se desarrolló en los Laboratorios de Ciencias de la Vida, en el área de Biología, Química II y Cromatografía, de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede Cuenca. El bagazo fue obtenido de la finca del señor Jorge Quirola ubicada en La Palmira de la ciudad de Loja, y la cepa de *Rhizopus stolonifer* V. fue aislada de tejido contaminado de frutilla.

3.1 Procedimiento

3.1.1 Aislamiento del hongo *Rhizopus stolonifer* V. a partir de frutillas contaminadas - *Fragaria* sp.-

3.1.1.1 Recolección de muestras de frutillas

Las frutillas se compraron en el mercado de la Feria Libre de la ciudad de Cuenca, provincia del Azuay, se utilizó una libra de frutillas *-Fragaria sp.-*, las cuales fueron sometidas a un proceso de lavado, desinfección y secado, como se puede observar en la figura 5; se almacenaron en una funda plástica negra por cuatro días, cada 24 horas se observó si existía la presencia de hongo sobre la frutilla; transcurrido este tiempo se llevaron al laboratorio para su posterior uso (Fraire, Yáñez, Nieto & Vásquez, 2003).



Figura 5. Frutillas desinfectadas para su almacenamiento en funda plástica negra.

Fuente: Autora.

3.1.1.2 Aislamiento del hongo filamentoso en condiciones de laboratorio

Rhizopus stolonifer V. se aisló a partir de tejido vegetal contaminado de frutilla –*Fragaria sp.*-, se realizaron cortes del tejido contaminado con un bisturí y se lavaron con agua destilada; se colocaron cinco pedazos de tejido contaminado dentro de las cajas Petri con medio de cultivo PDA previamente preparado -figura 6- y se incubaron las placas a 26 °C por un tiempo de cuatro días (Fraire *et al.*, 2003).

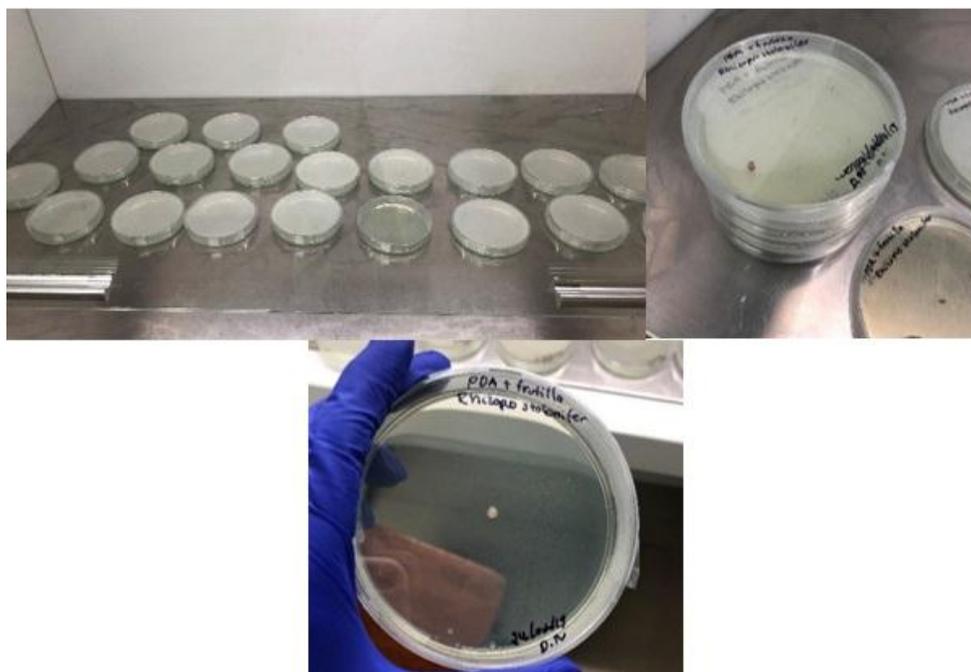


Figura 6. Cajas Petri con medio PDA y pedazos de tejido contaminado

Fuente: Autora.

Para la identificación del hongo, se tomó una impronta de muestra con cinta adhesiva y se colocó en portaobjetos que contenía una gota de KOH y azul de lactofenol sobre el mismo -figura 7- y las placas con las muestras se llevaron a un microscopio para su identificación; una vez que se confirmó la identidad del patógeno se realizaron subcultivos hasta obtener una cepa axénica, estos subcultivos se realizaron por medio de saca bocado en cajas Petri con PDA y se incubaron a la misma temperatura de 26 °C por dos días (Plascencia *et al.*, 2012).



Figura 7. Impronta de muestras con cinta adhesiva colocadas en KOH y azul de lactofenol

Fuente: Autora.

La metodología utilizada para la obtención de cultivos puros fue de Zhang, Yuang y Cai (2013), para facilitar el lavado de esporas se realizó una resiembra en un matraz, como se observa en la figura 8, y se incubó a la misma temperatura por un tiempo de siete días, después de este tiempo hubo esporulación de micelio como se observa en la figura 9a; una vez esterilizado el material a ser utilizado, se dibujaron cuadrículas de un centímetro de lado sobre cajas Petri previamente preparadas con PDA -figura 9b-, y se realizaron tres lavados de esporas con 10 mL de suero fisiológico, se filtraron con gasas estériles y se colocaron en tubos de ensayo -figura 9c-; seguidamente, se tomó con una micropipeta la suspensión obtenida y se colocó una gota en cada cuadrado -figura 9d-, y se incubaron a 26 °C por cuatro horas, transcurridas las cuatro horas se observó bajo un estereoscopio el desarrollo de

estructuras en cada cuadrícula -figura 10-; finalmente, con el bisturí se extrajo una parte de las estructuras germinadas y se colocaron en cajas Petri preparadas previamente con PDA.



Figura 8. Caja Petri con *Rhizopus stolonifer* V. para su resiembra en matraces

Fuente: Autora.

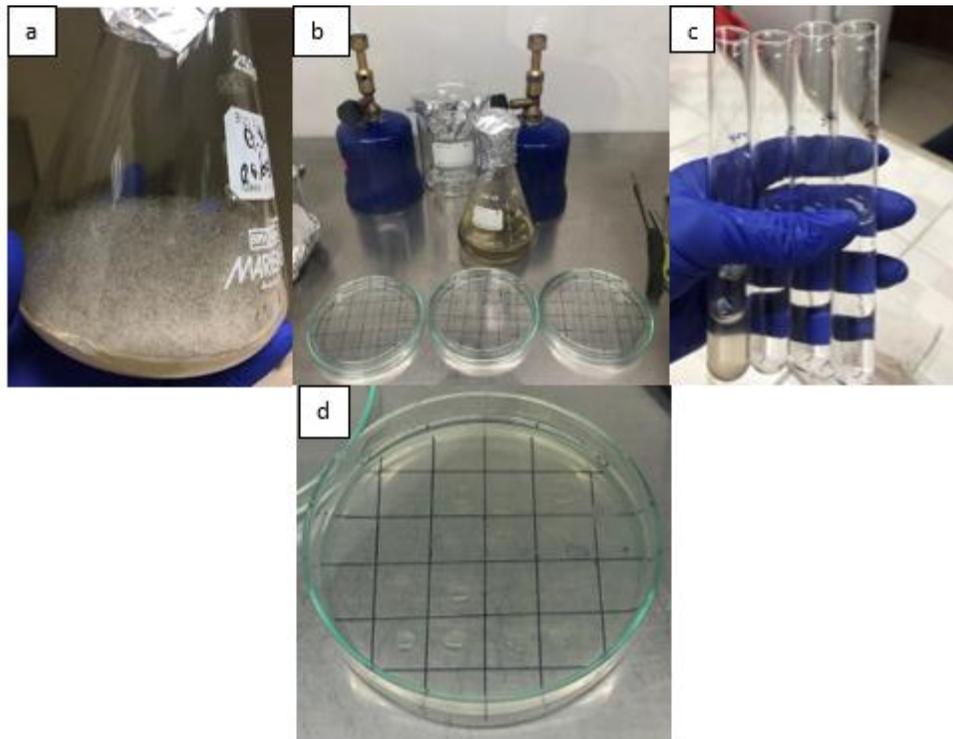


Figura 9. a) Micelio esporulado, b) Cuadrículas en cajas Petri, c) Tubos de ensayo con suspensión de lavado de esporas, d) Gotas del lavado en cada cuadrícula

Fuente: Autora.



Figura 10. Crecimiento de estructura transcurridas cuatro horas

Fuente: Autora.

Luego de 48 horas de incubación a 26 °C se realizó la caracterización morfológica de manera macroscópica y microscópica. La caracterización se llevó a cabo por medio de claves taxonómicas en donde se tomaron en cuenta los siguientes caracteres: presencia de rizoides; largo, ancho y rectitud de los esporangióforos; diámetro, forma y color del esporangio; tamaño y forma de la columela; color forma y tamaño de las esporangiosporas, color del reverso de la caja.

Los materiales y reactivos utilizados se muestran en la tabla 4:

Tabla 4

Equipos, materiales y reactivos para el aislamiento del hongo Rhizopus stolonifer

Equipos	Materiales	Reactivos
Autoclave	Asa de inoculación	Agua destilada
Cámara de flujo laminar	Bisturí	Azul de lactofenol
Esteriomicroscopio	Cajas Petri	Hidróxido de potasio
Estufa	Cubre y portaobjetos	Suero fisiológico
Hornilla	Gasa estéril	
Micropipetas	Matraces Erlenmeyer	
Cámara de Neubauer	Mecheros	
	Tubos de ensayo	

Fuente: Autora.

3.2 Elaboración de medio nutritivo con bagazo de caña

3.2.1 Pretratamiento del bagazo de caña

El bagazo de caña se recolectó de La Palmira, y se trajo a la ciudad de Cuenca, se colocó al bagazo en una tina grande con agua para retirar las impurezas presentes -figura 11a- y se trituró el bagazo de caña, como menciona Bhutto *et al.* (2017), con la finalidad de aumentar la superficie de área del material y reducir la cristalinidad de la celulosa. Se utilizó la picadora mecánica que tiene la Universidad Politécnica Salesiana en Paute –figura 11 b y c-.



Figura 11. a) Lavado del bagazo de caña con agua, b) Picadora mecánica de la Universidad Politécnica Salesiana, c) Trituración del bagazo

Fuente: Autora.

El bagazo se colocó sobre cartón exponiéndolo al sol y removiéndolo cada hora para que su proceso de secado sea de manera rápida. Pasada una semana se llevó el bagazo seco al laboratorio PGWOOD ubicado en las instalaciones de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede Cuenca. Este laboratorio está a cargo de los ingenieros Luis López y Jorge Fajardo

quienes facilitaron los equipos necesarios para triturar el bagazo de caña y posteriormente su tamizado. Los equipos utilizados fueron la trituradora con malla de 2 mm, figura 12, y la tamizadora con los diferentes números de tamices para su clasificación -figura 13-



Figura 12. Trituradora Retsch SM 100 y malla 2mm

Fuente: Autora.



Figura 13. Tamizado en tamizadora Retsch AS 200

Fuente: Autora.

3.2.2 Hidrólisis ácida

Para la hidrólisis del bagazo de caña se basó en la metodología utilizada por Medina y Mantilla (2012), se preparó 300 mL de ácido sulfúrico al 2% en vasos de precipitación; el baño térmico se encendió y reguló a una temperatura de 55 °C; una vez alcanzada esta

temperatura se colocaron los vasos de precipitación para que alcancen la misma temperatura del baño térmico controlado con ayuda de un termómetro, figura 14; después, se utilizó papel aluminio para pesar 10 gramos de bagazo que se colocaron dentro de los vasos de precipitación y se agitó constantemente por un tiempo de 90 minutos, figura 15; seguidamente se enfrió a base de baño maría y por último, se utilizó papel filtro y un kitasato con bomba al vacío para filtrado, figura 16, al líquido resultante se ajustó el pH a 5.0 con una solución de hidróxido de sodio 3M, figura 17, ya que como menciona Žnidaršič, Komel y Pavko (2000) es el pH óptimo en fermentación sumergida.

Una vez ajustado el pH, se determinó la presencia de azúcares reductores por medio de pruebas cualitativas y cuantitativas por el método de Fehling, figura 18^a, en cuanto a la prueba cualitativa, se colocó en un tubo de ensayo 1mL de reactivo de Fehling A, 1mL de reactivo de Fehling B y 1mL de filtrado; en un vaso de precipitación se colocó agua y se calentó hasta ebullición, con ayuda de una pinza se tomó el tubo de ensayo y se puso dentro del vaso, figura 18b, hasta el viraje de color azul a rojo ladrillo o pardo.

Para la prueba cualitativa se utilizó la metodología de Concha (2014), se coloca en una bureta el filtrado obtenido, posteriormente se agregan 10 mL de Fehling A, 10 mL de Fehling B y 25 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 100 mL sometiéndolo a calor hasta ebullición constante, figura 18b; luego se deja caer gota a gota la muestra sobre el matraz hasta viraje de color azul a color rojo ladrillo o pardo y finalmente, se anota el volumen gastado de filtrado y se aplica en las fórmulas de cuantificación de azúcares reductores mencionadas en la sección 4.2.1.



Figura 14. Control de temperatura del ácido en el baño térmico

Fuente: Autora.



Figura 15. Bagazo de caña en papel aluminio para pesaje y colocación en el ácido

Fuente: Autora.



Figura 16. Filtrado de hidrólisis ácida de bagazo de caña

Fuente: Autora.

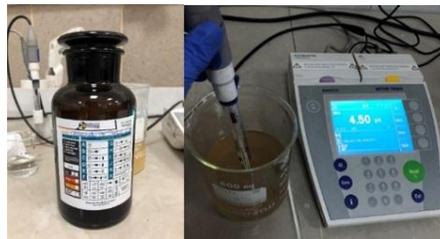


Figura 17. Ajuste de pH a 5.0 con hidróxido de sodio

Fuente: Autora.

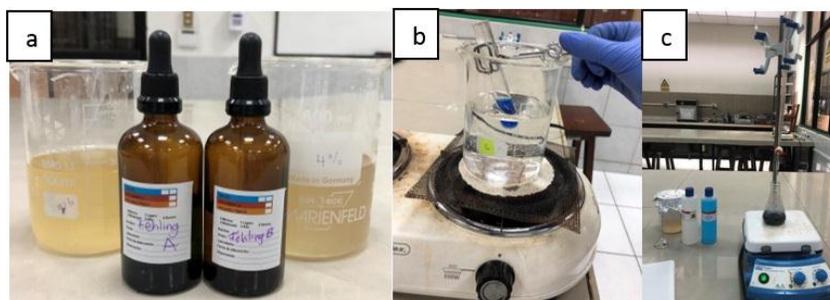


Figura 18. a) Reactivo de fehling A y B, b) Tubo con reactivos y muestra en ebullición, c) Titulación de la muestra para prueba cuantitativa

Fuente: Autora.

3.2.3 Formulación del medio nutritivo

Se basó en la metodología de Foster y Waksman (1939) con una modificación, en vez de sulfato férrico se utilizó cloruro férrico debido a que no se disponía del mismo, tal modificación se basó en el artículo de Yang *et al.* (2011); la formulación utilizada se muestra en la tabla 5:

Tabla 5
Formulación del medio con nutrientes

Componente	Cantidad
$(NH_4)_2SO_4$	2.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.625 g
K_2HPO_4	0.625 g
Fe_3Cl	0.0075 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.00625 g

Fuente: Autora.

3.2.4 Fermentación en matraces

3.2.4.1 Preparación del inóculo fúngico

Para facilitar el lavado de esporas para obtener el inóculo fúngico, se resembró el hongo en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se lo incubó por siete días a 26°C.

La suspensión se preparó lavando el cultivo tres veces con 10 mL de suero fisiológico estéril agitando el matraz vigorosamente para remover la mayor cantidad de esporas posibles y se filtró con gasas estériles; se colocó el lavado en un tubo de ensayo y con una micropipeta se tomaron 10 µL de muestra y se inyectó por el extremo de la cámara para realizar el conteo para obtención de una concentración de 8×10^4 esporas/mL como se menciona en los estudios de Žnidaršič *et al.* (2000) y Zhang (2012); la fórmula utilizada para el conteo de esporas se muestra en el Anexo II.

3.2.4.2 Preparación de los medios para fermentación

Se realizaron dos tipos de fermentaciones por triplicado en matraces de 250 mL, tabla 6, cada matraz fue cubierto con tapones de algodón y gasa estéril para evitar la contaminación permitiendo el paso de aire necesario, figura 19:

Tabla 6
Suplementación de medios para Fermentación Sumergida

Matraz	Suplementación	Cantidad
A	Hidrólisis de bagazo al 2%	40 mL
	Inóculo	2 mL
B	Hidrólisis de bagazo al 2%	40 mL
	Medio nutritivo	60 mL
	Inóculo	2 mL

Fuente: Autora.

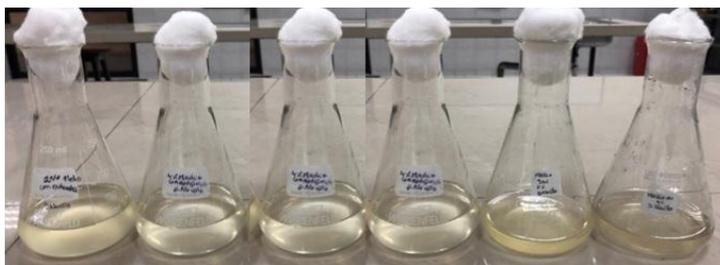


Figura 19. Matraces con inóculo, con y sin medio nutritivo listos para la fermentación

Fuente: Autora.

Las condiciones para la fermentación en el agitador orbital se basaron en el estudio de (Giraldo, 2013), dichas condiciones fueron velocidad de agitación de 130 rpm, temperatura de 24 °C por un tiempo de 6 días; la metodología utilizada para el análisis de la muestra se describe en la sección 3.3.

3.2.5 Fermentación en Biorreactor

Se replicó el medio que obtuvo un mejor rendimiento de ácido fumárico, realizando un escalado a 2000 mL, se realizó nuevamente la hidrólisis ácida, figura 20, en un matraz 2000 mL y se ajustó el pH; previamente a cargar la muestra, el biorreactor se esterilizó en una autoclave y los diferentes accesorios se limpiaron con agua destilada, por otro lado, la inoculación del medio se realizó en una cámara de flujo laminar para evitar contaminación y se llevó al laboratorio para colocarlo dentro del biorreactor, figura 21; se establecieron los mismos parámetros que se dieron para el agitador orbital, con la modificación de que en el biorreactor se aplicó oxígeno disuelto a 0.25 L de aire/minuto, figura 22, y se utilizó el método de análisis mencionado anteriormente.

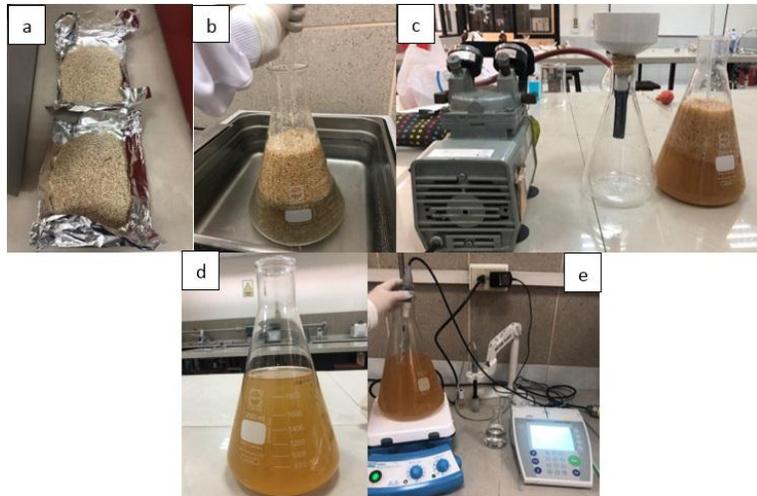


Figura 20. Proceso de hidrólisis ácida de bagazo de caña: a) Bagazo en papel de aluminio, b) Bagazo con ácido en baño maría, c) Proceso de filtrado, d) Filtrado resultante, e) Ajuste de pH

Fuente: Autora.



Figura 21. Biorreactor LAMBDA MININOFR de 3 L cargado con el medio preparado

Fuente: Autora.

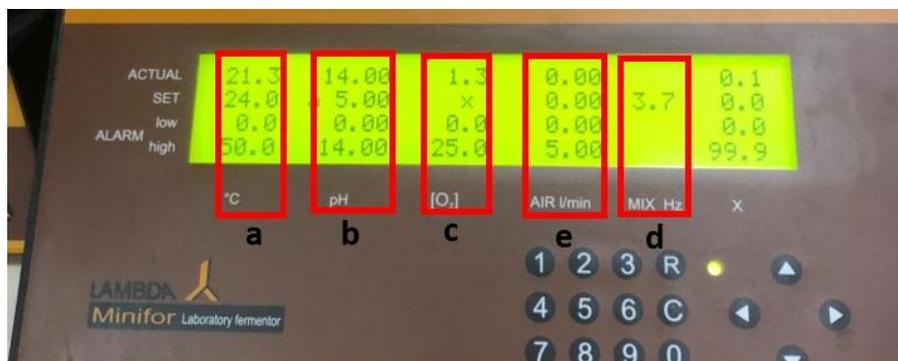


Figura 22. Parámetros: a) Temperatura, b) pH, c) Oxígeno, d) Aire L/min, d) Agitación

Fuente: Autora.

3.3 Método de análisis

Luego del tiempo determinado, el método de análisis que se llevó a cabo se basó en el estudio de Shui y Leong (2002), se analizó por cromatografía líquida de alta resolución utilizando el HPLC Breeze QS marca Waters modelo 1525, figura 23, luego se preparó el solvente A con 295 mL de agua desionizada a la que se ajustó un pH de 2.5 con 5 mL de ácido sulfúrico y 400 mL de metanol HPLC como solvente B; previamente a ser utilizados por el equipo, cada solvente fue filtrado, figura 24a, y desgasificado con el desgasificador de la marca Fisher Scientific modelo FS20D, figura 24b, por consiguiente, se creó un método isocrático preparando una solución 80-20, es decir 80% de agua acidificada y 20% de metanol, para esto se utilizó un balón de aforo de 25 mL y se colocó 20 mL de agua acidificada y 5 mL de metanol; así pues, se preparó el estándar de ácido fumárico preparando 0.2 µg de ácido fumárico en 100 mL de agua acidificada; para hacer la curva de calibración del ácido fumárico, se preparó soluciones de 5, 20, 50 y 100 ppm y por último, se tomaron dos muestras por cada fermentación, estas muestras se ajustaron a un pH de 2.5 con HCl 1N, posteriormente fueron filtradas utilizando un filtro de 0.45 µm y colocadas en un vial, figura 25, las condiciones para llevar a cabo la corrida de las muestras se ilustran en la tabla 7:

Tabla 7
Condiciones para HPLC

Parámetros para HPLC	
Longitud de onda de detección	214 nm
Detector	PDA
Columna	C ₁₈
Temperatura de la columna	40 °C

Fuente: Autora.



Figura 23. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC Breeze QS Waters 1525)

Fuente: Autora.

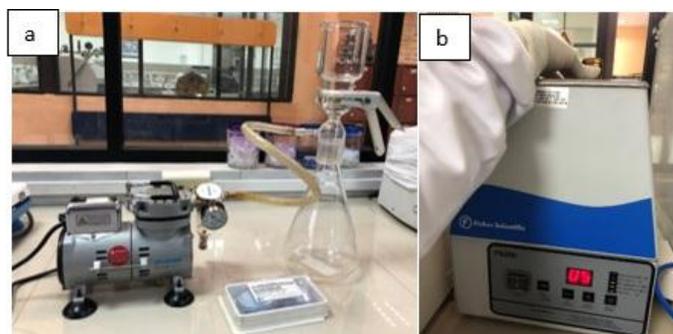


Figura 24. a) Filtrado de los solventes A y B, b) Desgasificador Fisher Scientific FS20D

Fuente: Autora.

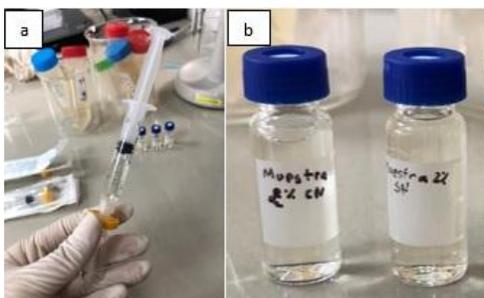


Figura 25. a) Filtro de 45 μm para filtrado, b) Viales con diferentes muestras

Fuente: Autora.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento y caracterización de *Rhizopus stolonifer*

4.1.1 Identificación macroscópica en frutilla

El tejido contaminado de frutilla presentó un color café -figura 26a- con presencia de micelio algodonoso de color blanco –figura 26b- y puntuaciones negras como lo menciona Farrera, Zambrano y Ortiz (2007). De los mismos se obtuvieron los aislados.

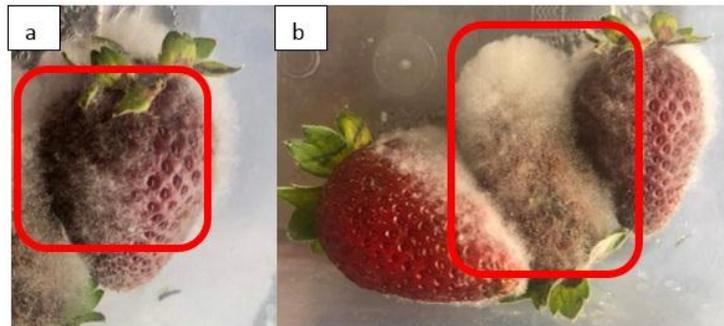


Figura 26. Tejido de frutilla contaminado: a) Color café característico de contaminación, b) Micelio algodonoso de color blanco

Fuente: Autora.

4.1.2 Caracterización de la colonia identificada como *Rhizopus stolonifer* V.

Al supuesto cultivo identificado como *Rhizopus stolonifer* V. se lo caracterizó mediante claves taxonómicas basadas en aspectos tanto macroscópicos como microscópicos.

4.1.2.1 Características macroscópicas de la cepa fúngica

La caracterización macroscópica se la realizó de manera visual de las estructuras y rasgos que presentaba la colonia, como menciona Pontón *et al.* (2002), la coloración de las colonias va de blanco en un inicio, figura 27, figura 28 a y b, a gris oscuro en su maduración, y un color ligeramente pardo oscuro en la parte posterior, figura 28c; cubierta la superficie con

denso micelio aéreo, de tipo algodónoso, en su punta esporangios de color negro, figura 29. La velocidad de crecimiento fue rápida, a las 24 horas ya había un gran crecimiento de la colonia y a los tres días se alcanzó total crecimiento como se menciona en el estudio.

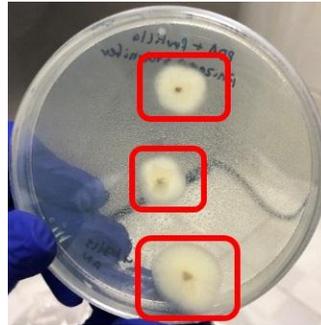


Figura 27. Color blanco de las colonias en primeros estadios

Fuente: Autora.

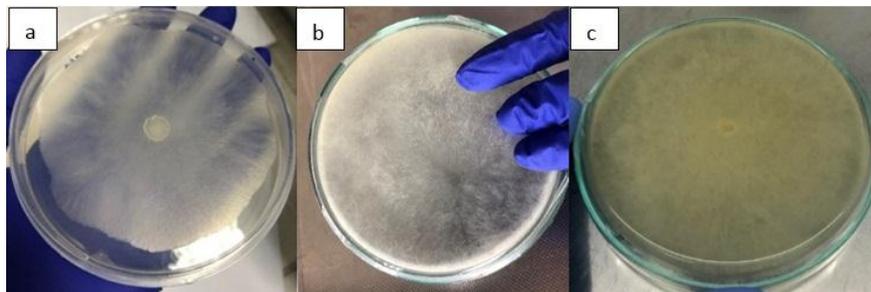


Figura 28. a) Desarrollo de la colonia b) Parte posterior de la cepa presenta un color blanco en primeros estadios, c) En su madurez color gris

Fuente: Autora.



Figura 29. Abundante micelio cubriendo la caja con medio PDA. Micelio aéreo con esporangios negros

Fuente: Autora.

4.1.2.2 Características microscópicas de la cepa fúngica

Este tipo de hongo se reconoce fácilmente por sus estolones hialinos o parduzcos, sus rizoides numerosos y sus esporangios negros. Además de estas características, se establecieron otros parámetros en base a los estudios realizados de Schipper (1984); Zheng, Chen, Huang y Liu (2007); Velázquez *et al.* (2008). Se utilizaron los estudios mencionados anteriormente y se elaboró la tabla 8 en donde se registran las diferentes características microscópicas de la cepa en estudio.

Tabla 8
Características microscópicas de *Rhizopus stolonifer* V.

Estructura	Claves de identificación	Colonia en PDA a 26 °C
Colonia	Color	Gris oscuro
	Altura	6-12 mm
	Micelio	Micelio aéreo firmemente
Estolones	Desarrollo	Bien desarrollados
Rizoides	Desarrollo	Bien desarrollados
Esporangióforos	Número por grupo	2-5
	Longitud	Dentro de los 2500 μm
	Ancho	Dentro de los 35 μm
	Septación	Aseptado
Esporangio	Diámetro	Menos de 220 μm
Columela	Forma	Globosa o subglobosa, cónico redondeado.
	Tamaño	Menos de 210 x menos de 190 μm
	Diámetro	Menos de 190 μm
Esporangiosporas	Forma	Ovalada, globosa, subglobosa
	Estriación	Bastante evidente
	Tamaño	5- 12.5 μm de largo

Fuente: Autora.

Se observaron rizoides numerosos y bien desarrollados, figura 30; estolones hialinos de donde se desarrollan los esporangióforos, figura 31, tales características se mencionan en el estudio de Bautista *et al.* (2014).



Figura 30. Presencia de numerosos rizoides bien desarrollados

Fuente: Autora.



Figura 31. Estolón hialino y bien desarrollado

Fuente: Autora.

Esporangióforos: se observó su desarrollo desde estolones, figura 32a, largos, rectos, hialinos, no septados, figura 32b; en su caracterización también se observó que algunos se

encontraban solos, figura 33a; grupos de dos, figura 33b; y hasta de tres por grupo, figura 33c; de igual manera, de la muestra de 10 esporangióforos se sacó un promedio y se obtuvo un diámetro de 14.87 μm , encontrándose dentro del rango de 35 μm que mencionan Zheng *et al.* (2007) en su estudio. Así mismo se sacó un promedio para saber el largo, de donde se obtuvo 1162 μm , lo que significa que está dentro del rango de 2500 μm que menciona Schipper (1984) en su estudio.



Figura 32. a) Desarrollo de esporangióforo desde estolón, b) hialino, no septado, recto, largo.

Fuente: Autora.

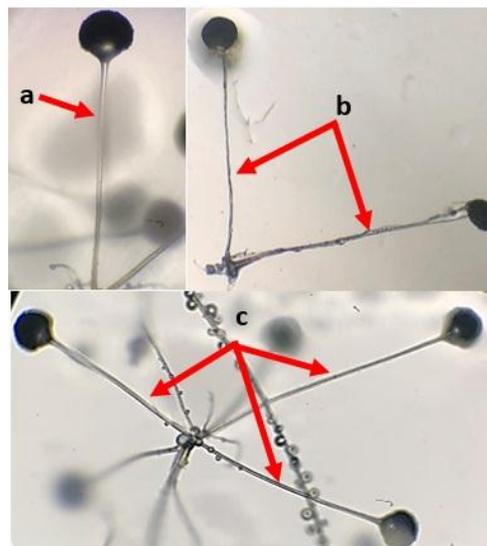


Figura 33. Esporangióforo: a) Solo, b) Dos, c) Grupo de tres

Fuente: Autora.

Esporangio: la forma globosa, figura 34^a, y subglobosa, figura 34^b, de color café en inicios de desarrollo y luego un color negro coinciden con el estudio de Zheng *et al.* (2007), mientras que para el tamaño se utilizó una muestra de 10 esporangios para obtener los promedios, teniendo como resultado que el tamaño se encontró en 157.75 μm , es decir que se encuentra en el rango mencionado en el estudio de Schipper (1984).

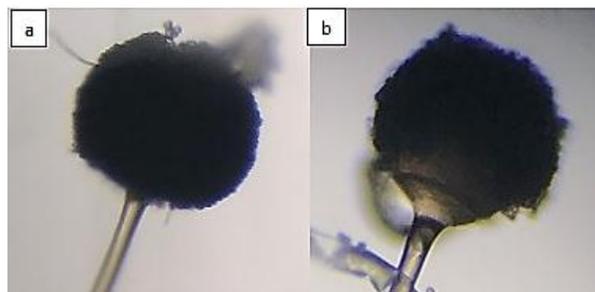


Figura 34. Forma de esporangio: a) globoso, b) subgloboso, ambos multiesporados de color negro

Fuente: Autora.

Columela: en los primeros días se observaron formas globosas, figura 35a a subglobosas, figura 35b, con un color café claro, mientras que, en los estados de maduración, se observó a la columela dentro del esporangio, figura 35c. Se observó también una columela con forma de “sombrero chino” lo que indica que ha colapsado y que ha desaparecido el esporangio, Figura 35d. Se tomaron 10 muestras de columelas para sacar un promedio del tamaño y diámetro, se obtuvo un promedio de 135.73 μm y un diámetro menor a 190 μm , figura 35e. Las medidas del tamaño y diámetro se encuentran dentro del rango que menciona Zheng *et al.* (2007) al igual que las demás características mencionadas anteriormente.

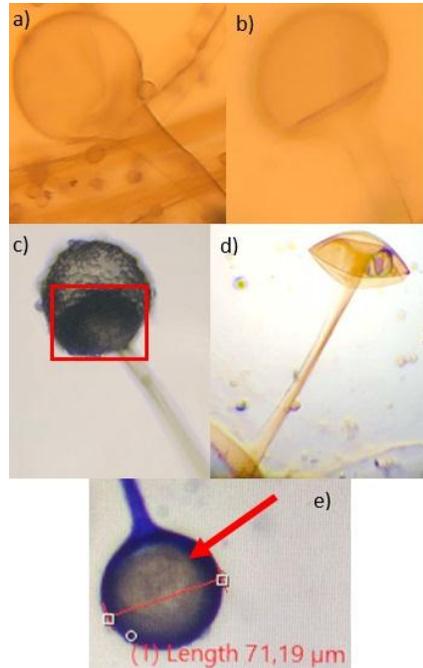


Figura 35. Columela: a) Globosa, b) Subglobosa, c) Columela dentro de esporangio, d) “Sombrero chino”, e) Uno de los diámetros tomados para sacar promedio

Fuente: Autora.

Esporangiosporas: oscuras, globosas a subglobosas y ovaladas, figura 36, poca estriación, se tomaron 10 esporas de muestra para sacar un promedio de su tamaño, el resultado obtenido fue de 10.36 μm lo que nos indica que está dentro del rango establecido en su caracterización. Dichas características se evidencian en el estudio de Zheng *et al.* (2007).



Figura 36. Esporangiosporas fuera del esporangio, formas globosas, subglobosas y ovaladas

Fuente: Autora.

Basándose en los análisis macroscópicos y microscópicos, así también como la bibliografía revisada, se identificó a la cepa encontrada como *Rhizopus stolonifer* V.

4.2 Formulación de medios de cultivo mediante bagazo de caña con y sin suplementos nutritivos para fermentación en matraces y biorreactor

4.2.1 Cuantificación de azúcares reductores

En la titulación de la glucosa para sacar el título de Fehling se observó precipitado rojo y por encima un líquido prácticamente incoloro lo que menciona el estudio de Medina y Mantilla (2012), figura 37a. En las pruebas cualitativas y cuantitativas de Fehling se observó en el viraje un color rojo ladrillo como menciona Concha (2014), figura 37 b y c.

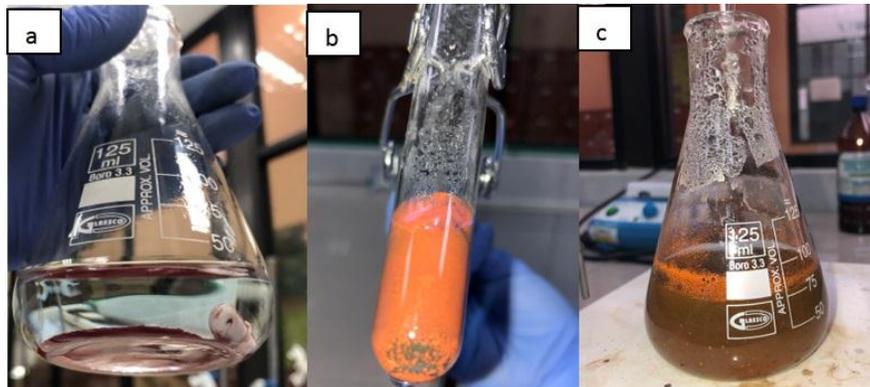


Figura 37. a) Líquido incoloro sobre precipitado, b y c) Viraje de color rojo ladrillo

Fuente: Autora.

a) Cálculo de título de Fehling

$$\text{Título de Fehling} = \frac{\text{Gasto de azúcar reductor} \times 5}{1000}$$

$$\text{Título de Fehling} = \frac{20 \text{ mL} \times 5}{1000}$$

$$\underline{\underline{\text{Título de Fehling} = 0.1}}$$

b) % de Azúcares reductores

$$\% A. R. = \frac{\text{Título de Fehling}}{\text{Vol. Solución gastada}} \times 100$$

$$\% A. R. = \frac{0.1}{10 \text{ mL}} \times 100$$

$$\% A. R. = \frac{0.1}{15 \text{ mL}} \times 100$$

$$\underline{\% A. R. = 0.66\%}$$

c) Cálculo de azúcares reductores obtenidos en la solución de hidrólisis ácida

$$A. R. = \%A. R. * \text{Volumen solución Final (mL)}$$

$$A. R. = \frac{0.66 \text{ g}}{100 \text{ mL}} \times 285 \text{ mL}$$

$$\underline{A. R. = 1.88 \text{ g}}$$

4.2.2 Fermentación en matraces y biorreactor

Dado que el pH es una de las condiciones más importantes en el proceso de fermentación, los medios fueron ajustados a un pH de 5.0, ya que como explica Guo *et al.* (2020) la acumulación de ácido fumárico a un bajo nivel de pH conduce a los ácidos libres a las células por difusión pasiva, lo que inhibe la biosíntesis del ácido fumárico; además, un pH de bajo nivel conduce a la disminución de la permeabilidad de la membrana celular, lo que provoca la acumulación de ácido fumárico no disociado intracelular y, por lo tanto, conduce a la inhibición del ácido fumárico; a más de reducir la producción de ácido fumárico, el bajo nivel de pH también conduce a altas concentraciones de subproductos que incluyen etanol y glicerol.

En la fermentación en matraces no hubo presencia de *pellets* lo que coincide con el estudio de Foster y Waksman (1939), que menciona que en la fermentación puede existir o no presencia de los mismos.

Para la fermentación en el biorreactor se utilizó oxígeno por seis horas y se dejó de utilizar posteriormente debido a problemas con el equipo, pero las mangueras de aire se las dejó abiertas. En el fermentado se pudo observar presencia de sobrenadantes de *pellets* de color blanco, figura 38, no hubo presencia de los mismos en las paredes del biorreactor lo que coincide con el estudio de Foster y Waksman (1939), y con el estudio de Martín-Domínguez *et al.* (2018) en donde se menciona que, para este proceso industrial se prefiere este tipo de morfología, ya que evita el alto aumento de la viscosidad.



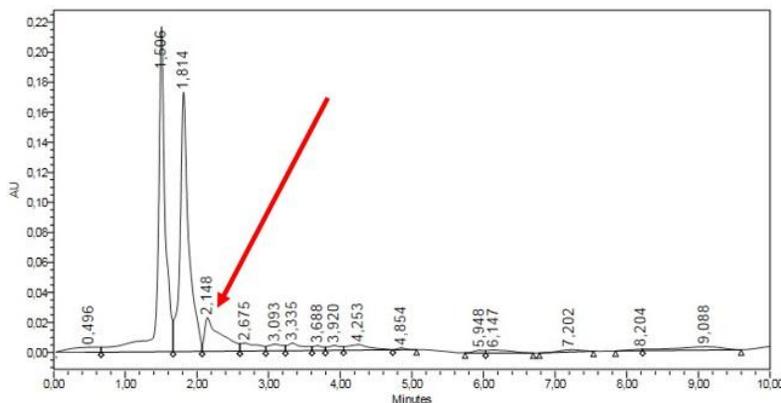
Figura 38. Pellets blanquecinos en fermentado

Fuente: Autora.

4.3 Análisis de las concentraciones obtenidas de ácido fumárico de las distintas fermentaciones por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para elegir las áreas bajo la curva correspondientes al ácido fumárico, se corrió una muestra, se guardó los datos obtenidos, gráfica 1, y se agregó 50 μl de ácido fumárico a la misma para identificar cuál de los picos correspondía al ácido fumárico, y así, determinar en qué tiempo de retención se debían tomar los datos. Teniendo así, que en el tiempo de retención de 2.1 como se puede observar en la -gráfica 2- hubo un crecimiento del pico.

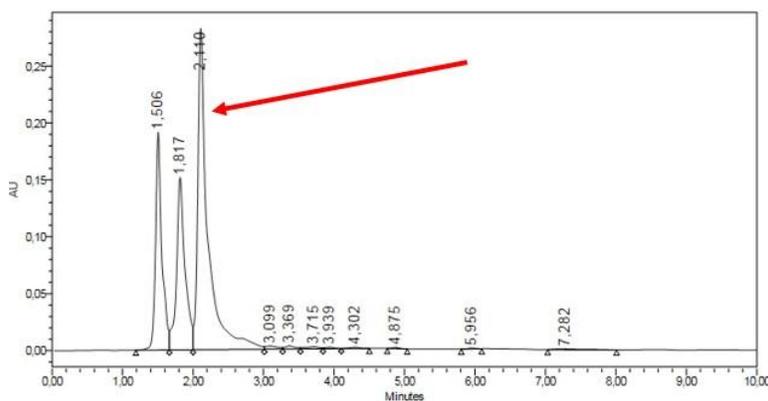
Las áreas bajo la curva tomadas de cada corrida, fueron las que se encontraban en el tiempo de retención 2.1.



	RT	Area	% Area	Height
1	0,496	97493	2,41	3291
2	1,506	1552901	38,35	216506
3	1,814	1448308	35,77	172539
4	2,148	353169	8,72	22355
5	2,675	90575	2,24	5243
6	3,093	61869	1,53	4353
7	3,335	75890	1,87	4967

Gráfica 1. Leve crecimiento de pico en tiempo de retención 2.1.

Fuente: Captura del programa Empower QS.



	RT	Area	% Area	Height
1	1,506	1189885	22,14	191225
2	1,817	1264412	23,53	151067
3	2,110	2777415	51,68	282056
4	3,099	33160	0,62	2731
5	3,369	27407	0,51	2724
6	3,715	26383	0,49	1841
7	3,939	11673	0,22	1296

Gráfica 2. Pico en TR 2.1 correspondiente al ácido fumárico.

Fuente: Captura del programa Empower QS.

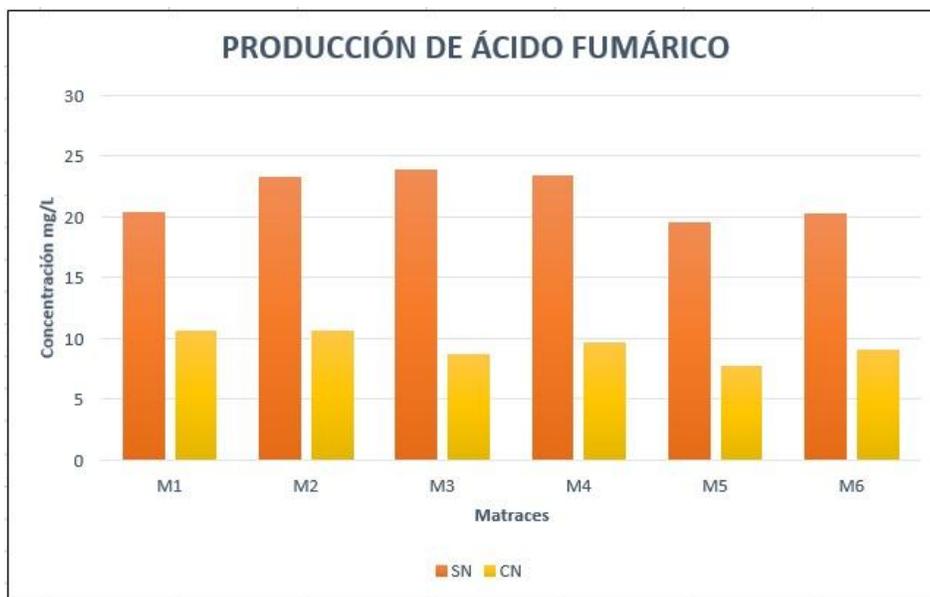
En la tabla 9 se muestran las concentraciones obtenidas de los distintos tratamientos realizados:

Tabla 9
Cálculo en Excel de las concentraciones de cada muestra corrida

Matraces	Tratamiento	Área bajo la curva	Concentración calculada (ppm)
M1	TSN 1	915059,0000	20.4076
	TSN 2	1054354,0000	23.3151
M2	TSN 3	1084089,0000	23.9358
	TSN 4	1056848,0000	23.3672
M3	TSN 5	874804,0000	19.5673
	TSN 6	910603,0000	20.3146
M4	TCN 1	449123,0000	10.6820
	TCN 2	447427,0000	10.6466
M5	TCN 3	353169,0000	8.6791
	TCN 4	403833,0000	9.7366
M6	TCN 5	308430,0000	7.7453
	TCN 6	374801,0000	9.1306

Fuente: Autora

La cepa nativa de *Rhizopus stolonifer* V. biosintetizó ácido fumárico en todos los ensayos realizados como se observa en la gráfica 3, demostrando así, que tiene la capacidad de metabolizar la fuente de carbono encontrada en el bagazo de caña, tanto en los TCN y TSN.



Gráfica 3. Concentraciones de ácido fumárico con *Rhizopus stolonifer* V. en diferentes tratamientos: (SN y CN)

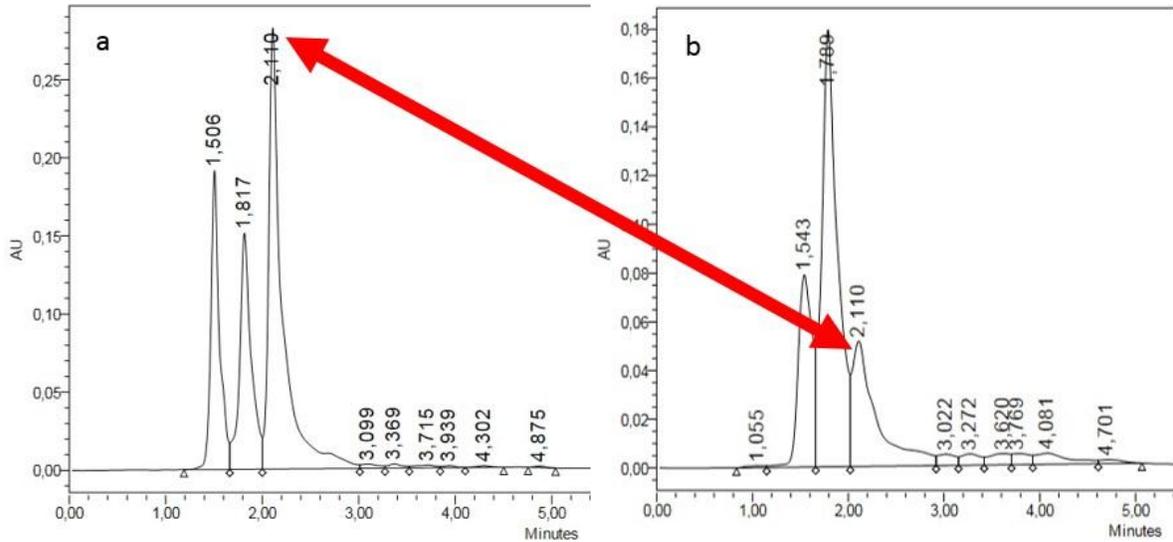
Fuente: Autora.

En la tabla 10 se observan las concentraciones más altas que se obtuvieron de los distintos tratamientos. El medio que mejor rendimiento obtuvo de ácido fumárico fue el matraz 2 que contenía medio compuesto por el 2% de hidrólisis ácida de bagazo de caña, y, el inóculo de *Rhizopus stolonifer* V. sin ningún nutriente. Mientras que, en la gráfica 4 se observa la diferencia de los picos entre estos dos tipos de tratamiento.

Tabla 10
Concentraciones obtenidas con nutrientes y sin nutrientes

Matraz	Tipo de Tratamiento	Concentración obtenida
M2	TSN	23.9358 ppm
M4	TCN	10.6820 ppm

Fuente: Autora.



Gráfica 4. Diferencia de picos entre los dos tipos de tratamientos: a) TSN y b) TCN

Fuente: Captura del programa Empower QS.

Estos resultados también demuestran que la cepa nativa *Rhizopus stolonifer* V. empleada en esta investigación, aprovecha mejor el medio que contiene solo el carbohidrato a comparación de uno con nutrientes.

Con la muestra obtenida del biorreactor se realizó el mismo proceso, se relacionó el promedio de las áreas bajo la curva con la concentración, utilizando la curva de calibración respectiva, tabla 11.

Tabla 11
Concentración obtenida de la fermentación en biorreactor

Tratamiento	Concentración calculada (mg/L)
Muestra	235.5252

Fuente: Autora.

El rendimiento de ácido fumárico a escala de laboratorio fue de 23.9358 mg/L, en un medio sin nutrientes, en comparación al medio con nutrientes en donde se obtuvo 10.6820 mg/L. Como hace referencia Kautola y Linko (1989) y Waksman (1943) en sus investigaciones, la baja concentración obtenida en el medio con nutrientes se debe a la

adición de zinc, así como la de magnesio, cobre y cantidades mutuas de hierro que promueven la conversión del carbono del carbohidrato consumido en sustancia celular, en lugar de permitir que el carbono se acumule en forma de ácido fumárico. También mencionan que la presencia de metales pesados puede afectar la morfología del hongo, mientras que la presencia de fuentes de nitrógeno promueve el crecimiento de la célula con poca acumulación de ácido fumárico.

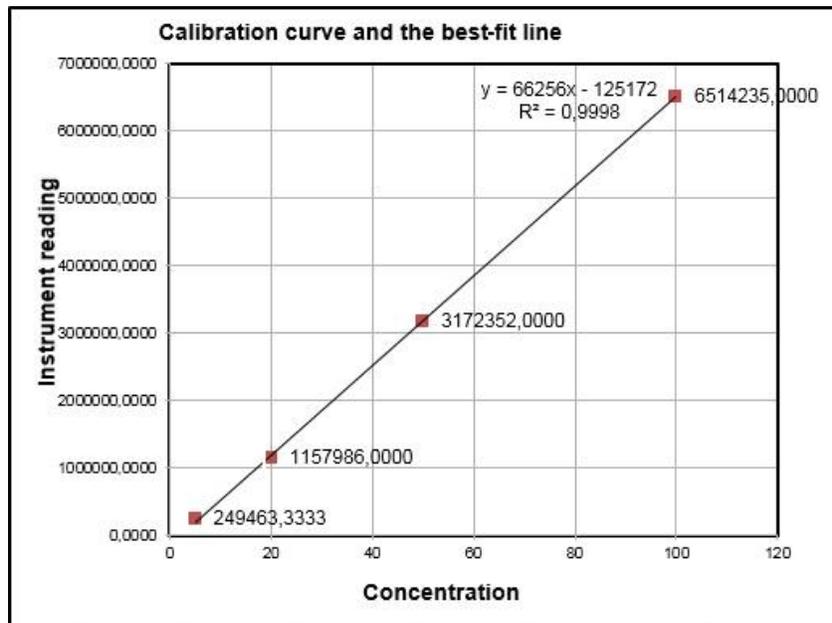
En ausencia de bibliografía explícita sobre el bagazo de caña como sustrato en la fermentación fumárica, se realizó una aproximación con sustratos lignocelulósicos y otros tipos de sustratos. La concentración obtenida a escala de biorreactor se utilizó para la comparación.

La fermentación en biorreactor, realizada con la hidrólisis ácida con 66.66 g de bagazo de caña, en un medio sin nutrientes y con inóculo de *Rhizopus stolonifer* V. produjo un rendimiento de 0.23552 g/L de ácido fumárico. Sin embargo, algunos estudios utilizaron cepas de *Rhizopus* certificadas en medios con nutrientes, por ejemplo, en el estudio de Wojciechowski y Brash (1996) utilizaron astillas de madera explotadas al vapor como sustrato en un medio con nutrientes obteniendo un rendimiento de 0.17 g/L. En el caso de Rodríguez- López, Sánchez, Gómez, Romaní y Parajó (2011), se utilizó hidrolizado enzimático de madera de *Eucalyptus globulus* L., obteniendo un rendimiento de 0.35 g/L. Se comparó también con el estudio de Carta *et al.* (1999), en donde utilizaron hidrolizado de bagazo de yuca y obtuvieron un rendimiento de 0.34 g/L. Xu, Li, Fu, Tai y Huang (2010), utilizaron una cepa mutada, *Rhizopus* ME-F12, junto con la hidrólisis enzimática de paja de elote del que obtuvo un rendimiento de 0.33 g/L. Fang (2018), realizó un estudio con un jarabe lignocelulósico a base de bagazo de caña, una cepa certificada *Rhizopus oryzae* ATCC 20344 y un medio con nutrientes para producción de ácido fumárico del cual obtuvo un

rendimiento de 0.34 g/L. En cuanto a otros tipos de sustratos, Giraldo (2013), utilizó distintos sustratos agrícolas para la obtención de ácido fumárico utilizando *Rhizopus stolonifer* V. y algunos nutrientes como KNO₃, ZnSO₄, en donde obtuvo un buen rendimiento utilizando cáscaras de piña, el rendimiento obtenido fue de 0.258 g/L.

Con base a la extrapolación de los distintos sustratos lignocelulósicos, en comparación al bagazo de caña, se puede hacer una aproximación relativamente certera por lo que la investigación puede ser sostenida con evidencia previa debido a esta correlación.

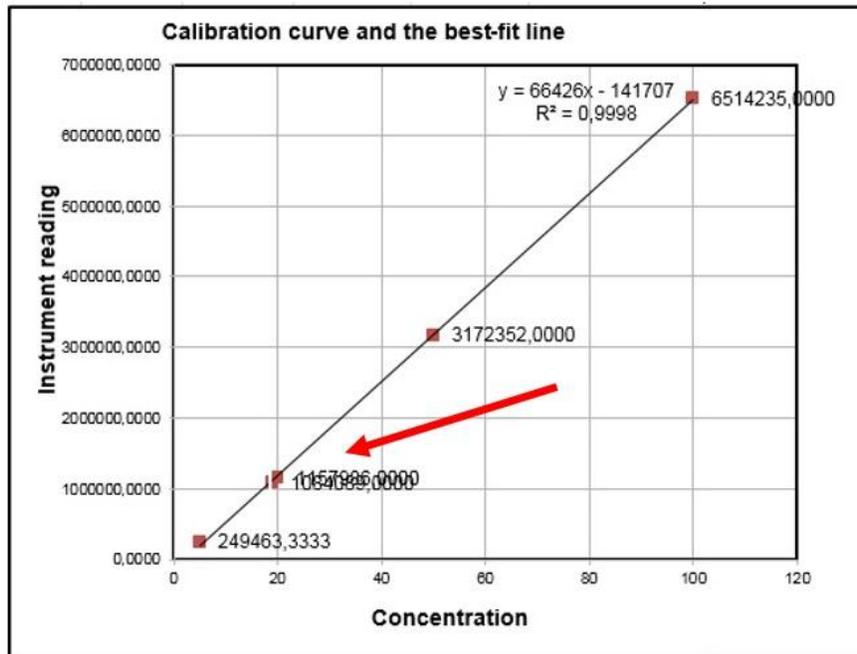
Se realizó una curva de calibración del ácido fumárico con estándares al 5, 20, 50 y 100 ppm, gráfica 5, para encontrar la concentración correspondiente en las muestras.



Gráfica 5. Curva de calibración con estándares 5, 20, 50, 100 ppm de ácido fumárico

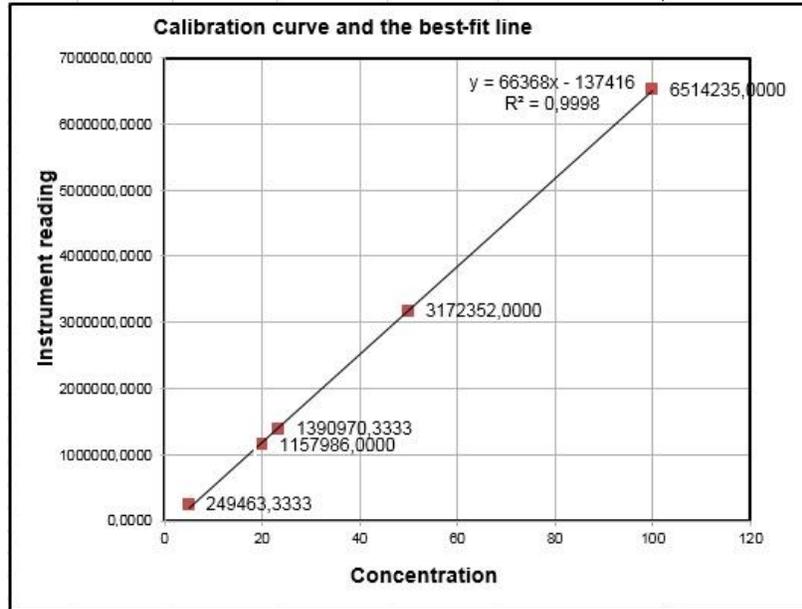
Fuente: Autora.

Como se puede observar en la gráfica 6 y gráfica 7, los datos de la muestra obtenida tanto en matraces como en el biorreactor se encuentran dentro de la curva de calibración, con lo cual se puede calcular la concentración de ácido fumárico producida en el biorreactor, en comparación a la fermentación en matraces.



Gráfica 6. Dato correspondiente a la muestra del matraz con mayor rendimiento de ácido dentro de la curva de calibración

Fuente: Autora.



Gráfica 7. Dato correspondiente a la muestra del fermentado en biorreactor dentro de la curva de calibración

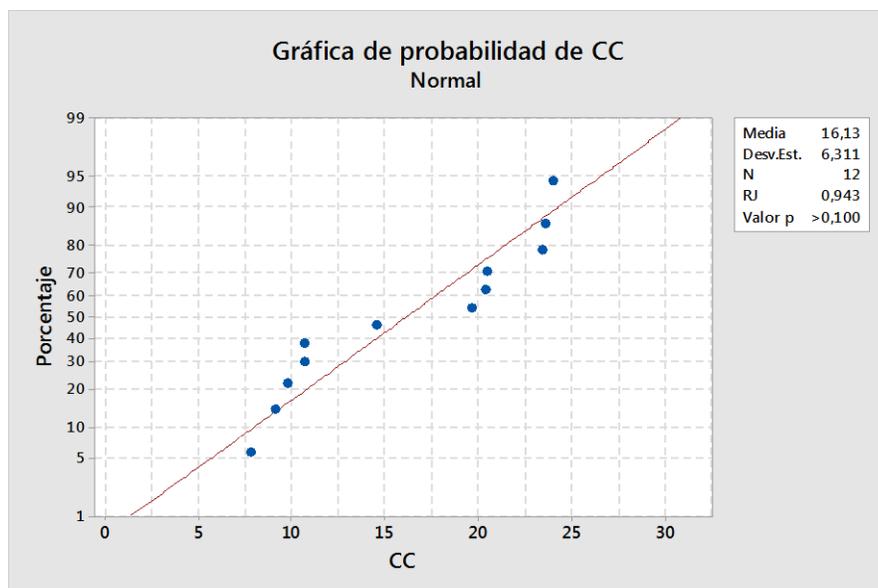
Fuente: Autora.

4.4 Evaluación de las variables de estudio mediante método estadístico ANOVA

Para la comparación de los dos tipos de medios elaborados para determinar la influencia de los nutrientes en el rendimiento de ácido fumárico, se procedió a realizar un análisis de normalidad para posteriormente ejecutar un análisis estadístico ANOVA.

Previo al tratamiento de los datos se aplicó la prueba de Shapiro Wilks para corroborar la validez de los resultados de los distintos tratamientos y determinar si existe el supuesto de normalidad en los datos obtenidos.

En la gráfica 8 se puede observar que el valor $p > 0.100$ obtenido con la prueba de Shapiro Wilks, es mayor al valor de significancia $\alpha = 0.05$, de acuerdo a la Prueba de Normalidad, se dice que si el coeficiente de correlación está cerca de 1, probablemente la población sea normal, por consiguiente, se demuestra el cumplimiento del supuesto de normalidad y se evidencia la existencia de una distribución normal en los resultados. Una vez confirmado que los 12 datos siguen una normalidad se procede a realizar el análisis estadístico ANOVA.



Gráfica 8. Normalidad obtenida mediante el programa estadístico Minitab ®18

Fuente: Autora.

Para el análisis de ANOVA, fueron planteadas las siguientes hipótesis generadas por medio del programa Minitab® 18, tabla 12.

Tabla 12
Planteamiento de hipótesis para ANOVA

Hipótesis	
Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

**Se supuso igualdad de varianzas para el análisis. Fuente: Autora.*

Se define el factor y niveles que se va a tener en el análisis de ANOVA de un factor, en la tabla 13 se detalla la información del factor:

Tabla 13
Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamiento	2	TCN. TSN

Fuente: Autora.

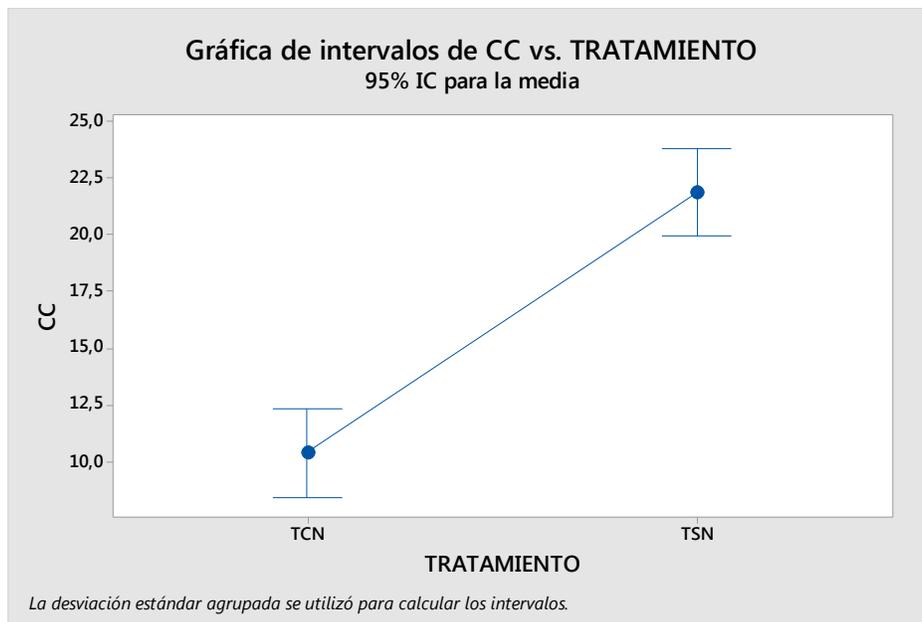
Los resultados obtenidos para el análisis de varianza se encuentran en la tabla 14, en donde se puede observar que el valor obtenido en p 0.000 es menor al grado de significancia $\alpha = 0.05$, por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa que dice que no todas las medias son iguales y se rechaza la hipótesis nula que dice que existe significancia entre los tratamientos.

Tabla 14
Prueba de ANOVA

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	1	393.02	393.025	87.05	0.000
Error	10	45.15	4.515		
Total	11	438.18			

Fuente: Autora.

En la gráfica 9, se puede observar que los TCN y TSN presentan una gran diferencia entre medias [10.407 y 21.853] respectivamente, siendo el tratamiento sin nutrientes, el de mayor rendimiento de ácido fumárico frente al medio con nutrientes.



Gráfica 9. Intervalos de CC vs. Tratamiento

Fuente: Captura tomada del programa Minitab 18®.

En la tabla 15 se detallan la media de los distintos tratamientos:

Tabla 15
Medias de los distintos tratamientos

Tratamiento	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
TCN	6	10.407	2.282	(8.474. 12.340)
TSN	6	21.853	1.955	(19.920. 23.786)

*Desv. Est. Agrupada = 2.12487. Fuente: Autora.

Para los tratamientos se corroboró la existencia de diferencias significativas utilizando el método de Tukey, de manera que se determinó el tratamiento más eficaz para un mejor rendimiento de ácido fumárico.

En la tabla 16 se puede apreciar, con una confianza del 95%, que el TSN posee una diferencia significativa mayor al TCN con una concentración efectiva. Lo que significa que los nutrientes adicionados al medio no tienen influencia en el rendimiento de ácido fumárico.

Tabla 16
Método de Tukey aplicado a los tratamientos para las medias de las cc obtenidas en cada uno

Tratamiento	N	Media	Agrupación
TSN	6	21.853	A
TCN	6	10.407	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Fuente: Autora

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

En búsqueda de alternativas para reducir la dependencia del uso de petróleo para la producción de ácido fumárico, y al mismo tiempo aprovechar los residuos de la industria azucarera del país como principales materias primas, se planteó el aislamiento y utilización de la cepa nativa *Rhizopus stolonifer* V. para la producción de ácido fumárico mediante fermentación sumergida de bagazo de caña.

Una vez culminados los procedimientos para alcanzar los objetivos establecidos y el análisis de los resultados, se obtienen las conclusiones detalladas a continuación:

- A partir de las frutillas la cepa aislada y caracterizada macroscópicamente y microscópicamente, mediante claves taxonómicas corresponde a la especie *Rhizopus stolonifer* V., la cual actúa como biocatalizador por su capacidad de metabolizar los azúcares reductores presentes en la hidrólisis ácida de bagazo de caña.
- El bagazo de caña para ser utilizado en el medio, se lo tiene que someter a un pretratamiento mecánico y a una hidrólisis ácida al 2% de ácido sulfúrico con la finalidad de obtener azúcares reductores. Los medios formulados fueron: el primero conformado por la hidrólisis ácida de bagazo de caña y el inóculo; y el segundo la hidrólisis ácida de bagazo de caña, el inóculo y los nutrientes: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , K_2HPO_4 , Fe_3Cl y ZnSO_4 .
- En el medio sin ningún tipo de nutrientes, *Rhizopus stolonifer* V. obtuvo 23.9358 mg/L de ácido fumárico, teniendo así, un mayor rendimiento en comparación al

medio con nutrientes, por lo que es el medio más apto para la producción de ácido fumárico. El mismo medio replicado a escala de biorreactor obtuvo 235.52 mg/L de ácido fumárico en un tiempo de 6 días.

- En base al análisis estadístico desarrollado se acepta la hipótesis alterna, la cual establece que la adición de nutrientes al medio no influye significativamente en la biosíntesis de ácido fumárico por parte de *R. stolonifer* V. Siendo la condición con mayor significancia el medio sin nutrientes que contenía solo hidrolizado de bagazo de caña y el inóculo.

A más de las conclusiones que tributan a cada objetivo, y considerando como referencia la extensión del trabajo investigativo, se arriba otras conclusiones que apoyan la investigación, tales como:

La alternativa del aprovechamiento del bagazo de caña utilizado como fuente de carbono, hace que la fermentación pueda ser atractiva para la producción de ácido fumárico dado que es económico y más abundante que la glucosa.

El planteamiento de procesos innovadores para la obtención de bioproductos representa un aporte significativo frente a la constante lucha por disminuir el impacto ambiental y la huella de carbono dejada por el ser humano. Se ha visto la consecuencia del uso desmedido de recursos no renovables, lo que representa un desafío, en el que las nuevas generaciones de profesionales deben contar con una formación con profundo compromiso social y ambiental. El proceso presentado en este trabajo representa un aporte a buscar una alternativa para mejorar el uso de recursos y así disminuir el impacto ambiental, dejando tras de nosotros un planeta en mejores condiciones de las que recibimos.

5.2 Recomendaciones

Referente a la cepa aislada de *Rhizopus stolonifer* V. es necesaria una identificación molecular, para caracterizar de mejor manera la cepa y establecer una clave taxonómica específica.

El sustrato de bagazo de caña es muy poco estudiado en procesos fermentativos con *Rhizopus stolonifer* V. para producción de ácido fumárico, por lo que el tipo de pretratamiento, el tipo de hidrólisis y la cantidad de sustrato son variables que influyen en la producción de ácido fumárico y que quedan por investigar.

Otra variable por considerar es el efecto de la aireación en procesos fermentativos en biorreactor, dado que es una de las variables importantes para llevar a cabo dicho proceso; en esta investigación no se tomó en cuenta debido a una falla en la bomba del equipo.

Se incentiva a los investigadores a ampliar el alcance de la investigación hasta la purificación y obtención del ácido fumárico con el objetivo de utilizar técnicas innovadoras y menos costosas que sean accesibles para pequeñas y medianas empresas.

Se recomienda continuar los estudios sobre la cepa nativa y posibles aplicaciones industriales, al igual que el estudio del bagazo de caña en fermentaciones de tipo sólido o sumergido, para la obtención de productos de interés industrial, con el fin de fomentar la reutilización de subproductos aportando a la mitigación del impacto ambiental.

BIBLIOGRAFÍA

- Alviar, M. (2012). El futuro y los recursos naturales. Recuperado de: elCOLOMBIANO. Recuperado de <https://bit.ly/2xdyv5>.
- Amin, F.R, Khalid, H., Zhang, H., Rahman, S., Zhang, R., Liu, G. & Chen, C. (2017). Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *AMB Express*, 7(1), 72. doi: 10.1186/s13568-017-0375-4
- Avila, I. (2011). *El Aguardiente de caña, procesos y tradición en el Valle de Yunguilla* (tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador. Recuperado de <https://bit.ly/3aVQDe7>
- Badie, M., Asim, N., Jahim, J. M. & Sopian, K. (2014). Comparison of chemical pretreatment methods for cellulosic biomass. *APCBEE Procedia*, 9, 170-174. doi: 10.1016/j.apcbee.2014.01.030
- Barroso, M. (2010). *Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería* (tesis de pregrado). Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España. Recuperado de <https://bit.ly/34lb8OR>
- Basanta, R., García, M.A., Cervantes, J.E., Mata, H. & Bustos, G. (2007). Sostenibilidad del reciclaje de residuos de la agroindustria azucarera: Una Revisión. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(4), 293-305. doi: 10.1080/11358120709487704
- Bautista, S., Bosquez, E. & Barrera, L. L. (2014). *Rhizopus stolonifer* (Soft Rot). En *Postharvest Decay: Control Strategies*, (pp. 1-44). Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-411552-1.00001-6
- Bhutto, A. W., Qureshi, K., Harijan, K., Abro, R., Abbas, T., Bazmi, A. A., Karim, S. & Yu, G. (2017). Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass. *Energy*, 122, 724–745. doi: 10.1016/j.energy.2017.01.005
- Bullerman, L. (2003). SPOILAGE| Fungi in Food-An Overview. *Elsevier*, p.5518.

- Bustillo, E. (2010). Método para cuantificar suspensiones de esporas de hongos y otros organismos. Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia. doi: 10.13140/RG.2.1.3594.5128
- Carrera, J.P, Loyola, E. & Iglesias, S. (2010). Impacto ambiental ocasionado por la quema de la caña de azúcar en Laredo-Trujillo. *UNMSM*, 13(26), 1-9. Recuperado de <https://bit.ly/2UR9BNc>
- Carta, F., Soccol, C., Ramos, L.P. & Fontana, J.D. (1999). Production of fumaric acid by fermentation of enzymatic hydrolysates derived from cassava bagasse. *Bioresource Technology*, 68(1), 23-28. doi: 10.1016/S0960-8524(98)00074-1
- Cepero, M.C., Retrepo, S., Franco, A. E., Cárdenas, M. E. & Vargas, N. (2012). *Biología de hongos*. Bogotá, Colombia: Ediciones Uniandes- Universidad de los Andes.
- CINCAE. (2013). *Utilización de subproductos de la caña de azúcar y de la industria alcoholera ecuatoriana para uso en la fertilización en los cultivos de caña*. Recuperado de CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE LA CAÑA DE AZÚCAR DEL ECUADOR: <https://bit.ly/3bZuQSM>
- Concha, W. (2014). *Producción biológica de ácido cítrico a partir de lactosuero de residuo quesero y desproteinizado utilizando una cepa fungal de Aspergillus niger sp. en cultivo sumergido* (tesis de grado). Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú.
- Cortes, W. (2014). Tratamientos aplicables a materiales lignocelulósicos para la obtención de etanol y productos químicos. *Revista de Tecnología*, 13(1), 39-44. Recuperado de <https://bit.ly/39Tn8bm>
- Cuervo, L., Folch, J. & Quiroz, R. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Biotecnología*, 13(3), 11-25. Recuperado de <https://bit.ly/3c3VRV6>
- Das, R. K., Brar, S. K. & Verma, M. (2016). Fumaric Acid: Production and Application Aspects. En K. Brar, S. S, & K. Pakshirajan. (Eds), *Platform Chemical Biorefinery* (pp. 133-157). Elsevier. doi:10.1016/b978-0-12-802980-0.00008-0

- Dávila, D. (2014). *Evaluación de dos sistemas de siembra en caña de azúcar (Saccharum officinarum L.) para la obtención de semilla en la provincia del Cañar- cantón La Troncal* (tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador. Recuperado de <https://bit.ly/3eaiA3Y>
- Domínguez, M. M., Álvarez, A., Granados, M. & Hernández, F. (2012). Estudio de la cinética del pretratamiento e hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar. *Iberoamericana de Polimeros*, 13(4), 200-211. Recuperado de <https://bit.ly/3c0sDqf>
- Ehrlich, F. (1911). Formation of fumaric acid by means of molds. En Gupta, V., Schmoll, M., Mazutti, M., Mäki, M. (Ed.), *Aplications of microbial engineering* (pp. 61- 62). Boca Raton, Estados Unidos: CRC Press.
- Fang, G. (2018). Fumaric acid production by *Rhizopus oryzae* ATCC® 20344™ from lignocellulosic syrup. *BioEnergy Research*, 11(2), 330–340. doi: 10.1007/s12155-018-9899-y
- Farrera, R., Zambrano, A. & Ortiz, F. (2007). Identificación de hongos asociados a enfermedades del fruto de la fresa en el municipio Jáuregui del estado Táchira. *Revista de La Facultad de Agronomía de La Universidad Del Zulia*, 24(2), 269–281. Recuperado de <https://bit.ly/2RmrIss>
- Felthouse, T. R., Burnett, J. C., Horrell, B., Mummey, M. J. & Kuo, Y. J. (2001). Maleic anhydride, maleic acid, and fumaric acid. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. doi: 10.1002/0471238961.1301120506051220.a01.pub2
- Foster, J. W. & Waksman, S. A. (1939). The production of fumaric acid by molds belonging to the genus *Rhizopus*. *Journal of the American Chemical Society*, 61(1), 127-135. doi:10.1021/ja01870a043
- Fraire, M., Yáñez, M., Nieto, D. & Vásquez, G. (2003). Hongos patógenos en fruto de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 285–291. Recuperado de <https://bit.ly/34lkSZg>

- Gavilanes, I., Jara, J., Idrovo, J., Bustamante, M., Moral, R. & Paredes, C. (2016). Windrow composting as horticultural waste management strategy - A case study in Ecuador. *Waste Management*, 48, 127-134. doi: 10.1016/j.wasman.2015.11.026
- Giménez, A., Silvestre, J. F., Mercader, P., De La Cuadra, J., Ballester, I., Gallardo, F., Pujol, R.M., Zimerson, E. & Bruze, M. (2009). Shoe contact dermatitis from dimethyl fumarate: Clinical manifestations, patch test results, chemical analysis, and source of exposure. *Contact Dermatitis*, 61(5), 249–260. doi: 10.1111/j.1600-0536.2009.01628.x
- Giraldo, S. (2013). *Ensayos para la producción biotecnológica de ácido fumárico empleando residuos agrícolas* (tesis de pregrado). Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia.
- Goldberg, I., Rokem, J.S. & Pines, O. (2006). Organic acids: old metabolites, new themes. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process*, 81(10), 1601-1611. doi: 10.1002/jctb.1590
- González-Rentería, S.M., Soto-Cruz, N.O., Rutiaga-Quiñones, O.M., Medrano-Roldán, H., Rutiaga-Quiñones, J.G. & López-Miranda, J. (2011). Optimización del proceso de hidrólisis enzimática de una mezcla de pajas de frijol cuatro variedades. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(1), 17-28. Recuperado de <https://bit.ly/39TUVBd>
- Gracida, J. & Pérez, B. (2014). Factores previos involucrados en la producción de bioetanol, aspectos a considerar. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 30(2), 213-227. Recuperado de <https://bit.ly/2Vc7MJH>
- Guo, F., Wu, M., Dai, Z., Zhang, S., Zhang, W., Dong, W., Zhou, J., Jiang, M. & Xin, F. (2020). Current advances on biological production of fumaric acid. *Biochemical Engineering Journal*, 153, 107397. doi: 10.1016/j.bej.2019.107397
- Hendriks, A. T. W. M. & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100(1), 10–18. doi: 10.1016/j.biortech.2008.05.027

- Herrera, M. (2005). *Hidrólisis térmica del bagazo de caña de azúcar para la producción de etanol vía fermentación* (tesis de pregrado). Ciudad Universitaria “Rodrigo Facio”, San José, Costa Rica. Recuperado de <https://bit.ly/3c0RXwk>
- INEC. (2019). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua, 2018*. Quito, Ecuador. Recuperado de <https://bit.ly/39VVGHE>
- Jeremic, D., Goacher, R. E., Yan, R., Karunakaran, C. & Master, E. R. (2014). Direct and up-close views of plant cell walls show a leading role for lignin-modifying enzymes on ensuing xylanases. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 1–12. doi: 10.1186/s13068-014-0176-9
- Joshi, R. K. & Strebel, H. P. (2002). Use of fumaric acid derivatives in transplant medicine. *U.S. Patent No. 6,359,003*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Kautola, H. & Linko, Y. Y. (1989). Fumaric acid production from xylose by immobilized *Rhizopus arrhizus* cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31(5–6), 448–452. doi: 10.1007/BF00270774
- Kenealy, W., Zaady, E., du Preez, J. C., Stieglitz, B. & Goldberg, I. (1986). Biochemical aspects of fumaric acid accumulation by *Rhizopus arrhizus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(1), 128–133.
- Klages, F. (2006). *Tratado de química orgánica*. Barcelona, España: Reverté. Recuperado de <https://bit.ly/2VeV6BT>
- Koutinas, A.A., Vlysidis, A., Pleissner, D., Kopsahelis, N., Lopez, I., Kookos, I., Papanikolaou, S., Kwan T. & Lin, C. (2014). Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *Chemical Society Reviews*, 43(8), 2587–2627. doi: 10.1039/c3cs60293a
- Li, C., Knierim, B., Manisseri, C., Arora, R., Scheller, H., Auer, M., Vogel, K., Simmons, B. & Singh, S. (2010). Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*, 101(13), 4900–906. doi: 10.1016/j.biortech.2009.10.066

- Ling, L. B. & Ng, T. K. (1989). Fermentation process for carboxylic acids. *U.S. Patent No. 4,877,731*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Liu, H., Ma, J., Wang, M., Wang, W., Deng, L., Nie, K., Yue, X., Wang, F. & Tan, T. (2016). Food Waste Fermentation to Fumaric Acid by *Rhizopus arrhizus* RH7-13. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(8), 1524-1533. doi: 10.1007/s12010-016-2184-7
- Marmol, J. & Liviapoma, R. (2014). *Proyecto asociativo para la creación de una empresa dedicada a la fabricación de papel bond en base del bagazo de la caña de azúcar, ubicada en el valle del chota, parroquia ambuqui, provincia de Imbabura y su distribución en la ciudad de Quito* (tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador. doi: 10.20868/UPM.thesis.39079
- Martin- Dominguez, V., Estevez, J., Ojembarrena, F., Santos, V. E. & Ladero, M. (2018). Fumaric acid production: A biorefinery perspective. *Fermentation*, 4(2), 33. doi: 10.3390/fermentation4020033
- Medina, J. & Mantilla, M. (2012). *Hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar y paja de trigo con una posterior fermentación alcohólica para obtención de etanol* (tesis de pregrado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador. Recuperado de <https://bit.ly/3c5JcRH>
- Moharreg, D., Linker, R., Gold, R. & Stangel, M. (2009). Fumaric Acid and its Esters: An Emerging Treatment for Multiple Sclerosis. *Current Neuropharmacology*, 7(1), 60-64. doi: 10.2174/157015909787602788
- Mondala, A. H. (2015). Direct fungal fermentation of lignocellulosic biomass into itaconic, fumaric, and malic acids: current and future prospects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(4), 487-506. doi: 10.1007/s10295-014-1575-4
- Morales, S. (2015). *Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos* (tesis doctoral). Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España. Recuperado de <https://bit.ly/39PEtBX>

- Mudhoo, A. (Ed.). (2012). *Biogas production: pretreatment methods in anaerobic digestion*. Massachusetts, Estados Unidos: John Wiley & Sons.
- Ochoa, J. D., Betancur, M. C. & Sandoval, E. R. (2017). Efecto del ácido fumárico en las características de calidad de muffins. *Revista Lasallista de Investigación*, 14(2), 9-19. doi: 10.22507/rli.v14n2a1
- Papadaki, A., Papapostolou, H., Alexandri, M., Kopsahelis, N., Papanikolaou, S., de Castro, A., Freire, D. & Koutinas, A. (2018). Fumaric acid production using renewable resources from biodiesel and cane sugar production processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(36), 35960–35970. doi: 10.1007/s11356-018-1791-y
- Parameswaran B. (2009) Sugarcane Bagasse. En: Singh, P., Ashok, P. (Eds.) *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation* (pp. 239-247). Dordrecht, Holanda: Springer. doi: 10.1007/978-1-4020-9942-7_12
- Parzanese, M. (2016). Fermentación En Sustrato Sólido : Aprovechamiento de subproductos de la agroindustria. *Tecnologías para la Industria de alimentos, Ficha N° 27*, 1–13. Recuperado de <https://bit.ly/2RoilIK>
- Peña, C., Matrani, R., Correa, J., Cadenas, G. & Munilla, M. (2000). Bagazo. En L. Gálvez, A. Cabello. & G. Villamil. (Eds.). *Manual de los derivados de la caña de azúcar* (pp. 33-36). La Habana, Cuba: Instituto Cubano de Investigación de los derivados de la caña de azúcar.
- Petruzzello, M. (2016). Rhizopus. *Encyclopaedia Britannica* [versión electrónica]. New York, EU: Encyclopaedia Britannica Inc., <https://bit.ly/2XlgHeB>
- Plascencia, R., Olalde, V., Mena, H., Ceja, L., Venegas, J., Oyoque, G. & Angoa, M. (2012). Antagonismo in vitro de aislados bacterianos de fresa comercial y silvestre vs. Botrytis cinerea Y Rhizopus stolonifer. *Ra Ximhai*, 8(3), 103-110. Recuperado de <https://bit.ly/3b82gOU>

- Pontón, J., Moragues, M.D., Gené, J., Guarro, J. & Quindós, G. (2002). *Hongos y actinomicetos alergénicos; Rhizopus stolonifer (Ehrenberg: Fries) Vuillemin*. Bilbao, España: Revista Iberoamericana de Micología.
- Pozo, C. (2012). *Aprovechamiento del Bagazo de Caña de Azúcar en la Fabricación de bloques ecológicos para mampostería liviana* (tesis de pregrado). Escuela Superior Politecnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. Recuperado de <https://bit.ly/2VaOi8k>
- Pulido, I. R. (2003). *Hidrólisis ácida y enzimática del residuo de poda de olivo: fermentación de hidrolizados con Pachysolen tannophilus* (tesis de pregrado). Universidad de Jaén, Jaén, España. Recuperado de <https://bit.ly/34k3OTF>
- Ramírez, G. (2017). *Biodegradación de Residuos Industriales mediante la bacteria Bacillus lincheniformis* (tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca, Ecuador.
- Raspolli, A.M. & Antonetti, C. (2012). Biomass pre-treatment: separation of cellulose, hemicellulose and lignin. Existing technologies and perspectives. En M. Aresta, A. Denedetto & F. Dumeignil. (Eds.), *Biorefinery: From Biomass to Chemicals and Fuels* (pp. 101-116). Berlín, Alemania: De Gruyter.
- Reinoso, M. (2017). *Evaluación in vitro de extractos de cáscara de banano para control de Rhizopus spp, durante poscosecha en tomate (Solanum lycopersicum)* (tesis de maestría). Universidad de las Américas, Quito, Ecuador.
- Roa, C.A.; Straarhof, A.J., Zijlman, T.W., van Gulik, W.M. & van Der Wielen, L. A. (2008). Fumaric acid production by fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi: 10.1007/s00253-007-1341-x.
- Rodríguez-López, J., Sánchez, A. J., Gómez, D. M., Romaní, A. & Parajó, J. C. (2012). Fermentative production of fumaric acid from Eucalyptus globulus wood hydrolyzates. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 87(7), 1036-1040. doi: 10.1002/jctb.2729

- Rosas, M. & Terán, D. (2015). *Obtención de ácido cítrico a partir de melaza o cachaza, mediante fermentación utilizando cepa de aspergillus niger ATCC 1688* (tesis de pregrado). Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador.
- Sarrouh, B.F., Jover, J. & González, E. (2005). Estudio de la hidrólisis del bagazo con ácido sulfúrico concentrado utilizando dos variantes de una sola etapa y una sola etapa modificada para la obtención de etanol y análisis técnico-económico de dicho proceso. *Revista Ingeniería e Investigación*, 25(3), 34–38. Recuperado de <https://bit.ly/3e8xWwo>
- Schipper, M. (1984). Revision of the genus *Rhizopus*. *Studies Mycology*, 25, 1-34. Recuperado de <https://bit.ly/2JNMhtBCarta>
- Shui, G. & Leong, L. P. (2002). Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 977(1), 89–96. doi: 10.1016/S0021-9673(02)01345-6
- Tanjore, D., Shi, J. & Wyman, C. E. (2011). Dilute acid and hydrothermal pretreatment of cellulosic biomass. En B. Simmons. (Ed.), *Chemical and biochemical catalysis for next generation biofuels* (pp. 64-88). The Royal Society of Chemistry.
- Vanegas, C. (2016). *Manejo del bagazo en la agroindustria de la caña panelera en el Nordeste antioqueño a partir de la gestión integral de residuos: Estudio de caso municipio de Yolombo* (tesis de maestría). Universidad de Manizales, Manizales, Colombia. Recuperado de <https://bit.ly/2JSobOl>
- Vasco, O. (2007). *Producción Biotecnológica de ácido fumárico* (tesis de pregrado). Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia.
- Velázquez, M., Bautista, S., Hernández, A., Guerra, M. & Amora, E. (2008). Estrategias de control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, agente causal de pudriciones postcosecha en productos agrícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26(1), 49–55. Recuperado de <https://bit.ly/2Rq4L7x>

- Waksman, S.A. (1943). Process for the production of fumaric acid. *U.S. Patent No. 2, 326, 986*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Wojciechowski, P. W. & Brash, J. L. (1996). In *Biotechnology: An Overview. Interfacial Phenomena and Bioproducts*, 23, 1. Recuperado de: <https://bit.ly/3e8pp5X>
- Xu, Q., Li, S., Fu, Y., Tai, C. & Huang, H. (2010). Two-stage utilization of corn straw by *Rhizopus oryzae* for fumaric acid production. *Bioresource Technology*, 101(15), 6262-6264. doi: 10.1016/j.biortech.2010.02.086
- Xu, Q., Li, S., Huang, H. & Wen, J. (2012). Key technologies for the industrial production of fumaric acid by fermentation. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1685–1696. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.08.007
- Yang, S.T. (2007). Bioprocessing-from Biotechnology to Biorefinery. En Yang, S.T. (Ed.), *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources* (pp. 1-24). Ohio, Estados de Unidos: Elsevier. doi: 10.1016/B978-044452114-9/50002-5
- Yang, S.T., Zhang, K, Zhang, B. & Huang, H. (2011). Fumaric Acid. En M.Y. Murray. (Ed.), *Comprehensive Biotechnology*. doi: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00456-6
- Zauscher, F., Barajas, C., Duarte, C. & Estupiñan, C. (1991). Producción biotecnológica y extracción de ácido fumárico. *ION*,13(1), 17-17. Recuperado de <https://bit.ly/2JNt8bd>
- Zhang, K. (2012). *Fumaric acid fermentation by Rhizopus oryzae with integrated separation Technologies* (tesis doctoral). The Ohio State University, Ohio, Estados Unidos.
- Zhang, K., Yuan-Ying, S. & Cai, L. (2013). An Optimized Protocol of Single Spore Isolation for Fungi. *Cryptogamie, Mycologie*, 34(4), 349-356. doi: 10.7872/crym.v34.iss4.2013.349
- Zhang, K., Zhang, B. & Yang, S.T. (2013). Production of citric, itaconic, fumaric and malic acids in filamentous fungal fermentations. En S. Yang. (Ed), *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers* (pp 375-397). Hoboken, Estados Unidos: John Wiley & Sons Inc.

- Zheng, R. Y., Chen, G. Q., Huang, H. & Liu, X. Y. (2007). A monograph of *Rhizopus Sydowia*, 59(2), 273–372. Recuperado de <https://bit.ly/2Ven9S2>
- Zhou, S., Zhang, Y. & Dong, Y. (2012). Pretreatment for biogas production by anaerobic fermentation of mixed corn stover and cow dung. *Energy*, 46(1), 644-648. doi: 10.1016/j.energy.2012.07.017
- Zlotkin, S., Arthur, P., Antwi, K. Y. & Yeung, G. (2001). Treatment of anemia with microencapsulated ferrous fumarate plus ascorbic acid supplied as sprinkles to complementary (weaning) foods. *The American journal of clinical nutrition*, 74(6), 791-795. Recuperado de <https://bit.ly/3a0Snl6>
- Žnidaršič, P., Komel, R. & Pavko, A. (2000). Influence of some environmental factors on *Rhizopus nigricans* submerged growth in the form of pellets. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(7), 589-592. doi: 10.1023/A:1008967519157
- Zuluaga, C. & Antoñana, U. (2004). Reservas de petróleo. *Consumer*, (73), 24-25.
- Zweigerdt, R. (2009). Large Scale Production of Stem Cells and their derivatives. En U. Martin. (Ed.), *Engineering of Stem Cells* (pp. 201-235). Berlín, Heidelberg: Springer. doi: 10.1007/10_2008_27

ANEXOS

ANEXO I. Cálculo del título de Fehling

Para sacar el cálculo del título de Fehling se utilizó la siguiente metodología:

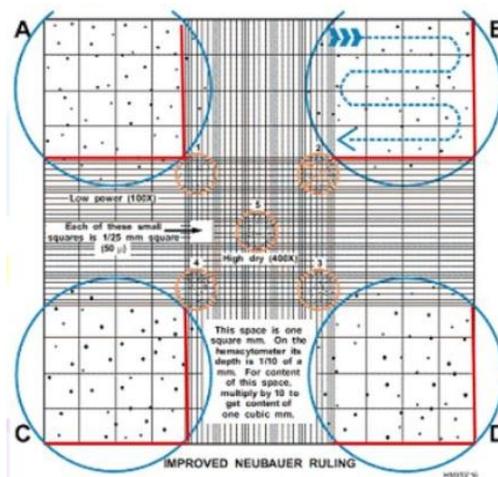
1. En una bureta se coloca una solución de glucosa al 0.5%.
2. Se agregan 10 mL de Fehling A, 10 mL de Fehling B y 25 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 100 mL. Dicha solución se somete a calor hasta ebullición constante.
3. Cuando empieza la ebullición se deja caer gota a gota la solución de glucosa hasta evidenciar el viraje del color azul a un rojo ladrillo o pardo.
4. El volumen consumido de la solución de glucosa, se aplica a la siguiente fórmula:

$$\text{Título de Fehling} = \frac{\text{Gasto de azúcar reductor} \times 5}{1000}$$

ANEXO II. Conteo de esporas en cámara de Neubauer y preparación de los inóculos a una concentración 8×10^4 esporas/mL.

La metodología utilizada fue del estudio de (Bustillo, 2010):

1. Realizar un lavado de esporas con 10 mL de suero fisiológico y se filtra con una gasa estéril con la finalidad de eliminar hifas y partículas grandes del lavado.
2. Colocar el cubreobjetos en la cámara, absorber una gota de suspensión de esporas con una micropipeta y colocarla en los extremos de la misma para que ingrese a la cámara por capilaridad.
3. Dejar reposar entre 1 a 2 minutos para que las esporas sedimenten en la base de conteo.
4. En el caso de hongos con esporas pequeñas se realiza el conteo de las secciones numeradas mientras que si son esporas grandes se realiza el conteo en las secciones A, B, C y D como se muestra en la figura. Las esporas que tocan las líneas derecha e inferior en cada sección no se cuentan.



5. El conteo se debe realizar mínimo seis veces en cada sección para sacar un promedio.
6. Una vez que se ha obtenido el número de esporas completo se aplica la fórmula:

$$N^{\circ} \text{ de esporas/mL} = \frac{N^{\circ} \text{ total de esporas} \times \text{Factor de cámara} 1000}{N^{\circ} \text{ de secciones} \times \text{dilución}}$$

7. Para preparar la concentración específica de 8×10^4 esporas/mL se utiliza la siguiente fórmula:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

Donde:

C1= concentración inicial (obtenida en el conteo)

V1= Volumen inicial (establecida arbitrariamente en la preparación del inóculo)

C2= Concentración final deseada (según el estudio a realizar)

V2= Volumen final (desconocido)