

**Facultad de Ciencias Farmacéuticas,  
Bioquímicas y Biotecnológicas  
Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica**



*“Evaluación de la capacidad de producción de ácido fumárico  
utilizando una cepa nativa de Rhizopus sp. en biorreactores tip batch,  
turbidostato, SSF y PFTR.”*

**Tesis presentada por el Bachiller:**

Gaona Moscoso Juan Adrián

**Para optar el título profesional de**

**INGENIERO BIOTECNÓLOGO**

**Asesor :**

Ing. Javier F. Roque Rodríguez

**AREQUIPA –PERU**

**2013**

## Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Capítulo I: Introducción.....	5
1.1 Formulación del problema.....	5
1.2 Justificación.....	6
1.3 Hipótesis.....	7
1.4 Objetivos.....	7
1.5 Variables e indicadores.....	8
Capítulo II: Marco Teórico.....	9
2.1 La industria biotecnológica y perspectivas.....	9
2.2 Empleo de los hongos en reactores biológicos en el campo industrial.....	9
2.3 Ácido fumárico.....	10
2.4 El género Rhizopus sp.....	16
2.4.1. Principales especies.....	17
2.4.2. Características microscópicas.....	19
2.4.3. Características macroscópicas.....	20
2.4.4. Reproducción.....	20
2.4.5. Secreción de metabolitos.....	22
3. Multiplicación de la cepa nativa por medio de un seed reactor.....	22
4. Crioconservación por medio de hibernación.....	28
5. Medio de cultivo en la multiplicación de la cepa nativa de Rhizopus sp.....	24
6. Cinética de crecimiento fungal.....	24
7. Transferencia de masa.....	26
8. Biorreactores tipo batch, turbidostato, ssf y pfr.....	28
8.1 Reactores biológicos.....	28
8.2 Biorreactores de tipo batch y turbidostato.....	30
8.3 Biorreactores con fermentaciones en estado sólido.....	31
8.4 Biorreactores de tipo pfr.....	32
9. Proceso bioquímico en la obtención de ácido fumárico.....	35
10. Sustratos sólidos utilizados para el crecimiento del hongo.....	36
11. Proceso down stream.....	38
12. Método de determinación de ácido fumárico.....	39
Capítulo III :Materiales y Métodos.....	44
3.1. Lugar de investigación:.....	44
3.2 Materiales.....	44
3.2.1. Material biológico.....	44
3.2.2. Material de vidrio.....	44
3.2.3. Instrumentación y equipos.....	45
3.2.4 Medios de cultivo.....	46
3.2.5 Reactivos químicos.....	46
3.2.6. Otros materiales.....	46
3.3. Métodos.....	47
3.3.1 aislamiento de cepas nativas de Rhizopus sp. A partir de muestras de pan contaminado.....	47
3.3.2 Multiplicación de la cepa nativa seleccionada de Rhizopus sp. Por medio de la conformación de un seed reactor.....	49

3.3.3 Adaptación de la cepa nativa <i>Rhizopus</i> sp. A un medio de producción específico de ácido fumárico con su respectiva multiplicación en un seed reactor.....	50
3.3.4 Determinación de la concentración celular del inóculo para los biorreactores.....	51
3.3.5 Diseño y configuración de los reactores biológicos.....	51
3.3.6 Determinación del parámetro de cinética de crecimiento fungal y los parámetros de transferencia de oxígeno en el reactor biológico tipo batch.....	55
3.3.7 Obtención de ácido fumárico en los reactores biológicos.....	57
3.3.8 Proceso de down stream.....	61
3.3.9. Análisis de ácido fumárico por el método de espectrofotometría.....	61
3.4. Flujograma.....	64
Capítulo IV :Resultados y Discusión.....	67
4.8.3. Determinación de las dimensiones del biorreactor de tipo pftr.....	96
4.9 Análisis de ácido fumárico por el método de espectrofotometría.....	97
4.10 Obtención de ácido fumárico en los reactores biológicos.....	99
4.10.1. Obtención de ácido fumárico utilizando <i>rhizopus</i> sp. En un biorreactor tipo batch.....	99
4.10.2. Obtención de ácido fumárico utilizando <i>rhizopus</i> sp. En un biorreactor tipo turbidostato.....	100
4.10.3. Obtención de ácido fumárico utilizando <i>rhizopus</i> sp. En un biorreactor tipo (ssf).....	102
4.10.4. Obtención de ácido fumárico utilizando <i>rhizopus</i> sp. En un biorreactor tipo (pftr).....	104
4.11. Análisis estadístico de la producción de ácido fumárico en cuatro tipos de biorreactores.....	106
4.12 Comparación de las variables dependientes en cada uno de los biorreactores.....	107
4.13 Determinación del biorreactor con mayor producción de ácido fumárico.....	109
V.-Conclusiones.....	112
VI.- Sugerencias.....	113
VII- .Bibliografía.....	138
7.2 Web- sites.....	141

### Índice de tablas.

Tabla 1	Variables independientes, con sus correspondientes indicadores y unidades.....	8
Tabla 2	Variables dependientes con sus correspondientes indicadores y unidades.....	8
Tabla 3	Propiedades fisicoquímicas del ácido fumárico.....	12
Tabla 4	Solubilidad del ácido fumárico a diferentes temperaturas.....	13
Tabla 5	Composición de la raíz, corteza y cilindro.....	37
Tabla 6	Valores de longitud de onda para cada una de las secciones de la región ultravioleta.....	41
Tabla 7	Adaptación de la cepa de <i>Rhizopus</i> sp., en diferentes concentraciones de medio de producción.....	80
Tabla 8	Cuadro comparativo de tres conteos celulares realizados para determinar la concentración celular del inoculo de <i>Rhizopus</i> sp. ....	82
Tabla 9	Valores obtenidos a partir de datos del ensayo de determinación de la cinética de crecimiento.....	89
Tabla 10	Valores de M1/3 obtenidos a partir de los datos de biomasa de la tabla N°9.....	90
Tabla 11	Valores de K <sub>la</sub> obtenidos junto con el promedio final.....	93
Tabla 12	Datos del tiempo tardado de tres ensayos en el que el medio de producción lleno 10 ml de una probeta. Utilizando la bomba A.....	95
Tabla 13	Valores del flujo de tres ensayos en el que el medio de producción lleno 10 ml de una probeta. Utilizando la bomba A.....	95
Tabla 14	Datos del tiempo tardado de tres ensayos en el que el medio de producción lleno 10 ml de una probeta. Utilizando la bomba B.....	95
Tabla 15	Valores del flujo de tres ensayos en el que el medio de producción lleno 10 ml de una probeta. Utilizando la bomba B.....	96
Tabla 16	Dimensiones del tubo interno del biorreactor de tipo PFTR.....	96
Tabla 17	Cuadro de comparación de los valores de las absorbancias y de las absorvidades de cada una de las muestraspatrones.....	98
Tabla 18	Concentraciones de ácido fumárico obtenido en tres diferentes ensayos en el biorreactor tipo batch.....	99
Tabla 19	Concentraciones de ácido fumárico obtenido en tres diferentes ensayos en el biorreactor tipo turbidostato.....	102
Tabla 20	Concentraciones de ácido fumárico obtenido en tres diferentes ensayos en el biorreactor tipo SSF.....	104
Tabla 21	Concentraciones de ácido fumárico obtenido en tres diferentes ensayos en el biorreactor tipo PFTR.....	106
Tabla 22	Cuadro de los compuestos y sus respectivas cantidades.....	115
Tabla 23	Cuadro de los compuestos y sus respectivas cantidades.....	116
Tabla 24	Cuadro de los compuestos y sus respectivas cantidades.....	117
Tabla 25	Valores de OTR junto con sus correspondientes horarios.....	128
Tabla 26	Valores de OUR junto con sus correspondientes horarios.....	129
Tabla 27	Absorbancias obtenidas del primer, segundo y tercer ensayo correspondientemente de las muestras recolectadas del biorreactor tipo batch.....	130

Tabla 28	Absorbancias obtenidas del primer, segundo y tercer ensayo correspondientemente de las muestras recolectadas del biorreactor tipo turbidostato.....	131
Tabla 29	Absorbancias obtenidas del primer, segundo y tercer ensayo correspondientemente de las muestras recolectadas del biorreactor tipo SSF.....	132
Tabla 30	Absorbancias obtenidas del primer, segundo y tercer ensayo correspondientemente de las muestras recolectadas del biorreactor tipo PFTR.....	133
Tabla 31	Cuadro de la prueba ANOVA.....	137
Tabla 32	Cuadro de la prueba ANOVA.....	137
Tabla 33	Cuadro de la prueba ANOVA.....	138
Tabla 34	Cuadro de la prueba ANOVA.....	138



## Índice de Figuras.

Figura 1	Estructura química del ácido maleico y del ácido fumárico.....	12
Figura 2	Secuencia del transformación de la glucosa a fumarato.....	35
Figura 3	Imagen del espectro electromagnético. ....	40
Figura 4	Muestra N°1, localizada bajo la sombra de una enredadera en uno de los vértices de un jardín. ....	68
Figura 5	Muestra N°2, localizada en la techumbre de un domicilio a una distancia de 3 metros aproximadamente del suelo .....	69
Figura 6	Muestra N°3, localizada bajo la sombra de un arbusto en otro de los vértices de un jardín.....	69
Figura 7	Crecimiento micelial de las muestras CMP1(A) y CMP2 (B), visto por el reverso de la placa petri.....	70
Figura 8	Crecimiento micelial aéreo de la muestra CMP1, cuatro días después de su siembra.....	72
Figura 9	Crecimiento micelial aéreo de la muestra CMP1, dos semanas después de su siembra.....	72
Figura 10	Estructura fúngica de la muestra CMP2, vista con microscopio 100X, con azul de lactofenol .....	74
Figura 11	Estructura fúngica de la muestra CMP1, vista con microscopio 100X, con azul de lactofenol. ....	74
Figura 12	Estructura fúngica de la muestra CMP1, vista con microscopio 100X, con azul de lactofenol. ....	75
Figura 13	Estructura fúngica de la muestra CMP1, vista con microscopio 100X, con azul de lactofenol. ....	77
Figura 14	Dos seed reactors conformados utilizando la cepa nativa de Rhizopus sp. obtenida de la muestra CMP1.....	78
Figura 15	Conservación de la cepa nativa de Rhizopus sp. utilizando glicerol 10%.....	79
Figura 16	Adaptación de la cepa nativa de Rhizopus sp. a diferentes concentraciones del medio de producción. (25%; 50%; 75%; 100%).....	81
Figura 17	Vista del primer recuento celular vista 100X.....	83
Figura 18	Esquema del base case del headplate para los biorreactores tipo batch, turbidostato y SSF.....	84
Figura 19	Esquema del diseño del biorreactor tipo batch.....	85
Figura 20	Esquema del diseño del biorreactor tipo turbidostato .....	86
Figura 21	Esquema del diseño del biorreactor tipo SSF.....	87
Figura 22	Esquema del diseño del biorreactor tipo PFTR.....	88
Figura 23	Gráfica de dispersión con marcadores entre los datos del tiempo (h) y los datos de M1/3.Programa Microsoft Excel 2007 .....	91
Figura 24	Gráfica de dispersión entre los datos del tiempo (min) y los datos de OD (ppm) . Programa Microsoft Excel 2007 .....	92
Figura 25	Gráfica de dispersión entre los datos del tiempo (min) y los datos de OD (ppm) . Programa Microsoft Excel 2007 .....	93
Figura 26	Imagen obtenida del espectrofotómetro en donde se observan el número de patrones, con sus respectivas concentraciones (mg/ml) y absorbancias (nm).....	97

Figura 27 Imagen obtenida del espectrofotómetro, en donde se observa la curva de calibración de los patrones.....	98
Figura 28 Grafica comparativa de la producción de ácido fumárico en los tres ensayos del sistema batch.....	100
Figura 29 Grafica comparativa de la producción de ácido fumárico en los tres ensayos del sistema turbidostato.....	102
Figura 30 Grafica comparativa de la producción de ácido fumárico en los tres ensayos del sistema SSF.....	105
Figura 31 Grafica comparativa de la producción de ácido fumárico en los tres ensayos del sistema PFTR. 107	
Figura 32 Gráfica de columna del volumen del medio de producción en cada uno de los biorreactores.....	110
Figura 33 Gráfica de columna de la máxima producción de ácido fumárico de los cuatro tipos de biorreactores.....	111
Figura 34 Imagen del Foundation sobre el Heatplate.....	118
Figura 35 Varilla de vidrio de 0.5cm de diámetro interno, doblada por medio de calor en la parte superior.....	118
Figura 36 Bomba de oxigenación.....	119
Figura 37 Difusor de micro burbujas.....	119
Figura 38 Termostato regulable.....	120
Figura 39 Varillas de metal de ¼ de pulg., junto con los pernos ¼ de pulg. y las mariposas de ¼ pulg.....	120
Figura 40 Imagen del biorreactor tipo (PFTR).....	121
Figura 41 Imagen del medidor de oxígeno disuelto (Milwaukee).....	122
Figura 42 Biorreactor tipo batch, en el primer ensayo, funcionando óptimamente.....	123
Figura 43 Biorreactor tipo turbidostato, en el primer ensayo, funcionando óptimamente.....	124
Figura 44 Biorreactor tipo (PFTR), en el segundo ensayo, funcionando óptimamente.....	125
Figura 45 Biorreactor con fermentación en estado sólido, en el primer ensayo, funcionando óptimamente.....	126
Figura 46 Lavador de gases usado en la obtención de ácido fumárico utilizando una cepa nativa de Rhizopus sp.....	127
Figura 47 Longitud de onda de trabajo en la determinación de ácido fumárico.....	134

### Índice de Ecuaciones.

Ecuación 1	Modelo de crecimiento peletizado.....	25
Ecuación 2	Modelo simplificado de crecimiento peletizado.....	25
Ecuación 3	Determinación de OTR.....	27
Ecuación 4	Determinación de $k_{la}$ .....	27
Ecuación 5	Determinación de TRH.....	34
Ecuación 6	Sumatoria de $\epsilon$ y $\Psi$ .....	34
Ecuación 7	Determinación de volumen hueco.....	34
Ecuación 8	Determinación de la cantidad de esporas en una cámara de neubauer. ....	51
Ecuación 9	Determinación del flujo.....	58
Ecuación 10	Determinación de la absortividad.....	62
Ecuación 11	Determinación de la concentración.....	63



## Índice de Anexos.

Anexo 1	Composición del medio de producción. ....	114
Anexo 2	Composición del medio de producción. ....	115
Anexo 3	Composición del medio sabouraud.....	116
Anexo 4	Materiales para el armado de los biorreactores .....	117
Anexo 5	Materiales para el armado de los biorreactores .....	118
Anexo 6	Materiales para el armado de los biorreactores .....	119
Anexo 7	Biorreactor tipo PFTR. ....	120
Anexo 8	Medidor de oxígeno disuelto .....	121
Anexo 9	Biorreactor tipo batch .....	122
Anexo 10	Biorreactor tipo turbidostato.....	123
Anexo 11	Biorreactor tipo PFTR .....	124
Anexo 12	Biorreactor tipo SSF .....	125
Anexo 13	Lavador de gases .....	126
Anexo 14	Datos de OTR .....	127
Anexo 15	Datos de OUR.....	128
Anexo 16	Absorbancias obtenidas del biorreactor tipo batch.....	129
Anexo 17	Absorbancias obtenidas del biorreactor tipoturbidostato. ....	130
Anexo 18	Absorbancias obtenidas del biorreactor tipo SSF.....	131
Anexo 19	Absorbancias obtenidas del biorreactor tipo PFTR.....	132
Anexo 20	Longitud de onda de trabajo. ....	133
Anexo 21	Desarrollo de las ecuaciones utilizadas para obtener el parametro de cinetica de crecimiento fungal .....	134
Anexo 22	Desarrollo de las ecuaciones utilizadas para obtener los parametros detransferencia de masa.....	135
Anexo 23	Análisis estadístico de la producción de ácido fumárico en tres ensayos utilizando el biorreactor tipo batchy turbidostato. ....	136
Anexo 24	Análisis estadístico de la producción de ácido fumárico en tres ensayos utilizando el biorreactor tipo ssf y pftr.....	137

**Lista de símbolos y abreviaturas.**

**Símbolos.**

$M_0$	Cantidad de masa celular fungal inicial.
$M$	Cantidad de masa celular fungal.
$t$	Tiempo.
$\lambda$	Cinética de crecimiento fungal.
$M^{1/3}$	Cantidad de biomasa fungal en un periodo de tiempo. ( $\text{gr}^{0.333} \cdot \text{h}^{-1}$ )
$C^*l$	Concentración de oxígeno disuelto saturado.
$Kla$	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno. ( $\text{min}^{-1}$ )
$\varepsilon$	Espacio hueco.
$\Psi$	Espacio ocupado.
$a$	Absorbancia de la muestra patrón.
$A$	Absortividad de los patrones.
$b$	Longitud del ancho de la celda del espectrofotómetro.
$c$	Concentración de la muestra patrón.



**Abreviaturas.**

SSF	Fermentador en estado solido.
PFTR	Reactor de tubo con flujo pistón.
RB1	Bioreactor tipo batch.
RB2	Bioreactor tipo turbidostato.
RB3	Bioreactor tipo ssf.
RB4	Bioreactor tipo turbidostato.
IUPAC	Unión internacional de química pura y aplicada.
TRH	Tiempo de residencia hidráulico.
MP1	Muestra nº1, de pan contaminado.
MP2	Muestra nº2, de pan contaminado.
MP3	Muestra nº3, de pan contaminado.
CMP1	Cepa aislada de la muestra MP1.
CMP2	Cepa aislada de la muestra MP2.
CMP3	Cepa aislada de la muestra MP3.
PD	Medio papa dextrosa.
OD	Oxígeno disuelto (ppm)
OTR	Cantidad de oxígeno que se disuelve en el medio( $\text{mgO}_2\text{l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ )
OUR	Cantidad de oxígeno pasa del medio a la célula. ( $\text{mgO}_2\text{l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ )
CI	Concentración de oxígeno disuelto. (ppm)
HP	Caballos de fuerza.



## RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de producción de ácido fumárico utilizando una cepa nativa de *Rhizopus sp.* en cuatro tipos diferentes de sistemas de bioreacción configurados en unidades independientes (bioreactores). El procedimiento se inició con el aislamiento, caracterización e identificación de un microorganismo fúngal de carácter nativo y del orden mucoral, específicamente del género *Rhizopus*; este hongo fue obtenido a partir de muestras de pan contaminado. Una vez obtenida la cepa, se inoculó en medio PD complementado con cloranfenicol a un *seed reactor* en el cual la cepa fúngal se masificó y, posteriormente, se crioconservó en glicerol al 10% a  $-4^{\circ}\text{C}$ . La cepa nativa de *Rhizopus sp.* obtenida se adaptó a un medio especial de producción específico para ácido fumárico; para ello, se conformó un grupo de tubos de ensayo con diferentes concentraciones de medio de producción y de medio PD; después, se utilizó la cepa que creció en el tubo con 75% de concentración de medio de producción y se conformó un nuevo *seed reactor* consiguiendo de esta manera el inóculo fúngal adecuado para alimentar a todas las unidades de biorreactores ensayados en este trabajo, adicionalmente se determinó la cantidad de esporas del inóculo utilizado en todos ellos a través de un conteo

celular usando la Cámara de Neubauer. Posteriormente, se diseñó y configuró experimentalmente cuatro diferentes biorreactores: a) tipo *batch* o quimostato, b) tipo continuo o turbidostato que trabajaron en medio sumergido; c) en sustrato sólido (SSF); y d) tubular a flujo pistón (PFTR) que trabajaron en condiciones de medio sólido e inmovilizado, respectivamente. Los biorreactores (a) y (b) corresponden a reactores biológicos completamente agitados y con la característica principal de usar un ambiente elevado en cantidad de agua (superior al 95%) mientras que los tipos (c) y (d) utilizaron ambientes con proporciones de agua inferiores al 80% con lo que permitieron la colonización fungal en superficies sólidas (bagazo de yuca y alginato de calcio, respectivamente) El tipo (b) se diferenció del tipo (a) en que el primero trabajó con flujos másicos de entrada y salida hacia y desde el tanque principal. Los tipos (c) y (d) se caracterizaron por poseer una operación continua en cada una de sus configuraciones. Cada uno de los tipos de bioreactores ensayados adquirieron diferentes especificaciones que permitieron su correcto funcionamiento; y utilizando complementariamente, el reactor biológico tipo *batch* se logró evaluar la cinética de crecimiento fungal de *Rhizopus sp.* y la transferencia de oxígeno en medio de producción líquido, lo cual permitió caracterizar funcionalmente la cepa fungal aislada. Para determinar la bioproducción de ácido fumárico en cada unidad de estudio se ejecutaron tres ensayos cuyo muestreo permitió evaluar un período completo de cuatro días y a diferentes intervalos de tiempo. Se utilizó la técnica de espectrofotometría para cuantificar la concentración de ácido fumárico producido como metabolito extracelular por la cepa fungal aislada. El bioreactor tipo *batch* proporcionó una concentración máxima de 0.0145 mg/ml, el tipo turbidostato de 0.0009 mg/ml, el tipo PFTR de 0.0003 mg/ml y por último el biorreactor tipo SSF de 0.0017 mg/ml, lo cual permitió concluir que la cepa nativa de *Rhizopus sp.* aislada presentó la mejor *performance* para generar ácido fumárico en mayor concentración utilizando unidades de biorreacción con alta proporción de contenido acuoso (>95%) y en condiciones de operación como sistema completamente cerrado (*batch*).

**Palabras clave:** *Rhizopus sp.*, ácido fumárico, *batch*, turbidostato, SSF y PFTR.



## ABSTRACT

In this study was investigated the capacity of fumaric acid production using a native strain of *Rhizopus sp.* in four different types of bioreaction systems configured in separate units (bioreactors ). The procedure began with the isolation, characterization and identification of a fungal microorganism of the mucoral order, specifically the genus *Rhizopus* ,with a native character obtained from samples of contaminated bread , once obtained the strain was inoculated in PD medium supplemented with chloramphenicol on a seed reactor in which the fungal strain massified and then it was cryopreserved in 10% glycerol at  $-4^{\circ}\text{C}$ . The native strain of *Rhizopus sp.* obtained was adapted to a specific medium special for fumaric acid production, for the testing it is formed a group of test tubes with different concentrations of production medium and PD , then used one that scored highest activity to 75% and formed getting a new seed reactor suitable fungal inoculum to feed all bioreactors units tested in this work, additionally it was determined the amount of spore inoculum used in all of them through a cell count using a neubauer's camera. Subsequently, we designed experimentally a set of four different bioreactors: a) type *batch* or quimostat, b) continuous or turbidostat that worked on submerged médium , c) solid substrate (SSF), and d) tubular

plug flow (PFTR) that worked in solid medium conditions and immobilized, respectively. Bioreactors (a) and (b) are completely agitated bioreactors with the main feature of using an elevated environment of water (over 95%) while the type (c) and (d) used environments with proportions of water of 80%, which allowed fungal colonization on surfaces (cassava bagasse and calcium alginate, respectively) and showed capacity to exude fumaric acid under these conditions. The type (b) differed from the type (a) in that the first worked with mass flows of entry and exit to and from the main vessel. For the kinds (c) and (d) were characterized by a continuous operation in each of its settings. Each of the types of bioreactors acquire different specifications that allowed proper operation, and using, in addition, the *batch* type bioreactor was achieved assess fungal growth kinetics of *Rhizopus sp.* and oxygen transfer in liquid production medium which allowed functionally characterize the isolated fungal strain. To determine the bioproduction of fumaric acid in each study unit executed were three trials which allowed sampling evaluate a full four days and at different time intervals and was used the technique of spectrophotometry to quantify the concentration of fumaric acid produced as extracellular metabolite fungal strain isolated. The *batch* type bioreactor provided a maximum concentration of 0.0145 mg/ml, the type turbidostat 0.0009 mg/ml, the type PFTR of 0.0003 mg/ml and finally the type SSF bioreactor 0.0017 mg/ml. This led to the conclusion that the native strain of *Rhizopus sp.* isolated showed the best performance to generate higher concentration fumaric acid using bioreaction units with a high proportion of water content (> 95 %) and operating conditions as completely closed system (*batch*)

**Key words:** *Rhizopus sp.*, fumaric acid, *batch*, turbidostat, SSF and PFTR

## CAPITULO I

### INTRODUCCIÓN

#### 1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.

El moho *Rhizopus sp.*, es un hongo saprófito que crece en condiciones adecuadas de temperatura y de humedad en alimentos ricos en almidón. El ácido fumárico es un metabolito extracelular exudado naturalmente por esta cepa fúngal; actualmente este ácido orgánico es sintetizado en forma química por medio de la isomerización del ácido maleico, lo cual genera altos gastos de producción y efluentes residuales con una amplia cantidad de químicos contaminantes; por lo que, en busca de intensificar la producción limpia y eficiente de ácido fumárico se hace necesaria su investigación en el campo biotecnológico utilizando sistemas de biorreacción que lo sinteticen biológica y naturalmente utilizando cepas microbianas fúngales nativas de este género capaces de construir rutas metabólicas que utilicen sustratos orgánicos con alta eficiencia, productividad y selectividad.

Entre las mayores aplicaciones del ácido fumárico puede mencionarse que es un ácido orgánico altamente utilizado industrialmente como intermediario en síntesis químicas en

reacciones de esterificación, también es utilizado como aditivo alimenticio, anti-oxidante, y acidulante en industria alimentaria, biocorrector de pH y ampliamente utilizado en industria farmacéutica para preparar drogas terapéuticas debido a sus propiedades de baja toxicidad y baja absorción de agua (Strapasson et al., 2008), es usado como coagulante en la elaboración de quesos y como aditivo conservador en otros alimentos; su uso como edulcorante es extremadamente importante ya que puede ser comparado con la sacarina ya que el ácido fumárico puede ser consumido ilimitadamente sin generar problemas en la salud humana.

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

El trabajo se justifica debido a que los resultados obtenidos en la producción de ácido fumárico mediante fermentación y el uso de reactores biológicos son capaces de generar incremento en la producción de este ácido orgánico a nivel industrial; además, el uso de estos reactores biológicos para la producción de ácido fumárico genera una innovación en este tipo de bioprocesos y los alcances a los que se puede llegar con el uso de este tipo de sistemas en el sector industrial y alimentario son completamente deseables. De otro lado, junto con ello los sistemas fermentativos propuestos reemplazarían a los métodos químicos de producción del ácido fumárico a razón de la disminución de los costos de producción dentro de un espectro netamente comercial y/o empresarial lo cual generaría abaratamiento en el precio de venta del producto para el alcance del ciudadano promedio e incluso la creación de un gran número de puestos de trabajo, por ende lograría incrementar las utilidades económicas de los trabajadores suscitando en general un desarrollo cultural, tecnológico y social en la región donde se produzca ya que actualmente el ácido fumárico es producto de importación de países desarrollados como Venezuela, México y Estados Unidos por sus múltiples aplicaciones y usos como ácido orgánico. Adicionalmente, este bioproceso sería capaz de mitigar el impacto ambiental negativo de los efluentes producidos por las empresas químicas que elaboran el ácido fumárico a partir de la isomerización del ácido maleico y que generan un deterioro de los ecosistemas donde son vertidos en aguas altamente acidificadas.

### 1.3 HIPÓTESIS.

Debido a que los microorganismos de orden mucorales y del género *Rhizopus* son productores biológicos y naturales de ácido fumárico y que son fácilmente aislados, caracterizados e identificados de pan común deteriorado biológicamente, es posible obtener ácido fumárico de origen biológico en diferentes configuraciones de bioreactores controlados para contrastar su producción utilizando una cepa nativa de *Rhizopus sp.* aislada de pan contaminado fungalmente.

### 1.4 OBJETIVOS.

#### GENERAL

Evaluar la capacidad de producción de ácido fumárico, utilizando una cepa nativa de *Rhizopus sp.* en biorreactores tipo *batch*, turbidostato, SSF y PFTR.

#### ESPECÍFICOS.

- Aislar, seleccionar e identificar una cepa nativa de *Rhizopus sp.* a partir de muestras de pan contaminado.
- Determinar los parámetros cinéticos de crecimiento fungal de *Rhizopus sp.* y de transferencia de masa en el biorreactor tipo *batch*.
- Diseñar y configurar físicamente biorreactores tipo *batch*, turbidostato, SSF y PFTR.
- Comparar cuantitativamente la obtención de ácido fumárico a partir de una cepa de *Rhizopus* utilizando diferentes reactores biológicos.

## 1.5 VARIABLES E INDICADORES.

### VARIABLES INDEPENDIENTES.

<b>Variables independientes</b>	<b>Indicadores</b>	<b>Unidad</b>
Reactor biológico	RB1,RB2,RB3,RB4	-
Muestra de pan contaminado	MP1,MP2,MP3	-

Tabla 1. Variables independientes, con sus correspondientes indicadores y unidades.

### VARIABLES DEPENDIENTES

<b>Variables dependientes</b>	<b>Indicadores</b>	<b>Unidad</b>
Cepa nativa de <i>Rhizopus sp.</i>	CMP1,CMP2,CMP3	-
Cantidad de medio de producción.	Volúmen de medio de producción.	litro
Concentración de ácido fumárico.	Absorbancia	nm

Tabla 2. Variables dependientes con sus correspondientes indicadores y unidades.

## **CAPITULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 LA INDUSTRIA BIOTECNOLÓGICA Y PERSPECTIVAS.**

Uno de los logros alcanzados por el ser humano en los tiempos modernos ha sido el control de los organismos vivos desde niveles microscópicos. La biotecnología moderna nace gracias a los conocimientos de biología, química, física y otras ciencias relacionadas a campos de la salud y de ingeniería, la cual está siendo usada en campos como la agricultura, medio ambiente, medicina, productos alimenticios, y ramas farmacéuticas; lo cual convierte a la biotecnología como una de las “tecnologías de punta” de acelerado desarrollo en la última década (Arroyo. 1996), esta ciencia se ha constituido como uno de los campos de la actividad científico-técnica de mayor desarrollo y aplicación en la actualidad. Hasta ahora, la difusión de la biotecnología ha sido muy lenta; debido ello a la incertidumbre técnica y de mercado, incluso por los problemas legales vinculados con la propiedad sobre el conocimiento que ponen en riesgo los resultados obtenidos en los laboratorios antes de ser utilizados con un futuro comercial.

#### **2.2 EMPLEO DE LOS HONGOS EN REACTORES BIOLÓGICOS EN EL CAMPO INDUSTRIAL**

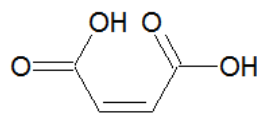
El uso de los hongos filamentosos a través del tiempo en el campo de la biotecnología para la obtención de productos biotecnológicos ha sido lato, desde el descubrimiento de la

penicilina por Alexander Fleming en los años cuarenta, hasta el momento de descubrimiento de los hongos como productores naturales de ácidos orgánicos, polisacáridos, reguladores del crecimiento de plantas, micotoxinas, antibióticos, toxinas, pigmentos y alcaloides, entre otros.

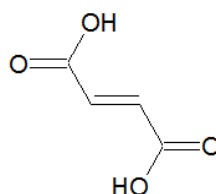
En general los hongos son caracterizados por secretar sus metabolitos secundarios al medio de crecimiento; por ello, el crecimiento fungal suspendido en medio líquido en el interior de biorreactores con agitación provee de facilidades en la obtención de los metabolitos secundarios, pero a su vez genera cambios reológicos en su composición, debido a que en cultivos sumergidos los organismos filamentosos pueden cambiar su morfología de *pellets* compactos a una suspensión homogénea de todo su micelio, esta homogenización vuelve viscoso el medio de cultivo, generando así atascos en las zonas cercanas a los *impellers* y viscosidades altas en las regiones cercanas a las paredes del biorreactor, esto genera un decrecimiento en la transferencia de masa y en la transferencia de calor, por lo que requiere de una mayor fuente de energía para su mezclado.

### 2.3 ÁCIDO FUMÁRICO.

Es un compuesto orgánico de origen natural y sintético de forma cristalina, con la estructura química de un ácido di-carboxílico, es conocido también como ácido (*E*)-butenodioico en la nomenclatura IUPAC, perteneciente a la categorización de los ácidos dicarboxílicos alifático insaturados. A continuación se definirán cada uno de los términos, primeramente los ácidos dicarboxílicos que son compuestos por una estructura carbonada en la cual se encuentran dos grupos funcionales de tipo carboxilo (-COOH), secundamente la definición de que son ácidos alifáticos corresponde únicamente a que su estructura no es de un carácter aromático y finalmente al ser denominados insaturados quiere decir que poseen enlaces dobles en su estructura química, siendo representado con su fórmula desarrollada en la **Figura N°1**.



Ácido Maleico



Ácido Fumárico

Figura N° 1. Estructura química del ácido maleico y del ácido fumárico.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>. ACD/3D Viewer: Chem Sketch. (Gutierrez. 1985)

El ácido fumárico está sub-categorizado dentro de los ácidos dicarboxílicos alifáticos insaturados; en los butenodioicos por contar con solo cuatro átomos de carbono. Los compuestos más importantes de esta categoría son el ácido maleico y el ácido fumárico, como ya se vio con anterioridad. El ácido fumárico y el ácido maleico son isómeros, ambos poseen una fórmula molecular idéntica  $C_4H_4O_4$  pero diferente estructura espacial, lo cual cambia las propiedades físicas y químicas de cada uno. Dentro de la isomería se encuentra la estereoisomería en la cual los dos compuestos poseen la misma conectividad entre sus uniones pero están dispuestos de forma diferente en el espacio. En el caso de los ácidos fumárico y maleico se genera una ubicación en lados opuestos (*cis*) y (*trans*) de los grupos funcionales, por lo cual son denominados isómeros *cis-trans*; esta isometría es característica de sustancias que presentan un doble enlace carbono-carbono, ya que en general no es posible la rotación libre alrededor del eje de doble enlace. En la formación *cis* en la que se representa al ácido maleico, los sustituyentes iguales se encuentran situados en una misma región del espacio respecto al plano que contiene el enlace carbono-carbono y en la formación *trans* en la que se representa al ácido fumárico, los sustituyentes

iguales se encuentran situados en una distinta región del espacio con respecto al plano que contiene al doble enlace carbono-carbono; en el sistema de nomenclatura Z/E adoptado por la IUPAC, equivalen a *cis/trans*; por ello al momento de colocarles un nombre, se refiere al ácido maleico como forma Z, mientras que al ácido fumárico como forma E. (Sharpe. 1993).

El ácido fumárico posee el número de registro CAS 110-17-8, este ácido es también conocido como ácido transbutenedioico o como trans-1,2 etileno dicarboxílico; es encontrado en estado sólido y comúnmente es comercializado en forma de gránulos o en polvo, y es de color blanco e inodoro. En la **Tabla N°3** se presentan las principales propiedades físico-químicas del ácido fumárico.

Propiedad (unidad)	Valor
Tamaño de partícula (um)	Tamaño medio: 87.6
Peso molecular (Kg/Kmol)	116.07
Densidad (Kg/m <sup>3</sup> )	1.625
Punto de inflamación (°C)	282
Punto de fusión (°C)	286
Punto de congelamiento (°C)	No procede.
Degradación (°C)	286
Punto de auto inflamación (°C)	740
pH solución acuosa(20°C/solución 5%)	2.020
Gravedad específica(20°C/4°C)	1.635
Presión de vapor(165°C) (mmHg)	1.7
Sensibilidad a carga estática	Posible.
Coeficiente Log (óctanol/agua)	0.25
Coeficiente Log (éter/agua)	0.007
Agua de cristalización.	2-3 moléculas de agua.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas del ácido fumárico.<sup>2</sup>

<sup>2</sup>. GTM, Grupo Transmerquim.

A continuación, se adjunta un cuadro de la solubilidad que posee el ácido fumárico, a diferentes temperaturas desde los 5°C hasta los 70°C, la solubilidad esta expresada en % w/w; esta relación hace referencia a la masa del soluto sobre la masa de la solución, en este caso agua. Se puede observar, que la solubilidad va aumentando en correlación con el aumento de la temperatura de la solución. Por ejemplo se puede disolver 0.28 g de ácido fumárico en 100 g de agua a 5°C y se obtendría una adecuada solución para realizar análisis químicos.

Temperatura (°C)	Solubilidad (%w/w)
5	0.28
10	0.34
20	0.50
30	0.73
40	1.08
50	1.58
70	3.42

Tabla 4. Solubilidad del ácido fumárico a diferentes temperaturas.<sup>3</sup>

<sup>3</sup>. I&ECresearch, Industrial & Engineering Chemistry Research.

Referente a la síntesis de ácido fumárico, se conoce la planta llamada fumarina (*fumarina officinalis*), a la cual debe el nombre el ácido, esta planta es una hierba de la familia de las fumariáceas que crece hasta 60cm de altura, con tallos erectos, lisos y hojas compuestas con foliolos lanceolados y planos; entre sus componentes se encuentran alcaloides como fumarina, fumaricins, estilopina, fumarilina y ácidos orgánicos como el ácido caféico, el ácido tánico y el más importante, el ácido fumárico, este ácido es también generado por los hongos del género *Rhizopus sp.*; del cual se hablara más adelante. El ácido fumárico o también conocido como fumarato, es producido de forma natural por medio de rutas

metabólicas dentro de la célula como en el ciclo de la urea, en donde el fumarato es un subproducto generado por el corte de la argininosuccinato liasa en el argininosuccinato, el fumarato producido en la mitocondria celular es utilizado después en el ciclo del ácido cítrico.

La succinato deshidrogenasa es una enzima que en el ciclo del ácido cítrico, cataliza la deshidrogenización estereoespecífica de succinato a fumarato, la enzima está unida fuertemente pero no de forma covalente a una unidad de flavín adenín dinucleótido (FAD) en su forma oxidada, e interviene en las reacciones metabólicas de óxido reducción. En el ciclo del ácido cítrico se produce la oxidación del succinato generando así  $\text{FADH}_2$ , que se debe de reoxidar antes que la succinato deshidrogenasa pueda emprender otro ciclo catalítico.

De otro lado, químicamente el ácido fumárico puede obtenerse por medio de diferentes métodos, uno de ellos es la separación de HBr del ácido bromosuccínico por calentamiento con álcalis diluidos; también, por medio de la formación de anhídrido maleico generando como subproducto principal el ácido fumárico y adicionalmente se puede sintetizar por medio de la oxidación catalítica del benceno con oxígeno a  $450^\circ\text{C}$ . Otro medio de obtener el ácido fumárico es por la transformación del butano proveniente de la destilación del petróleo, siendo considerado como un subproducto de las refinerías petroleras, el butano es convertido a anhídrido maleico por medio una oxidación catalizada con óxido de vanadio y fósforo (VPO), el anhídrido maleico por acción del agua es transformado en ácido maleico y de allí a ácido fumárico explicado a continuación.

Industrialmente el ácido fumárico es obtenido por la transformación del ácido maleico a altas temperaturas cercanas a  $150^\circ\text{C}$ , así como también como con radiación UV; por su parte, el ácido maleico se isomeriza para formar ácido fumárico, pero esta reacción es acompañada de una parcial descomposición del fumarato. La isomerización también ocurre por medio del calentamiento en soluciones acuosas a una temperatura de  $130^\circ\text{C}$  del ácido maleico en tubos sellados, junto con varios ácidos y sales.

Finalmente, el ácido fumárico tiene una producción estimada mundial superior a 60.000 toneladas anuales (Hacking. 1986), porque es usado como sinérgico de

antioxidantes debido a que es conocido que la combinación de varios antioxidantes resulta más efectiva en la preservación de los alimentos, a esta acción se le conoce como “efecto sinergista”, dentro de esta denominación pertenecen las sustancias que refuerzan la acción de los antioxidantes como lo son el ácido cítrico, fosfórico y fumárico; estos compuestos forman complejos con los iones de los metales pesados y por este mecanismo se impide la auto-oxidación lipídica debido a la catálisis con iones de metales pesados.

Es también usado como preservante del color de los productos cárnicos, en especial en la carne curada, debido a que este tipo de carne se le adiciona nitratos y nitritos para aumentar su conservación, la presencia de estos compuestos en la carne ayuda a matar las bacterias, produciendo un sabor característico y dando a la carne un color rosado o rojo, este proceso es debido a que el nitrito se descompone en la carne formando óxido nítrico, y este a su vez se une al átomo de hierro del grupo hemo de la mioglobina reduciendo su oxidación y dando un color rojizo a la carne; pero cuando el alimento se cocina a altas temperaturas se desarrollan nitrosaminas las cuales son altamente carcinógenas, debido a esto es que se adiciona también a la carne ácido fumárico porque así se impide la formación de nitrosaminas.

El ácido fumárico esta categorizado también como un acidulante, ya que genera un sabor astringente a los alimentos, usado por ello en bebidas con sabor a uva y tamarindo donde se espera la astringencia; el ácido fumárico es uno de los ácidos que genera mayor acidez en los alimentos por la cantidad de iones hidrógeno que libera en estado acuoso, siendo comprobado porque en una solución 0.1N su pH es de 2.21, provocando un acidez mayor a la del ácido málico y el tartárico, pero menor que el ácido cítrico. (Avalos. 1985)

Otras aplicaciones que se le dá al ácido fumárico es como aditivo para bebidas deshidratadas y gelatinas, debido a que posee una baja higroscopicidad, ya que no absorbe humedad del aire y protege los aditivos de las bebidas, permitiendo también una reducción de costos al momento del almacenaje del ácido fumárico, ya que otros ácido necesitan condiciones especiales para ello, debido a que la humedad es un factor crítico en la conservación. El ácido fumárico es usado también como emulsificante y estabilizante en productos alimenticios especialmente en preparados de panadería, utilizado como leudante, activado por calor en las tortillas de harina de trigo, ya que como posee una disolución

lenta genera que el ácido fumárico se disuelva hasta que se haya finalizado el reposo y horneado de la tortilla. Mejora la textura y realza el sabor de varios dulces como postres basados en alginato como las gomas azucaradas y malvaviscos. El ácido fumárico puede utilizarse como coagulante en la preparación de quesos a baja temperatura o también como coadyuvante en la coagulación de las caseínas por parte de las enzimas proteolíticas. Este ácido, combinado con ésteres de ácido gálico y ascórbico sirve como antioxidante en margarinas, quesos y otros productos lácteos. Además proporciona un agradable sabor al ser utilizado como acidulante en la preparación de vinos, ya que se ha encontrado que el ácido fumárico inhibe los procesos de fermentación secundarios como el malo-láctico que se presentan luego del envasado de la botella, y disminuyen la calidad del producto. Se ha empleado también en dietas de cerdos con éxito en el incremento de peso, mejorando la actividad digestiva y la disminución de bacterias patógenas en el sistema digestivo del animal, en este rubro es usado también para el engorde de pollos y ganado vacuno. El ácido fumárico es usado incluso también en la industria farmacéutica como efervescente y lubricante en la preparación de grageas. La existencia de derivados del ácido fumárico como los fumaratos de hierro y de magnesio permiten al organismo ser suministrados por estos iones, ya que estos compuestos no poseen sabores desagradables y no irritan el sistema digestivo. Es usado industrialmente por ser un ácido insaturado en la producción de copolímeros de acetato de vinilo y cloruro de vinilideno, que son usados para fabricar papeles y empaques de alimentos; también es utilizado en la producción de látex de estiréno butadieno para su uso en pinturas y esmaltado, usado principalmente en la confección de resinas alquídica modificadas que son biocompatibles y usados en la fabricación de dentaduras e implantes óseos.

#### **2.4 EL GÉNERO *RHIZOPUS SP.***

*Rhizopus sp.* es un género de mohos inofensivos que incluye especies de hongos filamentosos cosmopolitas, característicos por ser saprófitos. Su clasificación taxonómica ha sido reportada por Bold (1909) y se adjunta seguidamente:

Reino: Fungi.  
División: Zygomycotina.  
Clase: Zygomycetes.  
Orden: Mucorales.  
Familia: Mucoraceae.  
Género: Rhizopus.  
Nombre común: Moho del pan

#### 2.4.1. PRINCIPALES ESPECIES.

a) ***RHIZOPUS STOLONIFER.***

*Rhizopus stolonifer*, también conocido como *Rhizopus niger* o *Rhizopus nigricans* es uno de los mucorales más frecuentes. Su temperatura de crecimiento va desde los 10°C hasta los 33°C. Se encuentra comúnmente en suelos con compost, pulpa de madera, estiércol, frutos en descomposición y semillas.

Morfológicamente, el hongo filamentosos presenta esporangióforos sin ramificar, de color pardo oscuro que nacen de un estolón, y que del cual se desarrollan los rizoides; poseen también esporangios esféricos de color negro de hasta 275  $\mu\text{m}$  de diámetro, seguidos por una columela esférica y esporangiósporas negras de 8 a 15  $\mu\text{m}$ . Forma colonias de crecimiento rápido de aspecto consistente, con denso micelio aéreo, algodonoso, al principio blanco y con el tiempo se van tornando gris oscuro por la presencia de esporas.

b) ***RHIZOPUS OLIGOSPORUS.***

*Rhizopus oligosporus*, es conocido por ser utilizado como levadura en la producción casera de tempeh. Las esporas producen el micelio de color blanquecino y esponjoso que va uniendo los granos de soja y creando así un conglomerado de los granos de soja parcialmente fermentados. Este hongo, produce también un antibiótico inhibidor de bacterias gram-positivas, por lo cual se ha reportado que las personas que consumen tempeh no sufren de

muchas infecciones gastrointestinales a lo largo de su vida, a comparación de las personas que no lo consumen.

Morfológicamente no cubren toda la placa petri con su micelio pero este suele ser bien definido, es de un color café-pálido, con esporangios de color café y el reverso de la colonia es incolora o de un color café- pálido.

**c) *RHIZOPUS ORYZAE.***

El *Rhizopus oryzae* es conocido también como *R. arrhizus*, es el agente más común de la zygomicosis, siendo causante de más del 60% de los casos confirmados; encontrándose distribuido alrededor del globo en regiones tropicales y subtropicales. Este hongo es utilizado para la fermentación de diferentes bebidas y comidas en Indonesia, China y Japón en donde produce un alcaloide denominado agroclavina que es tóxico para humanos y animales en grandes cantidades.

En agar Sabouraud, las colonias crecen rápidamente a una temperatura café, dependiendo de la cantidad de esporas. Los esporangióforos miden 1500 um, son no septados, ramificados con crecimiento de estolones y a partir de ellos se observa la presencia de rizoides en grupos de tres o más. La columela es globosa, incluso plana en la base de color gris oscuro, las esporangiósporas son angulares, subglobosas con un tamaño de 8 um de largo.

**d) *RHIZOPUS AZYGOSPORUS.***

*Rhizopus azygosporus* ha sido reportado como agente causante de tres casos fatales de infección gastrointestinal en bebés prematuros. Previamente fue aislado de sustratos sólidos fermentados como el tempeh y la comida fermentada de soja. Las colonias de este hongo son de un color blanco-verdoso oscuro, generando rizoides cafés-pálidos. Los esporangióforos son de color café, con una columela subglobosa a globosa, y con esporangios esféricos de color gris oscuro de 50-100 um de diámetro. Esta especie de *Rhizopus* se

caracteriza por presentar azygosporas de color café pálido de forma esférica o globosa de 30-70  $\mu\text{m}$  de diámetro.

**e) *RHIZOPUS SP. COMO UN HONGO COSMOPOLITA.***

Varias investigaciones han reportado que este organismo está presente en varias regiones del mundo, siendo problemático para la agricultura, ya que afecta a varias cosechas tales como maíz, papa, camote y otros, porque presentan como fuente de carbono el almidón; y ya que el género de *Rhizopus sp.* posee un alto poder amilolítico, puede descomponer estos tipos de alimentos.

Este género está generalmente presente en el medio ambiente a temperaturas de 20°C y 28°C; cabe resaltar que se ha reportado que a la temperatura de 28°C es la temperatura óptima para el crecimiento del moho, otro factor que permite el crecimiento del organismo es el porcentaje de humedad relativa que se encuentra en el ambiente ya que a una temperatura de 23°C se tiene un porcentaje de 75% a 84% de humedad relativa, siendo este valor óptimo para el crecimiento del hongo. (Pilco. 1989)

El género *Rhizopus* genera problemas principalmente en el almacenamiento del pan, ya que este microorganismo prefiere los alimentos ricos en carbohidratos y altos en humedad, muchos de estos microorganismos crecen y se desarrollan en productos con un  $a_w > 0.8$  (Frazier. 1978); teniendo al pan como un producto adecuado para el crecimiento del hongo.

#### **2.4.2. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS.**

En su morfología microscópica posee hifas aseptadas o cenocíticas y multinucleadas, pero en algunos casos aparecen septos, poseen varios estolones entre el micelio que conectan los grupos de esporangióforos que normalmente no están ramificados, en la base de los esporangióforos se forman rizoides que se localizan entre los entrenudos de los estolones; el esporangióforo termina en

un esporangio redondo, oscuro y que contiene una columela hemisférica con varias esporas ovales de color café y que oscurecen al momento de madurar.

#### 2.4.3. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS.

La morfología macroscópica del género *Rhizopus sp.* en una placa petri es la de un micelio algodonoso de crecimiento rápido, cuyo color al principio es blanco y luego va tornándose de un color gris o café-amarillento, y por el reverso de la colonia es blanco grisáceo.

#### 2.4.4. REPRODUCCIÓN.

Según su reproducción, se clasifican como hongos perfectos porque poseen una reproducción asexual y también una reproducción sexual (Montoya. 2008). La reproducción asexual de los hongos filamentosos como es el caso del género *Rhizopus sp.* se lleva a cabo por medio de esporas que posteriormente germinaran en nuevos hongos, estas esporas son producidas en gran cantidad, con las características de ser pequeñas y livianas, para que con las corrientes de aire se puedan dispersar fácilmente y así de esta manera se originen nuevos hongos en los lugares donde se encuentren las condiciones adecuadas para su crecimiento (García. 1985). De los varios tipos de las esporas asexuales existentes en los hongos, las siguientes son las principales: esporangiósporas, artrosporas, clamidosporas y conidiosporas; pero en el caso del género *Rhizopus sp.* la espora asexual utilizada para su reproducción es la esporangiospora. Las esporangiósporas están localizadas dentro del esporangio, que es un saco formado en la porción terminal del esporóforo, que es llamado en este caso esporangióforo y en el momento en que se rompe el esporangio debido a la maduración de las esporangiósporas estas son liberadas. Las esporas son distribuidas gracias a corrientes de aire hacia diferentes medios, que al ser apropiados puedan generar la germinación de las esporas. La germinación consiste en la activación del metabolismo, seguido por el abultamiento de la espora de la cual se origina un pequeño tubo germinativo, este tubo se alarga

hasta convertirse en una hifa que se ramifica y continúa desarrollándose hasta dar lugar a un nuevo organismo.

Sexualmente el género *Rhizopus sp.* se reproduce por gametangios que son organelas sexuales que generan cigosporas de origen homotálico (poseen estructuras masculinas y femeninas, con la capacidad de autofertilización) o heterotálico (poseen estructuras masculinas y femeninas, pero no pueden autofertilizarse y necesitan de otras células que provengan de otras colonias), morfológicamente las estructuras masculinas y femeninas son diferentes, el primero se denomina anteridio y el segundo oogonio; las cigosporas forman un esporangio al germinar, generando así un micelio. En la reproducción sexual se da la fusión de núcleos compatibles, que posteriormente darán origen a las esporas sexuales, estas esporas se forman con menos frecuencia que las esporas asexuales y a menudo se forman bajo ciertas condiciones especiales. Los núcleos de las hifas en el caso de la mayoría de los hongos son haploides, el proceso da inicio cuando las hifas de los dos micelios comienzan a liberar moléculas de señalización sexual denominadas feromonas; si los micelios son de distintos tipos de apareamientos, las feromonas de cada uno se unirán con los receptores del otro, lo que generará una compatibilidad entre los micelios, al encontrarse las hifas estas se fusionarán en sus protoplasmas, este proceso es conocido como plasmogamia, lo que permite poner dos juegos de cromosomas y convertirse en una célula diploide. La célula al fusionar dos citoplasmas con dos tipos de núcleos diferentes entra en un estado heterocariótico, ya que posee diferentes núcleos dentro de la célula. Una vez concluido la plasmogamia, pueden pasar de horas a siglos para que se pueda seguir con el siguiente paso en el ciclo sexual, denominado cariogamia, en el cual los núcleos haploides se fusionan y producen una célula diploide, generándose así un cigoto que luego por medio de la meiosis se generaran cuatro núcleos, cada uno con un juego de cromosomas, los que a su vez generaran nuevas esporas sexuales.

En el caso del género *Rhizopus sp.*, se generan cigosporas o zigosporas como ya se mencionó anteriormente; las hifas se unen en sus porciones

apicales; en este tipo de esporas la meiosis se produce durante la germinación de la spora y la hifa que va emergiendo de la zigospora se convierte en un esporangio donde se formarán las esporangiósporas y comenzara el ciclo de nuevo.

#### **2.4.5. SECRECIÓN DE METABOLITOS.**

Existe una relación entre el crecimiento de las hifas de los hongos filamentosos y la secreción de los metabolitos secundarios, esta secreción ha sido reportada en los ápices de las hifas de los hongos, los ápices están libres de todo tipo de organelas, excepto por un largo número de vesículas de diferente tamaño y parecen estar relacionadas con la membrana plasmática. Esto da la idea de que las vesículas están relacionadas con algún tipo de transporte de los metabolitos secundarios a través de la membrana.

### **3. MULTIPLICACIÓN DE LA CEPA NATIVA POR MEDIO DE UN *SEED REACTOR*.**

La conformación de un *seed reactor* proveerá de una cantidad suficiente de células activas para inocular en los fermentadores de producción. Las células crecen bajo condiciones que permiten el aumento de las densidades celulares en un corto tiempo, cuando la concentración celular llega a un cierto nivel, todo el volumen debe de ser transferido a otro contenedor donde es colocado con medio de cultivo fresco, esto se realizará dos a cuatro veces, hasta que se consiga una concentración celular adecuada.

El diseño de un *seed reactor* es similar al de un biorreactor para producción, pero se tiene que tener mucho cuidado para minimizar el riesgo de contaminación dentro del reactor, ya que si el *seed reactor* fuese contaminado o el diseño no fuese el óptimo, todo el proceso de producción estaría comprometido. El *seed reactor* tiene otra importante función de adaptación, la cual consiste en permitir a las células a adaptarse a las condiciones del ambiente y de los nutrientes al cual deberá de encontrarse más tarde en los fermentadores de producción. El *seed reactor* deberá estar expuesto a la temperatura, pH y oxigenación

óptima para la cepa de *Rhizopus sp*, como ya se vio, la temperatura óptima de la cepa es de 28°C y un pH cercano a 5, para esto se puede utilizar un chaqueta y regular el pH con sales o ácidos.

Cabe resaltar el hecho, que en el trabajo de tesis se realizaron dos multiplicaciones en *seed reactor*, la primera fue para poder obtener la suficiente cantidad de masa celular en medio PD, para poder proseguir con la fase experimental y la segunda fue realizada después de completar la fase de adaptación al medio de producción que será explicada más adelante.

#### 4. CRIOCONSERVACIÓN POR MEDIO DE HIBERNACIÓN.

La criobiología es la ciencia que estudia la preservación de los materiales biológicos enfriándolos a temperaturas criogénicas. Teniendo como objetivo principal, la conservación de las células vivas mediante el uso de bajas temperaturas, evitando el proceso de envejecimiento y degradación celular. La criopreservación, es un aspecto aplicado a la criobiología con el objetivo de minimizar el daño de las bajas temperaturas a los materiales biológicos, en los cuales están incluidos los hongos, permitiendo su almacenamiento durante largos periodos de tiempo. El almacenamiento de células permite la repetición de experimentos utilizando material de una misma fuente y la distribución de muestras almacenadas.

Existen tres opciones de almacenamiento: el cultivo a 37°C, la hibernación a 4°C y la criopreservación a -130°C. Para la conservación de la cepa de *Rhizopus sp*. se utilizará el método de hibernación ya que existe una facilidad del uso de los equipos que puedan llegar a una temperatura de 4°C, lo cual permitirá una conservación de la cepa por 8 días.

Existe un problema al momento de realizar el enfriamiento de las células, y es la formación de cristales, los cuales generan un daño celular directo, en el momento en que la congelación da inicio a unos 0°C, la presencia de solutos impide la formación hielo, pero cuando el enfriamiento continua a -15°C, comienzan a formarse cristales de hielo en el espacio extracelular, esta formación de hielo extracelular, genera cambios en la permeabilidad en la membrana celular, dando lugar a una salida de agua de la célula, lo

cual aumenta en tamaño de los cristales; la concentración de los solutos dentro de la célula comienzan a alcanzar niveles tóxicos para ella; si la velocidad de enfriamiento es muy rápida puede evitarse totalmente la formación de cristales, lo que se conoce como vitrificación.

El proceso de vitrificación es favorecido por la adición de crioprotectores, que impiden que las moléculas de agua se unan para formar hielo, un ejemplo de este tipo de compuesto es el glicerol.

## **5. MEDIO DE CULTIVO EN LA MULTIPLICACIÓN DE LA CEPA NATIVA DE *RHIZOPUS SP.***

El medio de cultivo recomendado para el desarrollo de hongos; es un medio que contenga una alta concentración de glucosa, la presencia de un antibiótico y de un pH ácido, por ello se usa el medio de cultivo complejo PD suplementado con cloranfenicol (**Anexo N°1**), el cual es un antibiótico de amplio espectro que es capaz de inhibir una extensa variedad de bacterias gran negativas y gran positivas, pero en algunos casos puede generar un efecto inhibitor en hongos patógenos.

## **6. CINÉTICA DE CRECIMIENTO FUNGAL.**

En los sistemas biológicos, el crecimiento puede ser definido como el aumento ordenado en su totalidad de los componentes que lo conforman. Durante un periodo de crecimiento equilibrado (fase logarítmica o exponencial) la célula no incrementa sólo su contenido de productos de reserva dentro de la misma, sino que también se presenta incremento de la biomasa que va acompañando la duplicación de muchas propiedades medibles de la población celular, como por ejemplo las proteínas, el RNA o el DNA. Este crecimiento equilibrado de las células facilita el hecho de poder medir la velocidad de crecimiento, ya que con cualquier componente medible se puede determinar la velocidad de crecimiento de la población.

La cinética de crecimiento microbiana es la velocidad de crecimiento celular, en el S.I está dado por la masa celular (g) que crece en determinado tiempo (t). También se le define como la transformación o variación de la concentración celular con respecto al tiempo, definiendo así que la concentración celular es la cantidad de masa celular (g) en un medio líquido (l).

La determinación de la cinética de crecimiento, depende de los cambios incrementales o decrementales que un sustrato en su mayoría puede sufrir, debido a que, los sustratos permiten el incremento de materia celular, y al momento en que comienza a decrecer los sustratos, la masa celular aumenta, caso parecido sucede con los productos generados, al momento de generarse productos el nivel de sustratos comienza a disminuir.

Para bacterias y levaduras los modelos utilizados para determinar la cinética de crecimiento son los modelos de crecimiento exponencial, logístico y diauxico; pero para cepas fungales es el modelo de crecimiento peletizado. Este modelo es representado en la **Ecuación 1**, presentada a continuación.

$$M^{1/3} = M_0^{1/3} + (1/3) \lambda t \quad (1).$$

En donde ( $M_0$ ) representa la cantidad de masa celular inicial, ( $M$ ) representa la cantidad de masa celular, ( $t$ ) representa el tiempo en que esté en funcionamiento el biorreactor y por último ( $\lambda$ ) representa la cinética de crecimiento fungal.

Pero para programas tradicionales como Microsoft Excel 2007, se realiza una simplificación de la **Ecuación 1**, obteniendo así la **Ecuación 2**.

$$M^{1/3} = (1/3) \lambda t + 0 \quad (2).$$

Utilizando los datos obtenidos durante la experimentación, se podrá obtener el valor de  $\lambda$ , y gracias a esto poder tener así una perspectiva de la velocidad de crecimiento de nuestra cepa en este caso del género *Rhizopus sp.*

## 7. TRANSFERENCIA DE MASA.

La transferencia de masa es la cantidad de material orgánico e inorgánico en una solución que es transportada desde un punto de máxima concentración hacia la célula para que esta sea transformada por medio de reacciones. Este tipo de transporte es dado por una velocidad, lo cual permite definir qué tan rápido este material puede ser transportado de un punto A a un punto B, pero este transporte siempre está dificultado por características físicas que tienen comúnmente el biorreactor diseñado como lo son: la alta viscosidad del medio de cultivo, altas concentraciones de sales en el biorreactor, disminución de la agitación en su interior y altos niveles de temperatura, entre otros.

Para poder determinar la transferencia de masa en el medio de cultivo que se encuentra en el interior del biorreactor se cuantifica la transferencia de oxígeno que pueda existir en este. El proceso de transferencia de oxígeno de una fase gaseosa a otra líquida se realiza en dos pasos, pero aun así la velocidad de transferencia de oxígeno es siempre muy rápida, ya que en el primer paso la resistencia de la película de gas es despreciable y esta fase no es la limitante en el transporte del  $O_2$  en el interior del líquido; en segundo lugar ocurre el paso de las moléculas de oxígeno de la interfase líquida a la masa del líquido, en este momento aparece el término llamado concentración de oxígeno en la masa total del líquido, que representa la cantidad de oxígeno disuelto en la fase líquida en un determinado tiempo.

La determinación de la transferencia de oxígeno se da por medio del uso de un serie de fórmulas y el conocimiento de ciertos términos. Por ello se debe de conocer dos muy importantes, OTR y OUR. OTR es la cantidad de oxígeno que puede pasar de una burbuja al medio líquido y OUR es la cantidad de oxígeno disuelto en el medio que puede ser transportado al interior de la célula; comúnmente, estos parámetros son medidos con instrumentos especializados para este tipo de medida, como lo es el multiparámetro o medidores simples de oxígeno disuelto, como ya se mencionó este tipo de transporte representa la cantidad de oxígeno (mg) en una solución (l) que es movilizada en un periodo de tiempo(s) dando como unidad de medida (ppm/s). Normalmente en el biorreactor el valor de OTR y OUR son iguales pero es deseable que los valores de OTR sean mayores que los de OUR, estas variaciones son generadas por que el oxígeno puede llegar a un

cierto de nivel en que ya no pueda disolverse en el medio de cultivo, este punto es denominado como concentración de oxígeno disuelto saturado ( $C^*L$ ).

Debido a que el transporte de oxígeno del exterior al interior del medio de cultivo se da por medio de un burbuja, es deseable que la burbuja sea lo más pequeña posible porque de esta manera la transferencia de oxígeno será más rápida, pero al ser la burbuja muy pequeña, los métodos de monitorización son escasos o incluso no existen, por ello se generó la constante denominada coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $Kla$ ) que tiene como unidades de medida ( $t$ ); esta constante nos da una idea de la transferencia de oxígeno en un volumen determinado, partiendo del área de transferencia de oxígeno que pueda brindar incluso la más diminuta burbuja.

En primer lugar, para poder determinar el valor de  $Kla$ , se debe de conocer a cuánto asciende el valor de OTR; para ello se utiliza la **Ecuación 3**, presentada a continuación.

$$OTR = OUR + \Delta CL/\Delta t \quad (3).$$

Los valores de  $CL$  y  $t$  son obtenidos experimentalmente, iniciando con un medio líquido sin oxígeno y poco a poco ir suministrando de una fuente de aire hasta llegar a un punto de saturación ( $C^*L$ ).

El valor de  $OUR$  es determinado por medio de ecuaciones lineales, utilizando los datos de la cantidad de oxígeno disuelto en el medio de cultivo cuando se inocula un microorganismo.

Utilizando estos valores, fácilmente se puede determinar el valor de OTR, en determinado tiempo en el interior del biorreactor. Por último para poder determinar el  $Kla$  se tendrá que utilizar la **Ecuación 4**.

$$Kla = (OTR / (C^*L - CL)) \quad (4).$$

Utilizando la ecuación presentada se determinara el  $Kla$  para cualquier momento en el interior del biorreactor, para luego hacer un promedio de los valores de  $Kla$  obtenidos y así obtener un valor único para todo el sistema.

## 8. BIORREACTORES TIPO *BATCH*, TURBIDOSTATO, SSF Y PFTR.

### 8.1 REACTORES BIOLÓGICOS.

En su definición, un reactor biológico o biorreactor es un tanque o fermentador en el cual ocurren reacciones biológicas y químicas. Este sistema incluye enzimas, células animales y vegetales, microorganismos como bacterias, levaduras y hongos. Dentro de este fermentador se desarrolla un ambiente óptimo controlado para poder obtener un rendimiento celular deseado. En el interior del sistema ocurren complejas reacciones entre el medio de cultivo y las células que se encuentran en determinadas condiciones físicas, para ello es necesario conocer el metabolismo de la célula, aspectos químicos del medio de cultivo, la tasa de crecimiento celular, factores óptimos de crecimiento de la célula como son la concentración de oxígeno disuelto, pH y temperatura, etc.

Para poder conformar un biorreactor se deben de seguir diversas pautas que servirán de guía para un óptimo diseño y desarrollo de este; principalmente, se debe de identificar que producto se desea obtener a partir del biorreactor los cuales pueden ser desde ácidos orgánicos para el consumo humano, biopolímeros e incluso tejidos celulares complejos; para ello se debe determinar la célula capaz de producir lo que deseamos, siendo esta una bacteria, una levadura, un hongo, una célula vegetal o animal, por este motivo se debe de conocer las reacciones biológicas que pueda poseer dicha célula, como también cuales son los requerimientos físicos para su crecimiento como los son: la transferencia de oxígeno, temperatura y pH; y también conocer los nutrientes necesarios para su crecimiento, para ello es necesario saber qué medio de cultivo existente es el indicado para la célula, o en otro caso el investigador puede formular un medio de cultivo adecuado para el crecimiento. En algunos casos cuando se conoce a profundidad los sistemas metabólicos de la célula y la expresión genética, puede ser está manipulada para poder generar así una mayor cantidad del producto deseado.

Una vez determinado el producto que se desea generar, la célula capaz de hacerlo, los requerimientos nutricionales y las necesidades de los factores ambientales y físicos, ya se puede seleccionar que tipo de biorreactor se debe de utilizar. Esta selección se basa en las ventajas y desventajas que posee cada biorreactor, debido a que existen diferencias por el modo de operación y caracterización de cada uno de ellos; unos pueden poseer entradas y salidas de medio de cultivo para evitar así la inhibición por producto en el metabolismo celular, otros poseen agitación con *impellers* en el interior del biorreactor, esto es adecuado para bacterias pero no para hongos filamentosos ya que pueden destrozar las hifas y generando así estrés a la célula, otros poseen chaquetas que permiten la transferencia de calor al interior del biorreactor o el enfriamiento cuando se producen reacciones exotérmicas en el interior.

También se debe de considerar el costo de equipamiento del biorreactor en el cual está incluido el material del biorreactor, que puede ser, desde vidrio a acero inoxidable; el costo del consumo de energía que pueda generar este, el costo del mantenimiento del biorreactor ya que algunos no poseen salidas del medio de cultivo y no son fáciles de limpiar o reparar en el caso ocurra un desperfecto como la formación excesiva de espuma que pueda generar una salida inadecuada del medio de cultivo. Considerando todos estos factores se debe de diseñar un sistema de control del proceso del biorreactor que puedan mantener en óptimas condiciones todos los factores antes comentados como lo son el ingreso y salida adecuados del medio de cultivo, manipulando una válvula de ingreso o salida del medio en el biorreactor para evitar un exceso o escasez de este en el interior del biorreactor.

Finalizada la elección del biorreactor, se realizará el diseño del mismo, su puesta en marcha y por último el diseño del sistema de control; adicionalmente se puede integrar al biorreactor el sistema total del bioproceso que incluirá también un sistema de purificación del producto conocido como *down stream*.

Adicionalmente con el tema de la selección de reactores biológicos, cabe resaltar que las reacciones biológicas en el interior de los biorreactores son clasificadas en dos grupos principales, estos son: los sistemas de suspensión y los sistemas inmovilizados. Estos dos tipos de sistemas clasifican a un más los muchos tipos de biorreactores que

existen; como un ejemplo de los dos tipos mencionados tenemos a los biorreactores CSTR, *batch*, turbidostato, *air-lift* y la columna de burbujas como biorreactores con suspensiones celulares; en cambio el lecho empaquetado, el lecho fluidizado o el biorreactor con membrana son biorreactores con sistemas inmovilizados, principalmente para reacciones de enzimas. Obviamente existen biorreactores que pueden ser categorizados en ambos, por ejemplo las células inmovilizadas pueden ser suspendidas en un tanque agitado o en una columna de burbujas.

## 8.2 BIORREACTORES DE TIPO *BATCH* Y TURBIDOSTATO.

Los biorreactores tipo *batch* y turbidostato pertenecen a los tanques con agitación (*stirred-tank*) estos son los más comunes de los biorreactores, poseen en el interior un agitador o una paleta que es movida por medio de un motor que se encuentra en parte externa del biorreactor, estos *impellers* cumplen la función de transferencia de calor y de nutrientes, en el interior de los tanques en el momento en que comienzan a agitar el medio de cultivo, además, permiten una aireación adecuada y una mezcla que homogeniza todo el medio de cultivo.

Existen dos tipos de *impellers* que son los más utilizados, los cuales son el tipo axial y el tipo radial. Además de los *impellers* existen especificaciones geométricas que el biorreactor debe de cumplir, principalmente, con respecto a la forma geométrica del tanque, usualmente es de forma cilíndrica; también se debe considerar la posición de los *baffles* que impiden la formación de vórtices en el interior del biorreactor, el tipo de *sparger* (sistema de aireación) también es importante su ubicación que comúnmente es en la parte inferior del tanque.

Para el cultivo de ciertos tipos celulares se debe de tener un mayor cuidado por ejemplo para las células animales o vegetales, las cuales son más sensibles al estrés mecánico, mayormente a dos mecanismos físicos que se encuentran presentes en el interior del biorreactor, los cuales son las fuerzas hidrodinámicas generadas por los *impellers* y el daño de las burbujas generadas por una oxigenación excesiva por medio de los *spargers*. En la categoría de los tanques agitados se encuentran dos de los biorreactores realizados en este trabajo de tesis, los cuales son el biorreactor de tipo

*batch* y el biorreactor turbidostato. Para todos estos, el flujo de aire es continuo ya que ingresa el aire y luego es expedido.

El biorreactor tipo *batch*, es característico por la falta de ingreso de medio de cultivo fresco y biomasa en su interior, ya que todos los nutrientes y la biomasa fueron colocados en el interior del biorreactor al mismo tiempo para poder comenzar con el bioproceso; mientras que el biorreactor turbidostato o también conocido como continuo existe un flujo de medio fresco y salida de productos, que es controlado por sistemas de retroalimentación o por medio de válvulas manuales, el nivel del volumen en el interior del biorreactor también debe de ser controlado para evitar desbordes, peligros por contaminación, pérdida de productos y la presencia de estrés en las células; por estas razones el biorreactor *batch* e incluso el biorreactor semi-continuo son más utilizados que el biorreactor continuo.

Las ventajas que permite el uso de los biorreactores con suspensiones líquidas, por ejemplo es que en su interior para el caso de hongos, no permite la desecación de las hifas de los hongos ya que estas están bañadas con medio de cultivo; la disposición de nutrientes y oxígeno es fácilmente manipulado por medio de sistemas de control los cuales permiten tener una facilidad en su manejo y se evita el riesgo de un desborde o de contaminación.

### **8.3 BIORREACTORES CON FERMENTACIONES EN ESTADO SÓLIDO.**

Los biorreactores que realizan una fermentación en estado sólido (SSF), permiten el crecimiento de los microorganismos en partículas sólidas, entre las cuales existe una fase continua de gases y agua. La mayoría de los sistemas SSF usan hongos filamentosos aunque en algunos casos también se suele usar bacterias y levaduras; los sustratos usados son de origen natural, siendo los desechos del campo, de procesadoras de comidas o de granjas; estos insumos son normalmente suplementados con sales, ácidos o azúcares; los polímeros que se encuentran en estos sustratos a veces no pueden ser degradados por los microorganismos el cual, genera un soporte para el crecimiento de estos. El bagazo de la yuca es un ejemplo de estos sustratos ya que es

un desecho sólido compuesto por las fibras de la raíz, conteniendo así gran parte de almidón no extraído en el proceso de fabricación de harina de yuca.

El uso de los hongos en biorreactores con sustratos sólidos, tienden a tener una desecación de las hifas por estar expuestas a una fase de aire, el control de temperatura es un poco difícil también ya que varía según el crecimiento del hongo y la disposición de nutrientes a la célula puede ser pobre debido a, la presencia de las partículas sólidas que dispensan la cantidad de nutrientes, generando así una sobrecarga de medio en ciertas zonas del biorreactor y en otras zonas una escasez que impide el crecimiento celular, por último, las partículas sólidas causan impactos y estrés a las hifas de los hongos modificando la productividad del metabolito secundario deseado.

El sustrato utilizado para las fermentaciones en estado sólido, debe de recibir un tratamiento antes de su uso en el biorreactor, estos sustratos deben de ser cortados, triturados y mezclados para obtener partículas de un mismo tamaño; los sustratos deben de ser esterilizados o al menos pasteurizados. En la preparación del inóculo, en el caso de los hongos filamentosos se debe de generar una suspensión miceliar para luego ser distribuida en el sustrato sólido. El biorreactor ejecutado en este proyecto de tesis esta categorizado por otros autores como un fermentador en estado sólido continuo, ya que es suplementado continuamente con oxígeno enriquecido con medio de producción y cuenta también con una salida por la cual se expedirá el aire enriquecido con ácido fumárico.

#### **8.4 BIOREACTORES DE TIPO PFTR.**

Los reactores tubulares tienen una amplia aplicación en la industria, estos pueden estar con o sin células inmovilizadas, al contener estas células son conocidos como reactores del lecho empacado (PFTR); los cuales como ya se mencionó son reactores tubulares que contienen *pellets*, en los cuales esta inmovilizada una célula y forman el lecho del biorreactor. Muchos tipos de matrices son utilizados como los son: los microtransportadores porosos, perlas de cerámica, discos de poliéster y fibras de vidrio; pero en el trabajo de tesis se utilizara alginato de calcio, ya que el alginato de

sodio al estar en presencia de calcio, forma una estructura resistente pero a la vez permeable.

Estos inmovilizados permiten una superficie de área para el crecimiento de las células, también estas estructuras porosas ofrecen un ambiente protector para las células, evitando su destrucción ante el estrés provocado por las fuerzas hidrodinámicas de los flujos de alimentación.

Las desventajas del uso de estos biorreactores es la heterogeneidad del tamaño de los *pellets* que genera un crecimiento diferente para cada una de las células, generando así un desequilibrio para la adecuada alimentación y desecho de toxinas generados por un mismo flujo.

El uso de la inmovilización de los hongos por medio de *pellets*, genera la disminución de la viscosidad en el caldo de cultivo, obteniéndose así un líquido newtoniano el cual está caracterizado por una buena transferencia de masa y transferencia de calor. Otra ventaja en la inmovilización de las células, es que los *pellets* facilitan la separación del medio que contiene el producto, ayudando así al proceso de purificación; pero este sistema de inmovilización posee una desventaja, que en el momento del atrapamiento de las células del hongo, el tamaño de la gota genera una variedad en la cantidad de células en el interior de cada pellet, y en el momento de brindar una oxigenación existirán *pellets* con mayor cantidad de células y otros con una cantidad menor, generando así una falta de oxígeno a los *pellets* que posean una cantidad mucho mayor de células, alterando así el metabolismo celular y la excreción de los metabolitos secundarios.

Para el uso del PFTR, se debe de conocer su tiempo de residencia hidráulica (TRH), el cual es el tiempo en el cual, el flujo del medio de cultivo se encuentra en contacto con los *pellets*; un aumento en el tiempo de residencia hidráulico refleja una mayor producción en el biorreactor. Para poder obtener el valor del TRH, se debe de conocer el volumen del tubo interno del biorreactor y el flujo con el que está ingresando el medio de cultivo, una vez conocidos estos datos, se puede utilizar la **Ecuación 5.**

$$\text{TRH} = \text{Volúmen (PFTR)} / \text{Flujo del medio líquido.} \quad (5).$$

Se puede conocer también el espacio hueco ( $\varepsilon$ ) y el espacio ocupado ( $\Psi$ ) del biorreactor, cada uno, como el nombre lo indica, en el caso de reactores biológicos con lechos empaquetados con matrices sólidas; representan el espacio hueco que no posee una matriz sólida y únicamente es usado para el paso del flujo de medio de cultivo, en cambio el espacio ocupado representa el lugar ocupado por la matriz sólida. Ambos espacios complementados representan el volúmen total del biorreactor, por ello pueden ser reproducidos en la **Ecuación 6**.

$$\varepsilon + \Psi = 1 \quad (6).$$

Para poder determinar independiente el valor de cada uno, se pueden utilizar las siguientes formulas.

$$\varepsilon = \text{Volúmen hueco} / \text{Volúmen total}$$

$$\Psi = \text{Volúmen ocupado} / \text{Volúmen total}.$$

A su vez, para poder determinar los valores de volúmen hueco o de volúmen ocupado es necesario saber el volúmen de *pellets* para este caso, que pudieron ser colocados en el interior del biorreactor. Y utilizando la **Ecuación 7** se puede determinar el valor del volúmen hueco.

$$\text{Volúmen hueco} = \text{Volúmen total} - \text{Volúmen de los } \textit{pellets} \quad (7).$$

Con estos datos, se puede definir los valores de  $\varepsilon$  y  $\Psi$ , esperando que el espacio-hueco ocupe un porcentaje de 10-20% en relación con el volúmen total y el espacio ocupado posea un porcentaje del 40%.

Adicionalmente en el caso del flujo del medio de cultivo, este puede ser determinado rápidamente por el valor que se programe en la bomba peristáltica, pero en muchos casos este valor es erróneo, así que lo más recomendable es determinar el

flujo utilizando una probeta y un cronometro, determinando en una serie de repeticiones el tiempo en que tarda el medio de cultivo en alcanzar una medida estandarizada en la probeta.

## 9. PROCESO BIOQUIMICO EN LA OBTENCION DE ÁCIDO FUMARICO.

Para tener una idea detallada del bioproceso que ocurre en el interior del biorreactor, se presentara a continuación la serie de transformaciones que sufre la glucosa en el interior y exterior de la célula para poder llegar a ser ácido fumárico. La glucosa es utilizada como principal fuente de carbono para la producción de ácido fumárico, ya que constituye gran cantidad del medio de producción que es utilizado en esta tesis (**Anexo2**).

En el interior de la célula de *Rhizopus sp.* existen una serie de enzimas encargadas de la degradación de la glucosa como fuente de carbono para el crecimiento de la misma; por medio del siguiente diagrama se explicara la formación de ácido fumárico partiendo de glucosa.

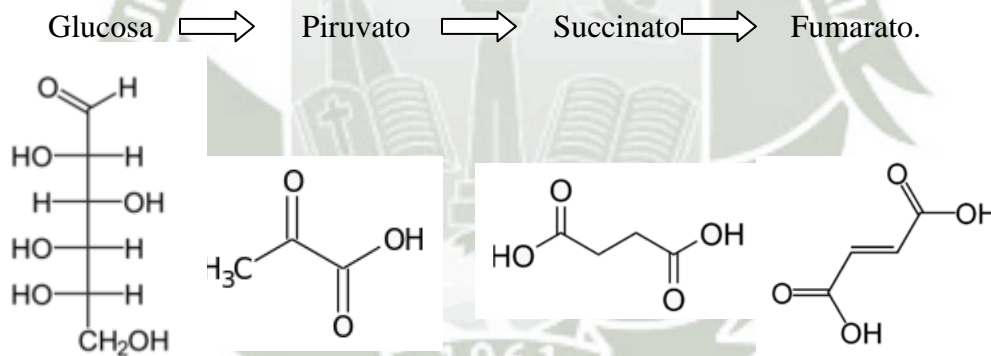


Figura N° 2. Secuencia del transformación de la glucosa a fumarato.

Por medio de la vía metabólica de la glicolisis, se oxida la glucosa, se obtiene energía para la célula y se generan dos moléculas de piruvato a partir de una molécula de glucosa. Una vez formado el piruvato se dirige a otra vía metabólica denominada oxidación del piruvato en la cual en el interior de la mitocondria el ácido pirúvico reacciona con la coenzima A,

desdoblándose en  $\text{CO}_2$  y en un grupo acetilo de dos carbonos que se unen inmediatamente a la coenzima A formando acetil coenzima A.

Luego de pasadas estas dos vías metabólicas la acetil coenzima A ingresa al ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs, en donde forma parte del oxaloacetato gracias a su fusión con el ácido cítrico, y finalmente por medio de reacciones enzimáticas se obtiene succinato el cual es oxidado por la succinato deshidrogenasa formando así fumarato.

El fumarato puede ingresar de nuevo al ciclo de Krebs; pero también es secretado al exterior de la célula, en donde se une con el carbonato de calcio que se coloca para mantener un pH estable. El ácido fumárico se une con las moléculas de calcio, formando así fumarato de calcio que es el producto final de la bioreacción.

## **10. SUSTRATOS SOLIDOS UTILIZADOS PARA EL CRECIMIENTO DEL HONGO.**

### **10.1. PAN BEGRADO.**

Para el trabajo de tesis se usara el pan común que es llamado también pan bregado, de miga dura, pan español o pan candeal. Es obtenido de manera sencilla con el uso solamente de harina, levadura, sal, azúcar y agua. Se caracteriza porque su miga es blanca y compacta. Se comercializa en forma de barra, hogaza o rosca. Según el código alimentario español este tipo de pan posee una cantidad de 51.5 g de glúcidos, en comparación con otros tipos de panes como el pan de centeno, el pan de molde, el pan tipo hamburguesa y el pan integral; que poseen una cantidad de glúcidos de 45.8 g, 49.9g, 47.5g y 44 g respectivamente; lo cual hace al pan blanco la mejor fuente de glúcidos para hongos saprofitos como lo son los del género *Rhizopus*.

## 10.2. BAGAZO DE YUCA.

### a) DEFINICIÓN.

La yuca o mandioca es un arbusto perenne, adaptado a condiciones intertropicales, por lo cual puede resistir las heladas. El uso habitualmente de este arbusto es dado por el consumo de su raíz que posee una forma cilíndrica y oblonga, que puede alcanzar un metro de largo y 10 cm de diámetro. Posee una cascara dura, leñosa e incomedible y con una pulpa firme y fibrosa.

El bagazo de yuca es el subproducto de las industrias alimenticias que producen mandioca en polvo para el consumo humano, luego del proceso de triturado de la yuca, los remanentes fibrosos son desechados y utilizados comúnmente como abono o alimento para ganado.

### b) COMPOSICIÓN QUÍMICA.

La raíz de la yuca consta de tres partes:

- La película suberosa que representa el 1-2% de la raíz.
- La cascara o corteza que representa el 12-20%.
- El cilindro central o pulpa, tiene dos tipos de tejidos, un tejido compuesto por vasos leñosos y otro conformado por las células parenquimatosas llenas de almidón, todos juntos representan el 78-85%.

A continuación se observará la composición de la raíz entera, de la corteza y del cilindro central, pero con la constitución de bagazo.

Fracciones	Raíz entera (%)	Corteza (%)	Cilindro (%)
Humedad	-	-	-
Proteína/Grasa/Fibra	7.3	16.4	6.1
Carbohidrato	89.4	77.5	91.0
Cenizas	3.3	6.1	2.9

Tabla 5. Composición de la raíz, corteza y cilindro.<sup>5</sup>

5. (Montaldo. 1979)

Se puede observar que el cilindro, o también conocida como la pulpa posee una mayor cantidad de carbohidratos que la corteza, por esa razón, para que el hongo pueda desarrollarse con mayor velocidad se utiliza únicamente el cilindro.

## 11. PROCESO *DOWN STREAM*.

El proceso *down stream* es una parte del bioproceso cuando se trabaja con biorreactores. Comienza una vez finalizado el proceso de *up stream*, en el cual se generaron todos los productos, subproductos y desechos en el interior del biorreactor. El proceso de *down stream* separa y purifica un producto específico del caldo final que se obtiene del biorreactor, este procedimiento se realiza con ayuda de operaciones unitarias como filtración, adsorción, precipitación, entre otras; cada una de ellas especializada para ciertos tipos de tarea.

El proceso *down stream* en bioprocursos, inicia con la recuperación del producto, esto depende si el producto es intracelular o extracelular, es este caso el ácido fumárico es extracelular, lo cual facilita su recuperación, para ello se pueden utilizar operaciones como filtración, centrifugación y sedimentación. Luego el siguiente paso es la concentración en la cual se trata de separar el producto deseado de sustancias que posean propiedades distintas, aumentando así la concentración del producto de interés, para este paso se pueden usar las operaciones de extracción o de absorción. El tercer paso es la purificación que implica la separación del producto de impurezas, y por último se realiza un formulación del producto para obtenerlo de un forma refina e incluso comercial para ello se usan operaciones como la cristalización o el secado.

El primer paso de recuperación del ácido fumárico en el bioproceso está dado únicamente por la operación unitaria de sedimentación, en la cual se espera un determinado tiempo a que las partículas sedimenten en el fondo del tubo o frasco gracias a la fuerza de gravedad. En el proceso de concentración se está utilizando la operación unitaria de adsorción empleando carbón activo, ya que este está gobernado por interacciones no electrostáticas, caracterizado por generar la unión entre las moléculas

adsorbidas y de que en la superficie del carbón estén presentes fuerzas de Van del Waals, de tal manera que el carbón activo que es generalmente de naturaleza apolar, adsorba todas las sustancias apolares. La adsorción al ser un fenómeno superficial depende de la superficie interna del carbón, la mayoría de ellos presenta un área superficial de 500-1000m<sup>2</sup>/g, lo que genera una gran porosidad en el interior del carbón.

La desorción es considerada como la operación unitaria en el proceso de purificación del ácido fumárico, ya que se puede separar el ácido fumárico del carbón activo por medio del uso de acetona. Adicionalmente se realiza la evaporación de la acetona o secado de la misma a una temperatura de 60°C en donde se pueden obtener con una alta concentración y pureza los cristales de ácido fumárico. La acetona y el carbón activo pueden recuperados después de realizar la purificación para volver a ser utilizados.

Finalmente en sentido comercial el agua estéril es usada para incrementar la pureza del ácido fumárico alrededor de un 98%; este proceso ha demostrado una reducción en el costo de producción en comparación con el proceso de precipitación.

## **12. METODO DE DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO.**

### **12.1 ESPECTROFOTOMETRÍA UV.**

La espectrofotometría es un método de análisis óptico, tiene como fundamento, que cada tipo de sustancia, al poseer átomos, iones o moléculas estas absorben con cierta preferencia longitudes de onda de una determinada gama de frecuencias del espectro electromagnético; esto hace que los átomos, iones y moléculas puedan identificarse mediante la longitud de onda a que se da lugar la absorción. En el análisis espectrofotométrico, las mediciones de absorbancia se realizan ordinariamente a una longitud de onda que corresponda al máximo del espectro de absorción de la sustancia.

Ya que todas las sustancias absorben energía radiante, esta absorción puede darse a partir de radiaciones ultravioletas, visibles e infrarrojas dependiendo de la estructura de las moléculas. El espectro electromagnético es la distribución energética de ondas electromagnéticas, originalmente existía solo el espectro visible ya que este puede ser observado fácilmente por los ojos humanos, luego se descubrió el espectro infrarrojo y por último el espectro ultravioleta; pero al pasar el tiempo se siguió extendiendo el

espectro con el descubrimiento de las ondas microondas, las ondas de radio, los rayos x e incluso los rayos gamma que se observará en la **Figura 3**.

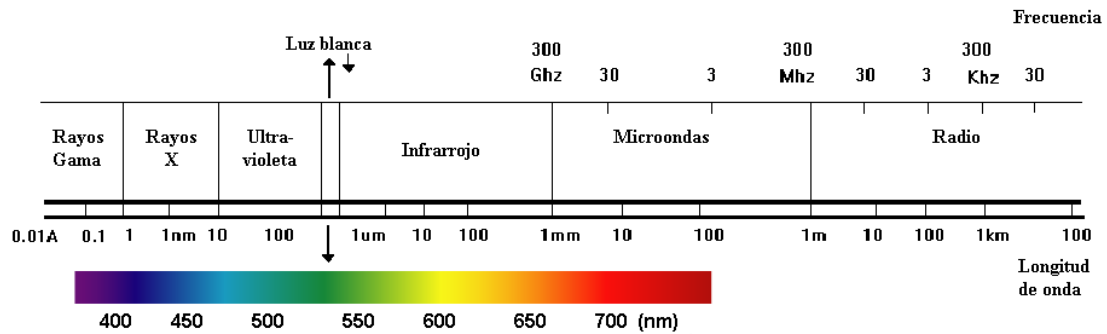


Figura N° 3. Imagen del espectro electromagnético.<sup>6</sup>

6. (Acevedo. 2013)

En la espectrofotometría UV-visible se puede hacer una distinción entre dos tipos de instrumentos: fotómetros y espectrofotómetros. Los primeros usan filtros para seleccionar la longitud de onda que incidirá en la muestra. Los espectrofotómetros son aparatos complicados y costosos que usan un sistema monocromador, lo cual permite la variación en la selección de la longitud de onda y por ello la región espectral es muy amplia. Las investigaciones revelan que el ácido fumárico absorbe a una longitud de onda de entre 200nm a 300nm, y óptimamente a 210nm, lo cual indica que la longitud de onda de trabajo se encuentra en el UV.

En la radiación ultravioleta se encuentran varios subtipos de esta con diferentes longitudes de onda que serán presentadas a continuación.

Nombre	Longitud de onda
Onda larga	400-320
Onda media	320-280
Onda corta	283-200
Ultravioleta lejano	200-10
Ultravioleta extremo	91.2 -1

Tabla 6. Valores de longitud de onda para cada una de las secciones de la región ultravioleta.<sup>7</sup>

7. (Burns. 2003)

## 12.2 COMPONENTES.

### a) FUENTE DE LUZ.

Consta de una lámpara o un juego de lámparas que emiten un espectro entre 190 y 1000 nm, usando lámparas de deuterio y tungsteno. Esta fuente de luz debe tener ciertas características: estabilidad, direccionalidad y una distribución continúa del espectro.

### b) MONOCROMADOR.

El monocromador es el encargado de separar y direccionar el espectro sobre la muestra, en un intervalo de longitudes de onda, este dispositivo es capaz de moverse gracias a un pequeño motor y al hacer esto, cambia la orientación de la longitud de onda de la luz que sale de la lámpara.

El monocromador está constituido por rendijas, colimadores y elementos de dispersión; el colimador, es un lente que lleva el haz de luz que entra a una determinada longitud de onda hacia un prisma el cual se encarga de separar las longitudes de onda deseadas para que luego se dirijan a otra lente que direccionada el haz de luz a la rendija de salida y pueda incidir sobre la muestra.

**c) MUESTRA.**

El recipiente donde se deposita la muestra es llamado cubeta, que tiene como característica el hecho de tener dos caras pulidas para no presentar efectos ópticos indeseables. Comúnmente las cubetas esta hechas de cuarzo o de vidrio, pero también existen cubetas mas económicas que son hechas de plástico.

**d) DETECTOR.**

La intensidad de luz transmitida se mide con un detector que convierte el número de fotones que inciden sobre él durante un intervalo de tiempo en una señal eléctrica. El detector ideal debe de tener una sensibilidad elevada en la región espectral de interés, un tiempo de respuesta pequeño y utilizable en un amplio intervalo de longitudes de onda. Existen tres tipos de detectores para espectrofotometría, siendo que para la espectrofotometría del UV, el más utilizado es el tubo fotomultiplicador.

**12.3 TECNICA.****a) PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN STOCK.**

La solución stock es una solución con una concentración estandarizada del analito a determinar, que puede ser diluida para preparar una serie de patrones con concentraciones también conocidas. Esta solución tendrá una concentración de 250ppm de ácido fumárico.

**b) PREPARACIÓN DE SOLUCIONES O PATRONES.**

Las soluciones patrones, son diluciones de la solución stock, cada una de ellas posee una concentración del analito conocida. Todo esto se utilizada para poder obtener un rango de concentraciones que nos puedan servir en la determinación de la longitud de onda.

### **c) DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA ANALÍTICA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.**

Para la determinación de la longitud de onda se seleccionan los rangos inferiores y superiores de esta, durante este proceso se debe de obtener una curva de absorción para poder ubicar el pico de máxima longitud de onda a la cual se produce la máxima absorción; a esta longitud de onda la variación de absorbancia por unidad de concentración es máxima, con lo cual se obtiene la sensibilidad máxima. Luego de haberse determinado la longitud de onda, se calibra el método midiendo una cantidad de patrones.

Las medidas de la absorbancia se realizan comúnmente utilizando un blanco, que debe de ser idéntico a la muestra de todo, excepto en que no debe contener el constituyente que se desea determinar. El blanco contiene los reactivos, aditivos, disolventes, etc. De esta manera las lecturas de las muestras estarán corregidas automáticamente para cualquier absorción pequeña por acción de los reactivos y el disolvente. Con los datos obtenidos de las diferentes soluciones patrones se construye una curva de calibrado. La cantidad de luz absorbida por cada patrón se encuentra bien definidas por leyes fotométricas como los son la ley de lambert-bouguer, ley beer y la ley de lambert-beer.

Por último la muestra recibirá un tratamiento especial dependiendo de las características de esta, para luego poder ser analizadas en el espectrofotómetro, el cual devolverá los datos de concentración del analito que se desea analizar. El tratamiento de la muestra es específico para cada caso, algunas pueden ser diluidas, otras reguladas por ácidos o sales o incluso pueden ser desecadas hasta obtener cenizas que puedan ser diluidas para poder ser medidas en el instrumento.

### **CAPITULO III**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS.**

**3.1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN:** El trabajo de investigación se desarrolló completamente en los Laboratorios del Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica de la Universidad Católica de Santa María y en el Laboratorio Clínico Velarde.

#### **3.2 MATERIALES**

##### **3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.**

- Yuca (*Manihot esculenta*)
- Papa (*Solanum tuberosum*)
- Pan común tres puntas obtenido de Supermercado “Metro”

##### **3.2.2. MATERIAL DE VIDRIO**

- Baguetas.
- Beakers: 50 ml, 250 ml, 500 y 1000ml.

- Cubreobjetos: 18x18mm
- Fiolas: 100ml y 500 ml.
- Lavador de gases de 500ml.
- Laminas portaobjetos.
- Matraz erlenmeyer: 500ml
- Pipetas: 1ml, 5ml, 10ml.
- Placas petri: 100 x 15mm.
- Probeta: 100 ml.
- Tubos de ensayo: 13 x 100mm
- Varilla huecas de vidrio: 0.5 cm de diámetro.
- Vessel: D: 12 cm, H: 23.5cm, H/D: 1.96
- Viales (64).

### 3.2.3. INSTRUMENTACION Y EQUIPOS.

- |                                       |                     |
|---------------------------------------|---------------------|
| - Autoclave.                          | Tuttnauer 1730M.    |
| - Balanza analítica.                  | Ohaus Pionner.      |
| - Baño maría.                         | Vikale.             |
| - Bombas peristálticas.               | BIOFLO 3000.        |
| - Bomba al vacío.                     | Vaccu Brandme-2.    |
| - Cámara de flujo laminar horizontal. | HFL201.             |
| - Centrifuga para tubos falcon.       | Mikro 120.          |
| - Congelador.                         | Coldex E-162.       |
| - Espectrofotómetro.                  | Shimazu 160-A.      |
| - Estereoscopio.                      | ZSM-3E              |
| - Estufa.                             | JP Selecta 2000210. |
| - Incubadora.                         | JP Selecta 2000210. |
| - Medidor de oxígeno disuelto.        | SM 600.             |
| - pH metro de mesa.                   | HI 2212.            |
| - Reactor PFTR.                       |                     |

### 3.2.4 MEDIOS DE CULTIVO.

- Medio de cultivo Saboraud.
- Medio de producción de ácido fumárico. (N. Cao; J. Du; T. Tsao)
- Medio PD

### 3.2.5 REACTIVOS QUIMICOS.

- |   |                |
|---|----------------|
| - Acetona 99%.  | $C_3H_6O$      |
| - Agar  |                |
| - Agua destilada                                      | $H_2O$         |
| - Alginato de sodio                                   | $C_6H_7NaO_6$  |
| - Azul de lactofenol                                  |                |
| - Carbonato de calcio                                 | $CaCO_3$       |
| - Carbón activo para laboratorio de análisis químico. |                |
| - Cloranfenicol                                       |                |
| - Dextrosa  | $C_6H_{12}O_6$ |
| - Fosfato de potasio monobásico                       | $KH_2PO_4$     |
| - Fumarato de sodio                                   | $C_4H_2NaO_4$  |
| - Glicerol al 10%                                     | $C_3H_8O_3$    |
| - Hidróxido de potasio                                | $KOH$          |
| - Peptona   |                |
| - Suero fisiológico                                   | $ClNa$ 0.9%    |
| - Sulfato de magnesio                                 | $MgSO_4$       |
| - Sulfato de zinc                                     | $ZnSO_4$       |

### 3.2.6. OTROS MATERIALES.

- Algodón medicinal
- Asa de Kolle
- Difusor de oxígeno
- Foundation: H: 2cm, D: 22cm
- Headplate: H: 2cm, D: 22cm

- Jeringa hipodérmica: 10ml y 5ml
- Mariposas ¼ pulg
- Papel aluminio
- Papel filtro estándar
- Pernos ¼ pulg
- Recipientes de plástico: 12 x 4cm
- Termostato
- Tubos eppendorf
- Tubos falcon: 15 ml
- Varilla de metal ¼ pulg

### 3.3. METODOS.

#### 3.3.1 AISLAMIENTO DE CEPAS NATIVAS DE *RHIZOPUS SP.* A PARTIR DE MUESTRAS DE PAN CONTAMINADO.

a) **EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE *RHIZOPUS SP.* EN MUESTRAS DE PAN CONTAMINADO.** Se obtuvo la muestra proveniente del pan conocido comúnmente como “tres puntas” del supermercado “Metro”, este tipo de pan fue usado por poseer una cantidad de 51.9g de glúcidos entre ellos el almidón, lo cual permite que el hongo use este compuesto como la fuente de carbono para su crecimiento; se tomaron 150g. de pan del pan para triturarlo y después se colocó 50 g. de pan en tres recipientes plásticos de 12 x 4cm. debidamente rotulados con la codificación de MP1, MP2 y MP3. En el fondo de cada recipiente se colocó algodón humedecido con agua, para poder crear una atmosfera con vapor de agua en el interior del frasco, suficiente para el crecimiento del hongo; dejando así el recipiente de plástico expuesto por un día a condiciones medio ambientales en tres diferentes posiciones de una locación específica, las cuales fueron: la sombra de una enredadera en uno de los vértices de un jardín (MP1), un techo de un domicilio al aire libre a una distancia de 3 metros aproximadamente del suelo (MP2) y la sombra de un arbusto en otro de los

vértices de un jardín (MP3) los cuales permitieron el ingreso de las esporas, que con alta probabilidad se encontrarían en el aire en movimiento o que estuviesen siendo transportadas por insectos o aves. Terminado el tiempo en que los recipientes de plástico fueron expuestos al medio ambiente se humedeció con una solución azucarada al 5% la cama de pan de los recipientes, para estimular únicamente el crecimiento de los hongos y no de las bacterias, luego fueron sellados con perforaciones en las tapas para el ingreso del aire. Seguidamente, se colocaron a temperatura ambiente y sin el contacto directo de la luz solar durante cuatro días, tiempo suficiente para que se pudiera generar e instalar el micelio aéreo.

Finalmente, se observaron pequeñas cantidades del micelio aéreo formado, cuya probabilidad fue alta para la existencia de *Rhizopus sp.*, lo cual se determinó por la presencia de micelio aéreo de color blanco con pequeños pigmentos negros correspondientes a las esporas y con ayuda de un asa de siembra se colocó parte del micelio en tres placas petri rotuladas con las codificaciones CMP1, CMP2 y CMP3 en un medio de cultivo compuesto de agar Sabouraud complementado con cloranfenicol siendo este un compuesto antibiótico capaz de eliminar bacterias gran negativas como gran positivas; las placas fueron llevadas a una incubadora a 37°C por cuatro días, transcurridos los cuales, se realizaron repiques a otras placas petri rotuladas con medio Sabouraud para poder mantener una cepa no contaminada.

**b) SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE LA CEPA NATIVA DE *RHIZOPUS SP.*** Se seleccionaron las placas petri en donde se observó un rápido crecimiento del micelio durante los cuatro días evaluados posteriores a la siembra de la muestra en las placas con medio de cultivo Sabouraud (**Anexo 3**) complementado con cloranfenicol; posteriormente, se realizó un análisis macroscópico utilizando el estereoscopio que permitió analizar el micelio aéreo y el reverso de la placa. El análisis microscópico consistió en dos exámenes directos con hidróxido de potasio

KOH al 10% y con azul de lactofenol, el uso de KOH al 10% se debe a que el compuesto disuelve los materiales de fondo como la queratina y mantiene las estructuras fúngicas y el uso de azul de lactofenol es porque el fenol destruye la flora acompañante de la muestra y el ácido láctico conserva las estructuras fúngicas al provocar un cambio de gradiente osmótico con relación al interior del hongo generando una película protectora; el primer ensayo consistió en colocar una gota de KOH 10% en un portaobjeto y mezclar con una pequeña cantidad del micelio aéreo proveniente del cultivo, luego se colocó un cubreobjetos (18x18mm) sobre la gota con la muestra y se examinó en busca de la morfología característica del género *Rhizopus*.

El segundo examen resultó ser similar al primero cambiando el KOH al 10% por una gota de lactofenol y fue observado al microscopio a 100x. Finalmente, se visualizó en el microscopio la presencia del crecimiento de hifas aseptadas para buscar esporangióforos que en sus bases debían tener rizoides, lo cual permitió la caracterización del género *Rhizopus sp.* y adicionalmente en su identificación se debió observar que en el ápice de los esporangióforos se debían formar los esporangios redondos, oscuros y con columnelas hemisféricas con varias esporas ovales.

**3.3.2 MULTIPLICACIÓN DE LA CEPA NATIVA SELECCIONADA DE *RHIZOPUS SP.* POR MEDIO DE LA CONFORMACIÓN DE UN *SEED REACTOR*.** Se conformó un *seed reactor* con la cepa de la colonia aislada e identificada de *Rhizopus sp.* Este pequeño biorreactor es utilizado únicamente como un reactor biológico para el incremento de biomasa, ya que únicamente presenta un medio de cultivo enriquecido y específico para el crecimiento de la cepa que se desea utilizar posteriormente y junto con condiciones controladas como temperatura, pH y concentración de nutrientes, lo cual permite el óptimo crecimiento de dicha cepa; el *seed reactor* contuvo 250ml. de medio de cultivo complejo PD (**Anexo 1**); este medio fue colocado en un matraz de 500ml. de capacidad y fue sellado con un tapón de

algodón para poder esterilizarlo con vapor de agua saturado a presión en el autoclave por 15 minutos a 121°C.

Luego, se tomó una muestra del micelio aéreo del hongo que creció en las placas petri con ayuda de una asa de Kolle y se inoculó al medio de cultivo PD en el *seed reactor*, fue necesario el uso del medio de PD, ya que es un medio asequible y con altas cantidades de almidón, por lo cual es usado como medio de cultivo; luego se selló el matraz con un tapón de algodón y se colocó en el *shaker* a una temperatura de 28°C±0.5°C. siendo la temperatura óptima de crecimiento de *Rhizopus sp.*, por un período de cuatro días. El crecimiento fungal alcanzó un tope por medio de la visualización de la falta de espacio en el matraz y se prosiguió al traspaso de una muestra del micelio a otro matraz de 500ml de capacidad con medio de cultivo PD fresco, y para el anterior *seed reactor* se lo llevó a refrigeración a 4°C hasta que fuera necesario su uso.

Finalmente, se conformó un segundo *seed reactor* como contraparte para una replicación posterior e imprevistos. Seguidamente, se tomó una alícuota del *seed reactor* de 5ml. y se depositó en un tubo falcon de 15ml. de capacidad al cual se le agregó 10ml. de suero fisiológico siendo este una disolución acuosa de sustancias compatibles con varios tipos de organismos vivos entre ellos los hongos; el tubo fue centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos en una centrifuga para tubos falcon y, luego se decantó el sobrenadante para recuperar el precipitado en un tubo eppendorf, se adicionó 1ml. de glicerol al 10% y se conservó a una temperatura de -4°C en un congelador.

**3.3.3 ADAPTACIÓN DE LA CEPA NATIVA *RHIZOPUS SP.* A UN MEDIO DE PRODUCCIÓN ESPECIFICO DE ÁCIDO FUMÁRICO CON SU RESPECTIVA MULTIPLICACION EN UN *SEED REACTOR*.** Se conformó un sistema de tubos de ensayo de 10 ml. de capacidad, en los cuales existieron concentraciones diferentes de medio de cultivo de crecimiento complejo PD y del medio de producción; las concentraciones del medio de producción fueron de 25%, 50 %, 75% y 100%, se tomó como medio restante el medio de crecimiento complejo PD.

Este medio fue autoclavado a 121°C por 25 minutos; y se siguió con la inoculación de 1 ml. de la cepa *Rhizopus sp.* que se encontró en crecimiento en el *seed reactor* con medio PD; luego, se rotularon y sellaron los tubos con algodón y papel craft para ser colocados en el Baño María a una temperatura de 28°C±0.5°C. durante cuatro días. Una vez ejecutado, se conformó un segundo *seed reactor* con el porcentaje de medio de producción de la cepa mejor adaptada junto con una alícuota que contenía dicha cepa.

**3.3.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CELULAR DEL INÓCULO PARA LOS BIOREACTORES.** Se tomó una muestra de 10µl. del *seed reactor* con una micropipeta y se llenó la Cámara de Neubauer con la suspensión, este dispositivo permite el conteo de ciertos tipos celulares como los eritrocitos, leucocitos y también esporas; la cámara luego fue cubierta con un cubreobjetos, se ajustó el microscopio para visualizar en su totalidad las células y ejecutar el recuento; finalmente, se utilizó la **Ecuación 8** con la que se determinó la concentración de esporas en un mililitro (se realizaron tres conteos para poder obtener un promedio aritmético).

$$\text{Concentración (esporas/ml)} = (\text{Total de esporas} \times 10000) / 4 \quad (8)$$

### 3.3.5 DISEÑO Y CONFIGURACIÓN DE LOS REACTORES BIOLÓGICOS.

a) **BIOREACTOR TIPO BATCH.** Se conformó este biorreactor usando un *vessel* o tanque de vidrio de una altura de 23.5 cm. y un diámetro interno de 12 cm, obteniendo así un H/D de 1.96 y un volúmen de 2.66 litros; se utilizó adicionalmente una placa de cabecera superior y una base para el *vessel* (**Anexo 4**); la cabecera o también llamada *headplate* fue hecha de madera con forma geométrica cuadrática de 22 cm. de lado con un espesor de 2 cm. y con una cavidad circular de 12 cm. de diámetro con una profundidad de 1

cm.; adicionalmente, fue adjuntado con un acople de jebe que rodeaba la cavidad y que sirvió de unión entre el *vessel* y el *headplate*.

El *headplate* contó con aperturas dispuestas alrededor de un radio de 4 cm. del centro del *headplate* para el ingreso de varillas de vidrio huecas de 0.5 cm. de diámetro (**Anexo 4**) que permitieron realizar la toma de muestras, el ingreso del antiespumante, carbonato de calcio y la entrada del inóculo por otra varilla, el ingreso de aire impulsado por una bomba de aireación de 100HP (**Anexo 5**). El aire fue distribuido por medio de microburbujas generadas gracias a un difusor o *sparger* (**Anexo 5**) y por último fue configurado un ingreso para el acoplamiento del termostato. La base del biorreactor estuvo conformada por un *foundation* que fue hecho de la misma madera que el *headplate* y que tuvo también forma cuadrática con 2cm. de espesor y con 22cm. de lado con una cavidad circular de 12cm. de diámetro en el centro y con una profundidad de 1cm.; en donde estaba apoyado el *vessel*. En el interior del *vessel* se introdujo un termostato (**Anexo 6**) que permitió la autorregulación de la temperatura en el biorreactor a un valor de  $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ .

Las dos bases de madera se aseguraron con tres varillas de metal de  $\frac{1}{4}$  de pulgada con una longitud de 30cm. cada una (**Anexo 6**), que fueron distribuidas adecuadamente para poder asegurar eficientemente al biorreactor; las varillas fueron fijadas con mariposas de  $\frac{1}{4}$  en la parte superior y con pernos de  $\frac{1}{4}$  en la parte inferior.

**b) BIOREACTOR TIPO TURBIDOSTATO.** Se conformó un biorreactor usando un *vessel* de vidrio de una altura de 23.5cm y un diámetro interno de 12cm, obteniendo así un H/D de 1.96 y un volúmen de 2.66 litros; se utilizó adicionalmente una cabecera superior y una base para el *vessel* (**Anexo 4**); la cabecera o también llamada *headplate* fue hecha de madera con forma rectangular, con un largo de 22cm, con un grosor de la madera de 2cm y con una cavidad circular de 12cm de diámetro y con un grosor de un centímetro,

adicionalmente fue adjuntado con un acople de jebe que rodeaba la cavidad y que sirvió de unión entre el *vessel* y el *headplate*.

El *headplate* contaba con aperturas dispuestas alrededor de un radio de 4 cm del centro del *headplate* para el ingreso de varillas de vidrio huecas de 0.5cm de diámetro (**Anexo 4**) que permitieron realizar la toma de muestras, el ingreso del antiespumante, carbonato de calcio y la entrada del inóculo por otra varilla, el ingreso de aire impulsado por una bomba de aireación de 100HP (**Anexo 5**), el aire fue distribuido por medio de microburbujas generadas gracias a un difusor (**Anexo 5**) y por último un ingreso para el acoplamiento del termostato. Adicionalmente, para este tipo de biorreactor debe de haber un ingreso y salida del medio por medio también de las varillas de vidrio huecas, que irán conectadas a mangueras de silicona que a su vez irán conectadas a las bombas del BIOFLO 3000 que se encuentra en el H301.

La base del biorreactor estuvo conformada por un *foundation* que fue hecho de la misma madera que el *headplate* y que tuvo también una forma rectangular con 2cm de grosor y con 22cm de largo, con un cavidad circular de 12cm de diámetro en el centro y con un grosor de un centímetro; en donde estaba apoyado el *vessel*.

En el interior del *vessel* se encontraba un termostato (**Anexo 6**) que permitía la autorregulación de la temperatura en el biorreactor a un valor de  $28^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ .

Las dos bases de madera estaban aseguradas con tres varillas de metal de  $\frac{1}{4}$  de pulgada con una longitud de 30cm cada una (**Anexo 6**), que estaban distribuidas adecuadamente para poder asegurar eficientemente al biorreactor, las varillas fueron fijadas con mariposas de  $\frac{1}{4}$  en la parte superior y con pernos de  $\frac{1}{4}$  en la parte inferior.

### c) FERMENTADOR EN ESTADO SÓLIDO (SSF).

Se conformó un biorreactor usando un *vessel* de vidrio de una altura de 23.5cm y un diámetro interno de 12cm, obteniendo así un H/D de 1.96 y un volumen de 2.66 l; se utilizó adicionalmente una cabecera superior y una base para el *vessel* (**Anexo 4**); la cabecera o también llamada *headplate* fue hecha de madera con forma rectangular, con un largo de 22cm, con un grosor de la madera de 2cm y con una cavidad circular de 12cm de diámetro y con un grosor de un centímetro, adicionalmente fue adjuntado con un acople de jebe que rodeaba la cavidad y que sirvió de unión entre el *vessel* y el *headplate*.

El *headplate* contaba con aperturas dispuestas alrededor de un radio de 4cm del centro del *headplate* para el ingreso de varillas de vidrio huecas de 0.5cm de diámetro (**Anexo 4**) que permitieron realizar la toma de muestras, el ingreso del antiespumante y la entrada del inóculo por otra varilla. La alimentación del biorreactor se dio gracias a una conexión con un lavador de gases en donde estaba medio de producción fresco que fue diseminado por medio de aire impulsado gracias a una bomba de aireación de 100 HP. (**Anexo 5**)

La base del biorreactor estuvo conformada por un *foundation* que fue hecho de la misma madera que el *headplate* y que tuvo también una forma rectangular con 2cm de grosor y con 22cm de largo, con una cavidad circular de 12cm de diámetro en el centro y con un grosor de un centímetro; en donde estaba apoyado el *vessel*. En el interior del *vessel* se encontraba la matriz sólida hecha a partir de bagazo de yuca.

Las dos bases de madera estaban aseguradas con tres varillas de metal de  $\frac{1}{4}$  de pulgada con una longitud de 30cm cada una (**Anexo 6**), que estaban distribuidas adecuadamente para poder asegurar eficientemente al biorreactor, las varillas fueron fijadas con mariposas de  $\frac{1}{4}$  en la parte superior y con pernos de  $\frac{1}{4}$  en la parte inferior.

#### **d) BIOREACTOR TUBULAR FLUJO PISTÓN (PFTR).**

Se usó el biorreactor PFTR, el cual fue proporcionado por el laboratorio H301 (**Anexo 7**), el cual tiene un volúmen de  $68.88\text{cm}^3$  del cilindro interno, este mismo fue colmado con *pellets* de alginato de calcio en los cuales estaba inmovilizada la cepa adaptada de *Rhizopus sp.* Se conectó la parte superior del tubo del reactor con una manguera de silicona que ingresaba medio de producción fresco gracias al flujo generado por una bomba peristáltica del BIOFLO 3000 que se encuentra en el H301; por la parte inferior del tubo se conectó otro tubo de silicona que extraía el medio ya utilizado por la cepa de *Rhizopus sp.* y que luego fue depositado en un recipiente de vidrio.

### **3.3.6 DETERMINACIÓN DEL PARÁMETRO DE CINÉTICA DE CRECIMIENTO FUNGAL Y LOS PARAMETROS DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO EN EL REACTOR BIOLÓGICO TIPO *BATCH*.**

a) **DETERMINACIÓN DEL PARÁMETRO CINÉTICO DE CRECIMIENTO DE LA CEPA NATIVA *RHIZOPUS SP.*** Una vez conformado el biorreactor *batch* se llenó con 2000ml de medio de producción suplementado con el antibiótico cloranfenicol, se inoculó con la ayuda de una jeringa hipodérmica, 10ml del inóculo de la cepa *Rhizopus sp.* que estuvo creciendo en el *seed reactor*; se utilizó este tipo de biorreactor por el hecho de que este tipo es un modelo básico en comparación con los demás biorreactores presentados en este trabajo de tesis. El tiempo de crecimiento para esta cepa fue de cuatro días dentro del biorreactor tipo *batch* y a una temperatura de  $28^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ., se tomaron muestras con ayuda del puerto de recolección que estaba colocado en el *headplate* del biorreactor *batch*, cada muestra fue de 5ml , para que después fuera trasladada a un tubo falcon; luego fue llevado a una centrifuga para tubos falcon a 2000rpm por 5 minutos junto con su

contrapeso, se obtuvo un precipitado el cual tuvo que ser medido para obtener el dato de la biomasa, se tuvo en consideración el peso del tubo falcon, para que se pueda obtener la medida de la biomasa por diferencia de pesos entre el tubo falcon vacío y el tubo falcon con la biomasa. Utilizando los datos de biomasa obtenidos, se usó el modelo peletizado de cinética de crecimiento de hongos (**Ecuación 3**) en la obtención final del valor de la velocidad de específica de crecimiento de la cepa de *Rhizopus sp.*

**b) DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO (OTR), DE CONSUMO DE OXÍGENO (OUR) Y COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO (K<sub>LA</sub>) EN EL MEDIO DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO UTILIZANDO UNA CEPA NATIVA DE *RHIZOPUS SP.***

La determinación de valores de OTR, OUR y K<sub>la</sub>; se obtuvo utilizando como equipo de medida, un medidor de oxígeno disuelto, calibrado (**Anexo 8**) usado dentro del reactor de tipo *batch* conformado con anterioridad dentro del cual hubo 1000ml de medio de producción; de igual forma que con el ensayo anterior, los parámetros de transferencia de masa se determinaron en este tipo de biorreactor por el hecho de que este es un biorreactor base comparado con los otros tres tipos. Se midió la cantidad de oxígeno que hubiese tenido disuelto en ese momento el medio de cultivo para después hacerlo burbujear con oxígeno hasta llegar a un punto estacionario, esto indicó el punto donde el medio es saturado con oxígeno. Terminado esto se inoculó 10ml de la cepa de *Rhizopus sp.* que estaba creciendo en el *seed reactor* y se esperó a que la cepa consuma todo el oxígeno hasta llegar a un valor cercano de a 1ppm de OD, se retiró el medidor del medio de cultivo para limpiarlo y llevarlo a almacén. La determinación de K<sub>la</sub> se dio utilizando la **Ecuación 4**.

### **3.3.7 OBTENCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO EN LOS REACTORES BIOLÓGICOS.**

#### **a) OBTENCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO UTILIZANDO UNA CEPA NATIVA DE *RHIZOPUS SP.* EN UN BIORREACTOR TIPO *BATCH*.**

El biorreactor tipo *batch* conformado con anterioridad fue puesto en funcionamiento para la producción de ácido fumárico (**Anexo 9**); se utilizaron 2000ml del medio de producción (**Anexo 2**) complementado con cloranfenicol; el medio fue autoclavado y enfriado para luego ser inoculado con 10ml de la cepa adaptada de *Rhizopus sp.* El biorreactor fue termostatzado a una temperatura de  $28^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ .; con ayuda de un termostato autorregulable, y oxigenado por medio de microburbujas generadas por un difusor de oxígeno; esperando así tres días para el crecimiento del micelio. Durante este tiempo se tomaron tres muestras de 5ml entre los horarios de 8am, 1pm y 6pm durante cuatro días y luego fueron almacenadas a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  en un refrigerador.

Este procedimiento se realizó dos veces más, para poder generar así datos estadísticos confiables que demuestren que la producción de ácido fumárico no varió con los mismos factores físicos, químicos y biológicos en los tres ensayos en que se realizaron.

#### **b) OBTENCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO UTILIZANDO UNA CEPA NATIVA DE *RHIZOPUS SP.* EN UN BIORREACTOR TIPO TURBIDOSTATO.**

Durante el proyecto, se utilizaron las bombas del BIOFLO 3000 ubicadas en el laboratorio H301, para la entrada y salida de medio de cultivo en los biorreactores de tipo turbidostato y PFTR. Para ello era

necesario determinar cuánto es el flujo de las bombas peristálticas, por que varía de acuerdo al diámetro de las manguerillas y el material de las mismas. Se utilizó una probeta graduada para medir el volúmen alcanzado en un determinado tiempo, se colocó en la sección de SET en el SCREEN del BIOFLO 3000 el valor de 1.00, siendo este el valor mínimo en que la bomba ha podido aspirar el medio de producción, se tomó el tiempo necesario en que el volúmen del medio de producción alcanzó el menisco de los 10 ml dentro de la probeta. Se tomaron tres veces estos valores para así poder generar datos estadísticos.

Se utilizó la **Ecuación 9** para la determinación del flujo del medio de producción:

$$\text{Flujo (ml/s)} = 10\text{ml} / \text{Tiempo tardado} \quad (9).$$

El biorreactor tipo turbidostato conformado con anterioridad fue puesto en funcionamiento para la obtención de ácido fumárico (**Anexo 10**); se utilizaron 2000ml del medio de producción complementado con cloranfenicol. El biorreactor fue termostatzado a una temperatura de  $28^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ . con ayuda de un termostato autorregulable, y oxigenado por medio de microburbujas generadas por un difusor de oxígeno; esperando así tres días para el crecimiento del micelio. El biorreactor fue alimentado con medio fresco que ingresaba al biorreactor por medio de tubo de vidrio e impulsado gracias a una de las bombas peristálticas del BIOFLO 3000, adicionalmente el medio fue extraído por otro tubo de vidrio gracias también a la fuerza peristáltica de otra bomba del BIOFLO 3000. Durante este tiempo se tomaron tres muestras de 5ml entre los horarios de 8am, 1pm y 6pm durante cuatro días y luego fueron almacenadas a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  en un refrigerador.

Este procedimiento se realizó dos veces más, para poder generar así datos estadísticos confiables que demuestren que la producción de ácido

fumárico no varió con los mismos factores físicos, químicos y biológicos en los tres ensayos en que se realizaron.

### c) **OBTENCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO UTILIZANDO UNA CEPA NATIVA DE *RHIZOPUS SP.* EN UN BIORREACTOR PFTR.**

Se utilizaron los pellets de alginato de calcio que contenían la cepa inmovilizada de *Rhizopus sp.* para poder llenar en su totalidad el volúmen del tubo *inside* del biorreactor PFTR; utilizando los valores dimensionales del tubo *inside* del biorreactor se pudo calcular con facilidad los valores del volúmen hueco, espacio hueco y por último el valor de tiempo de retención hidráulica (TRH).

El biorreactor PFTR estaba acoplado de forma vertical al biorreactor BIOFLO 3000 que se encuentra en el laboratorio H301 y tenía uniones con las bombas peristálticas de este que permitieron el ingreso de medio fresco de producción de un recipiente con 2000ml de dicho medio por la parte superior del biorreactor y otra bomba que permitió la salida del medio por la parte inferior del biorreactor. La salida del biorreactor se depositó en el recipiente donde se encontraba el medio de producción que ingresaba por la parte superior del PFTR, generando así una recirculación del medio (**Anexo 11**). Durante cuatro días se tomaron tres muestras de 5ml entre los horarios de 8am, 1pm y 6pm para luego ser almacenadas a una temperatura de 4°C en un refrigerador.

Este procedimiento se realizó dos veces más, para poder generar así datos estadísticos confiables que demuestren que la producción de ácido fumárico no vario con los mismos factores físicos, químicos y biológicos en los tres ensayos en que se realizaron.

#### **d) OBTENCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO UTILIZANDO UNA CEPA NATIVA DE *RHIZOPUS SP.* EN UN FERMENTADOR EN ESTADO SÓLIDO.**

Para poder realizar la obtención de ácido fumárico en el fermentador en estado sólido se tuvo que obtener bagazo de yuca (*manihot esculenta*) por medio de la compra de 2.50 kg de yuca de un supermercado cercano; luego se separó la cáscara y se cortó en pequeños pedazos; para después ser depositada en una licuadora enrazada hasta un litro con agua tibia hervida; una vez licuada se depositó en un colador con malla fina durante 24 horas para filtrar el agua remanente que estaba en la yuca. Pasado este tiempo, se colocaron 2000g del bagazo de yuca en una bolsa de polipropileno y fueron llevados a la autoclave a una temperatura de 121°C por 15 minutos.

Se usó el fermentador conformado con anterioridad y en el interior de este se utilizó bagazo de yuca como matriz sólida para el crecimiento del hongo (**Anexo 12**); adicionalmente, se complementó el medio de cultivo sólido con el medio de producción antes especificado; el medio estuvo en una proporción de 1.5ml de solución para cada 5g de bagazo de yuca, usando esta proporción se utilizaron 300ml del medio de producción. El medio de producción estaba depositado en un lavador de gases de vidrio el cual estaba conectado por un lado una bomba que impulsaba el aire hacia el lavador y de este se expulsaba aire cargado con partículas del medio de producción que ingresaban por medio de un tubo de vidrio hacia el interior del biorreactor. (**Anexo 13**). Durante tres días se esperando el crecimiento del micelio del hongo para luego tomar tres muestras de 5 ml entre los horarios de 8am, 1pm y 6pm durante cuatro días y luego almacenarlas a una temperatura de -4°C en un refrigerador. Este procedimiento se realizó dos veces más, para poder generar así datos estadísticos confiables que demuestren que la producción de ácido

fumárico no varió con los mismos factores físicos, químicos y biológicos en los tres ensayos en que se realizaron.

**3.3.8 PROCESO DE *DOWN STREAM*.** Primero se dejó sedimentar las muestras obtenidas de los biorreactores por lo menos unas 24h. Luego se utilizó carbón activo granulado de 4 a 10 mm de largo y aproximadamente de 4 mm de diámetro. Se lavó el carbón activo con agua estéril para poder eliminar el polvillo que contenía, para luego secarlo a 37°C por 24 horas en la incubadora. Se usó una cantidad de 0.1g de carbón activo con 5 ml de muestra que contenía el ácido fumárico a purificar; en este momento es donde el ácido fumárico comienza a ser adsorbido por el carbón activado; luego, se incubaron las muestras durante 24 horas a 25°C en el baño maría. Se adicionaron 5 ml de acetona por cada 0.1g de carbón activo con el ácido fumárico adsorbido, para dejarlas reposar durante 8 horas, esto fue para poder separar al ácido fumárico puro del carbón activo, para que después el carbón sea filtrado y vuelto a utilizar, los filtrados se colocaron dentro de la estufa por 1 hora a una temperatura de 60°C, luego de pasado el tiempo los cristales se vieron adheridos al vidrio, para ello se adicionaron aproximadamente de 100 ml de agua destilada para poder disolver los cristales.

### **3.3.9. ANÁLISIS DE ÁCIDO FUMÁRICO POR EL MÉTODO DE ESPECTROFOTOMETRÍA.**

**a) PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK.** Se preparó una solución stock de fumarato de sodio de 250 ppm, se pesó 125 mg de fumarato de sodio con grado de reactivo analítico y que fue colocada en una fiola de 500ml de capacidad, luego se llenó con 250ml de agua destilada la fiola, tratando de disolver el fumarato en su mayor cantidad. Una vez disuelto el fumarato, se enrasó la fiola con agua destilada.

**b) PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PATRONES.** Se prepararon 5 soluciones patrones ya que se necesitaban por lo menos cinco patrones para poder generar una curva de calibración; utilizando 5 fiolas de 100ml

de capacidad cada una se procedió a realizar cada una de ellas. Se midieron 1ml, 5ml, 10ml, 15ml, 20ml de la solución stock (250ppm). Estas preparaciones permiten que el espectrofotómetro pueda detectar la longitud de onda en uno de los patrones y que posteriormente sirvan para realizar una curva de calibración.

**c) DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA ANALÍTICA.**

Se seleccionó el modo básico en función “Espectro” en el espectrofotómetro y se ajustaron los parámetros analíticos de  $\lambda S$ ,  $\lambda E$ , Superior e Inferior. Determinando así la onda de trabajo en la curva espectral; asimismo, se determinó la longitud de onda, ya que aunque en teoría se determine que un compuesto posee un determinado rango de longitud de onda, siempre todos los reactivos difieren en pureza y calidad, por ello cada uno posee una longitud de onda específica.

**d) PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.** Las muestras se disolvieron en 5ml de agua destilada y fueron llevadas al espectrofotómetro para poder ser analizadas; los 5ml de agua fueron utilizados para sopesar el hecho de que se utilizaron 5ml de muestra originalmente del biorreactor para la obtención de los cristales de ácido fumárico.

**e) CÁLCULO DE LA ABSORTIVIDAD MEDIA.** Utilizando los resultados de las absorbancias obtenidas de cada uno de los patrones, se calculó la absorptividad media, utilizando la **Ecuación 10**.

$$a = A / (b \times c) \quad (10).$$

En donde (a) representa la absorptividad de cada uno de los patrones, la absorptividad es representada en ml/mg.cm; (A) representa la absorbancia de la muestra patrón; (b) representa la longitud del ancho de la celda

utilizada en el espectrofotómetro; y (c) representa la concentración de la muestra patrón.

**f) CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE LAS MUESTRAS.** La concentración de las muestras, fueron obtenidas a partir del uso de la **Ecuación 11.**

$$C = A / a \times b \quad (11).$$

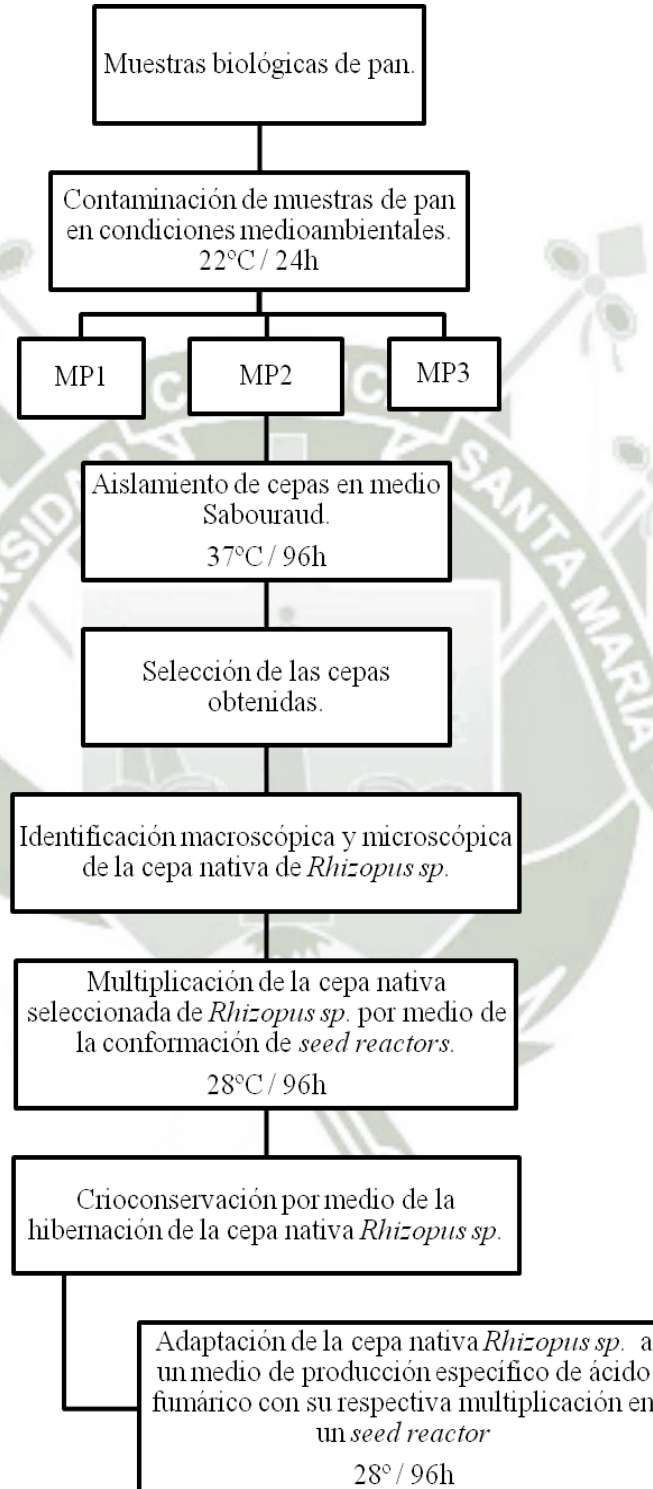
En donde (C), representa la concentración de la muestra; (A) representa la absorbancia de la muestra; (a) representa la absorptividad media y (b) representa la longitud del ancho de la celda utilizada en el espectrofotómetro.

**f) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.**

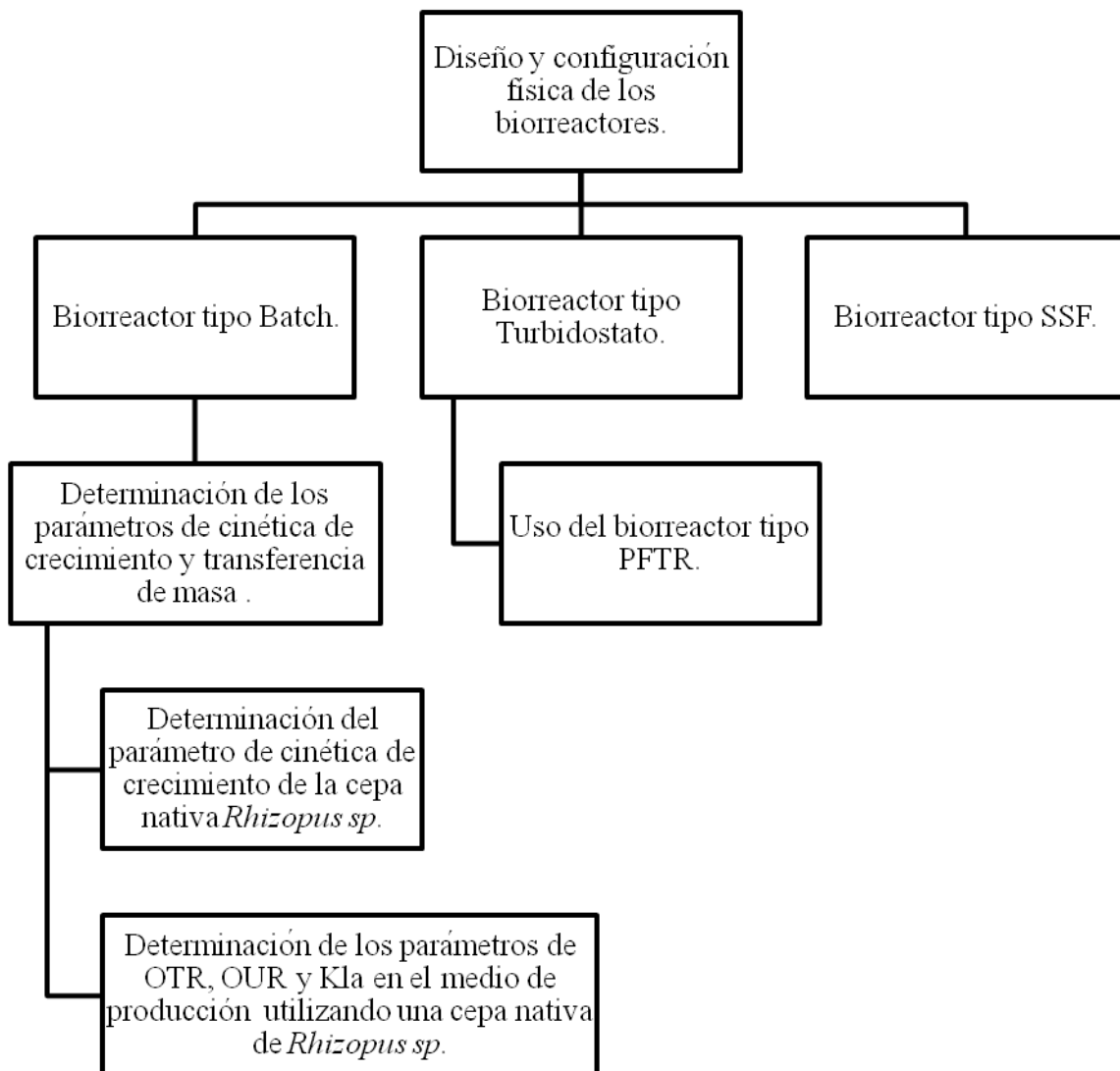
Se comparó los datos obtenidos experimentalmente de la concentración de ácido fumárico producido por *Rhizopus sp.* en los cuatro tipo de biorreactores, realizando así tres ensayos en cada uno de ellos en las mismas condiciones. Se realizó un análisis descriptivo mediante el test ANOVA, que nos permitió comparar simultáneamente todas las medias entre los tres ensayos realizados en cada uno de los biorreactores.

### 3.4. FLUJOGRAMA.

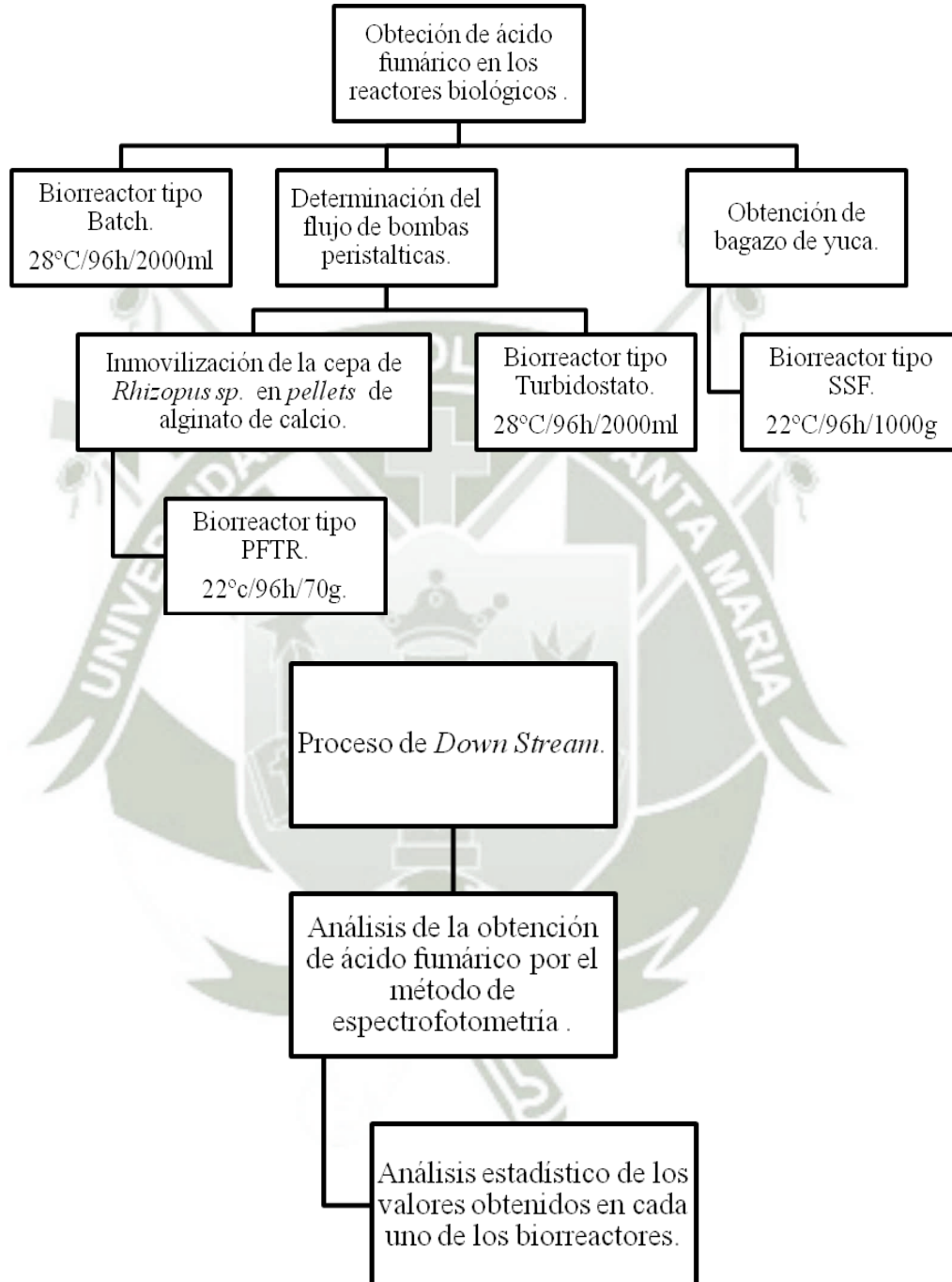
#### 3.4.1 AISLAMIENTO, SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA NATIVA DE *RHISOPUS SP.*



### 3.4.2 DISEÑO Y CONFIGURACIÓN DE LOS REACTORES BIOLÓGICOS JUNTO CON LA DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y TRANSFERENCIA DE MASA (OUR/OTR/Kla) EN EL BIORREACTOR TIPO *BATCH*.



### 3.4.3 OBTENCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO EN LOS REACTORES BIOLÓGICOS JUNTO CON EL PROCESO DE *DOWN STREAM* Y LOS ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE OBTENCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO.



## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **4.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA NATIVA DE *RHIZOPUS SP.* OBTENIDA DE UNA MUESTRA DE PAN CONTAMINADO.**

**4.1.1. EVALUACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS DE *RHIZOPUS SP.* APARTIR DE MUESTRAS DE PAN CONTAMINADO.** Se pudo obtener exitosamente una cepa nativa de *Rhizopus sp.*, partiendo de muestras de pan contaminado que se dejaron a la intemperie durante un día en diferentes lugares de una locación. Se elaboraron tres recipientes de plástico con camas humedecidas hechas a partir de pan y rotuladas con los códigos MP1, MP2 y MP3. Luego de haber pasado cuatro días, y después de haber estado en contacto con el medio ambiente se obtuvo un rápido crecimiento de poblaciones microbiológicas en el interior del recipiente, debido a esto se seleccionaron muestras sospechosas de crecimiento de *Rhizopus sp.* seguidamente se inocularon en placas petri con medio de cultivo Sabouraud complementado con cloranfenicol, lo cual impidió el

crecimiento de bacterias y mantenía a las colonias fúngicas aptas para su crecimiento. Durante el tiempo en que crecían las colonias, se observó diferentes tipos de ellas; por lo cual, se siguió con una serie de repicados hasta obtener colonias individuales.

La muestra N°1(**Figura N°4**), estaba localizada bajo una enredadera, ya que se esperaba que los insectos como las hormigas y moscas, transportasen las esporas de los hongos hacia los pedazos de pan, generando así un crecimiento microbiano no solo de los micelios de los hongos sino también de colonias de bacterias.



**Figura N° 4.** Muestra N°1, localizada bajo la sombra de una enredadera en uno de los vértices de un jardín.

La muestra N°2 (**Figura N°5**), se localizó en la techumbre de un domicilio a una distancia separada del suelo, ya que se esperaba que por medio de las corrientes del viento a esa altura, se pudiera transportar esporas del hongo, generando así también, como en el anterior el crecimiento de diferentes micelios y diferentes colonias de bacterias.



Figura N° 5. Muestra N°2, localizada en la techumbre de un domicilio a una distancia de 3 metros aproximadamente del suelo

La muestra N°3 (**Figura N°6**), se localizó en la sombra de un arbusto ya que se esperaba que los residuos de hojas como el polvo y ácaros cayeran sobre el pan y pudiesen contaminar la muestra, generando como en los otros dos casos el crecimiento de diferentes microorganismos.



Figura N°6. Muestra N°3, localizada bajo la sombra de un arbusto en otro de los vértices de un jardín

La necesidad de implementar tres lugares diferentes para poder obtener cepas nativas de *Rhizopus sp.*; se debe a que existe una mayor probabilidad de que la cepa pueda crecer en por lo menos uno de los tres recipientes con pan. Según la enciclopedia virtual Mamosanta ([http://manosanta.com.uy/contenidos/ceibal/\\_pdf/ciencias-naturales/reino-de-loshongos/005-hongo-negro-del-pan.pdf](http://manosanta.com.uy/contenidos/ceibal/_pdf/ciencias-naturales/reino-de-loshongos/005-hongo-negro-del-pan.pdf)); el hongo puede crecer tanto en hojas como en frutos del suelo cubriendo prácticamente toda la superficie del sustrato afectado en un tiempo aproximado a los tres días; por ello la obtención de una cepa nativa de *Rhizopus sp.* es fácil si se deja expuesto un sustrato como el pan al medio ambiente.

Se tomó como prioridad en la selección de colonias para el repique, a aquellas que coincidían con las características macroscópicas de *Rhizopus sp.*; lastimosamente solo se obtuvieron colonias sospechosas de las muestras provenientes de los recipientes con los códigos MP1 y MP2.

En la figura N° 7, se observa la colonia por el reverso de la placa la cual presenta un color blanco-amarillento, este es un indicio también para la identificación del género *Rhizopus*; porque según (Mier. *et al*, 2002) este género se caracteriza por presentar en el reverso de la colonia un color blanco-grisáceo o blanco-amarillento.



Figura N° 7. Crecimiento micelial de las muestras CMP1(A) y CMP2 (B), visto por el reverso de la placa petri.

El crecimiento del hongo con micelio algodonoso de color blanco en las muestras CMP1(A) y CMP2 (B), después de varios repiques y aislamiento de diferentes colonias, fue indicio de un posible crecimiento de la cepa de *Rhizopus sp.* ya que según (Forbes. *et al* ,2007) la característica de un crecimiento de hifas algodonosas de color blanco, gris o castaño que cubren de manera difusa la superficie del agar en el curso de 24 horas a 96 horas es un indicio de la presencia de los zigomicetos entre ellos el genero *Rhizopus*.

El crecimiento de las colonias fue radial, ya que son hongos, el crecimiento partió del punto de punción en el agar que se realizó con el asa de siembra, según (Canelo. *et al*, 2004) esto se debe a que el hongo expande sus hifas horizontalmente en todas direcciones posibles para el mejor consumo de los nutrientes y en el caso del genero *Rhizopus* irradia sus rizoides en el interior del agar, permitiendo así el levantamiento de los esporangióforos hasta el tope de la placa.

En la figura N°8 se puede observar el crecimiento del micelio en CMP1 después de cuatro días, la cepa presentó principalmente la aparición de hifas largas que llegaban a tocar la tapa superior interna de la placa con la finalidad de poder extenderse, lo cual también es una característica del hongo. El crecimiento de las hifas hacia la parte superior de placa influyo en la necesidad de colocar parafilm en los bordes de la placa petri. La aparición de puntos negruzcos inicialmente comenzó en el centro de la placa petri, específicamente en el lugar donde se realizó la inoculación.



Figura N°8. Crecimiento miceliar aéreo de la muestra CMP1, cuatro días después de su siembra.

El crecimiento miceliar del hongo en CMP1 que se puede observar en la figura N°9, representa el crecimiento del hongo después de dos semanas de su siembra, se demostró la coloración de pequeños puntos de color negro, los cuales corresponden a las esporas generadas por el hongo. Esta característica es conocida como “sal y pimienta” en el cultivo de hongos según (Díaz ,2003) en sus diapositivas presentadas en la facultad de medicina de la Universidad de Chile, este fenómeno indica que el hongo crece adecuadamente según su metabolismo



Figura N°9. Crecimiento miceliar aéreo de la muestra CMP1, dos semanas después de su siembra.

Hasta este momento el crecimiento del micelio tanto en la CMP1 y CMP2, es muy similar, lo cual generó la sospecha de que en ambos existía el crecimiento de cepas del género de *Rhizopus sp.*

**4.1.2. IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE LA CEPA NATIVA DE *RHIZOPUS SP.*** Una vez finalizados los repiques, se obtuvieron dos cepas sospechosas de ser *Rhizopus sp.* provenientes de las muestras CMP1 y CMP2; las muestras fueron analizadas con un estereoscopio para poder visualizar las características macroscópicas de cada una. Las muestras CMP1 y CMP2 poseían similares características, como por ejemplo, el hecho de poseer un micelio aéreo algodonoso y laxo de color blanco con presencia de puntos negros, incluso también contaban con un color blanco- amarillento en el reverso de la colonia. Estas colonias fueron seleccionadas y repicadas en diferentes placas con medio de cultivo Sabouraud con la finalidad de obtener cepas nativas puras, sin ningún contaminante microbiológico como podría ser con mayor probabilidad, el crecimiento de otros tipos de hongos.

Una vez conocida la posibilidad de poder obtener una cepa nativa de *Rhizopus sp.* comparada con las descripciones dadas por (Mier. *et al*, 2002), se pasó a comprobar su existencia con un análisis microscópico usando las coloraciones de KOH al 10% y azul de lactofenol, estas tinciones son recomendadas como métodos de detección directa para este tipo de hongos según (Forbes. *et al*, 2007). La coloración con KOH al 10% no dio buenos resultados ya que no permitía la correcta visualización de las estructuras del hongo; en cambio con la coloración de azul de lactofenol se pudieron observar claramente las estructuras miceliales; según un recurso académico virtual proporcionado por la Universidad Autónoma de Barcelona, en general las células fúngicas se observan bien por microscopia convencional utilizando colorantes sencillos como el KOH al 10%, pero algunas pueden requerir tinciones especiales para facilitar la visualización como lo es el azul de lactofenol. En la muestra CMP2 se observaron hifas hialinas y aseptadas, con presencia de esporangióforos con columnela de

forma piriforme semejante incluso, a un globo, pero lastimosamente no contaba con la presencia de rizoides en los puntos donde los esporangióforos se ramificaban, por ello se categorizó a la muestra como una cepa nativa de *Absidia sp.* según (Forbes. *et al*, 2007).

Se pudo obtener exitosamente una cepa nativa de *Rhizopus sp.*; de la muestra CMP1 obtenida originalmente de la techumbre de un domicilio a una distancia de 3 metros aproximadamente del nivel de suelo; la cepa presentó todas las características macroscópicas deseadas siendo estas: la presencia de un micelio algodonoso laxo de color blanco con hifas largas en el anverso de la placa y la tendencia de empujar la placa superior hacia arriba, incluso con la presencia de pigmentos de color negro en los ápices de las hifas, lo cual indicó la presencia de esporas en el micelio; también se revisó el reverso de la placa para confirmar un color blanco-grisáceo e incluso blanco-amarillento de la colonia; adicionalmente a esto se comprobaron también todas las características microscópicas como son; la presencia de hifas aseptadas, la ramificación de esporangióforos con columnelas ovales, la presencia de esporangios redondos, y por último y también como la característica más importante de las cepas de *Rhizopus sp.*, contar con la presencia de rizoides que se ramifican en los estolones donde también se ubican las bases de los esporangióforos.

A continuación se presentarán imágenes vistas al microscopio con 100X, en las cuales se observarán las estructuras de las muestras CMP2 y CMP1 respectivamente.

En la figura N°10 se muestra las estructuras fúngicas de la muestra N°2, se puede observar la presencia de hifas, junto con esporangióforos, pero se puede apreciar que no existe presencia de rizoides en el estolón formado por la hifa y el esporangióforo (círculo rojo), lo cual da sospecha de la presencia de una cepa de *Absidia sp.* según también por las características presentadas por (Forbes. *et al*, 2007).



Figura N°10. Estructura fúngica de la muestra CMP2, vista con microscopio 100X, con azul de lactofenol.

En la figura N°11, se observa la presencia de esporangióforos diferenciados y con columnelas de forma oval (círculo rojo), y alrededor de todas ellas se puede observar un pequeño número de esporas

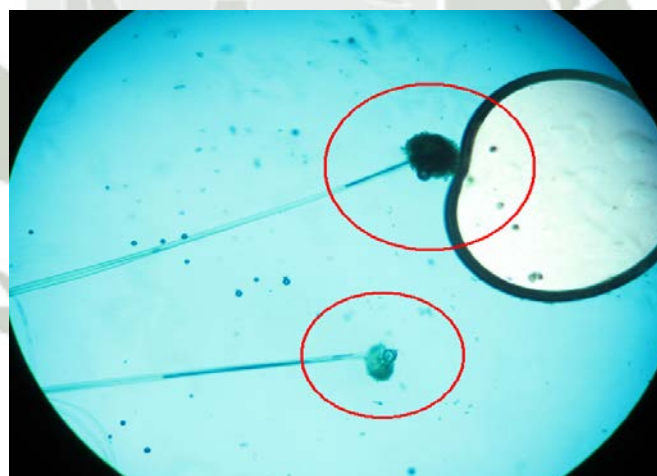


Figura N°11. Estructura fúngica de la muestra CMP1, vista con microscopio 100X, con azul de lactofenol.

En la figura N°12, se observa la presencia de rizoides diferenciados (círculo rojo), en los estolones formados por las hifas y los esporangióforos; adicionalmente se observa la presencia de una columnela colapsada, debido a la liberación de las esporangiósporas al medio; lo que nos da un indicio de las estructuras características del género de *Rhizopus sp*



Figura N°12. Estructura fúngica de la muestra CMP1, vista con microscopio 100X, con azul de lactofenol.

Finalmente en la figura N°13, se observa la presencia de un esporangióforo con su columnela respectiva de forma oval y repleta de esporas ovales, adicionalmente en la parte inferior de la imagen se observa otro grupo de rizoides. La presencia de rizoides durante la identificación del género *Rhizopus sp.*, es un clave en la identificación de este tipo de microorganismo.



Figura N°13. Estructura fúngica de la muestra CMP1, vista con microscopio 100X, con azul de lactofenol.

Todas estas características son idénticas a las características microscópicas y macroscópicas publicadas en la página web (<http://hongos-alergenicos.reviberoammicol.com/files/038.PDF>), en donde presentan galerías de diferentes cepas microbianas.

**4.2. MULTIPLICACIÓN DE LA CEPA NATIVA SELECCIONADA DE *RHIZOPUS SP.* POR MEDIO DE LA CONFORMACIÓN DE UN *SEED REACTOR* Y LA CRIOCONSERVACIÓN DE LA MISMA.** Se conformó exitosamente un *seed reactor* con la colonia aislada e identificada de la cepa nativa de *Rhizopus sp.* de la muestra de pan contaminada CMP1. Este *seed reactor* fue conformado utilizando medio de cultivo PD, el cual es muy utilizado en el crecimiento de hongos, ya que suministra gran cantidad de carbohidratos y proteínas con el uso de extracto de papa y dextrosa; adicionalmente al medio de cultivo se le agregó cloranfenicol como antibiótico, lo cual impidió el crecimiento de bacterias, pero aun así no impidió el crecimiento de levaduras.



Figura N°14. Dos *seed reactors* conformados utilizando la cepa nativa de *Rhizopus sp.* obtenida de la muestra CMP1.

La conformación de dos *seed reactors* (A y B) en la figura N°14, requirió del uso de la misma cepa nativa identificada y aislada con anterioridad para la inoculación de estos, se inoculó la cepa en dos reactores, debido a la duda de que hubiese podido existir contaminación en el interior de alguno de ellos. Durante la fase experimental este fue el caso, en uno de los biorreactores el crecimiento fue retenido por la presencia de otro microorganismo, que por medio de una tinción de gram se descubrió que fue una levadura, identificada por el color azul que las caracteriza como gran positivas. Afortunadamente se observó un rápido y adecuado crecimiento del hongo en el interior del otro *seed reactors* y gracias a este se pudo seguir adecuadamente la siguiente fase experimental. El uso de *seed reactor* como técnica de multiplicación celular, no solo es utilizado en el crecimiento de hongos, sino también en cualquier otro tipo de crecimiento celular como en el caso de la compañía biotecnología *Refine technology* que realiza la expansión de células humanas en biorreactores cuya fundamento es similar al de los *seed*

*reactors* conformados en este proyecto de tesis; ambos buscan el incremento de biomasa de un cierto tipo de células en las mejores condiciones.

Adicionalmente se tomó una alícuota del *seed reactor* (A) para poder realizar un tratamiento en el cual se puedan conservar durante mucho más tiempo la cepa obtenida, se obtuvieron así, las hifas sin contaminantes y sin medio de cultivo, agregando glicerol al 10% para impedir la formación de cristales de agua que dañasen las estructuras celulares y al finalizar se colocaron a una temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$  en un congelador.



Figura N°15. Conservación de la cepa nativa de *Rhizopus sp.* utilizando glicerol 10%.

El glicerol al 10% fue utilizado ya que ha sido demostrado que es uno de los componentes que preservan mejor las estructuras celulares, según (Restrepo *et al*, 2011) en un estudio donde se utilizaba glicerol junto con dimetilformamida como criopreservadores en la rápida congelación de semen canino; el glicerol ya que es una sustancia no electrolítica y de bajo peso molecular preserva adecuadamente material biológico; adicionalmente, el glicerol al estar en una concentración del 10% con el restante de agua

convierte a la solución en hipertónica, lo cual estimula a la célula a eliminar agua, al descender la temperatura el glicerol ingresa en la célula evitando daño celular por los cristales y cuando se desee descongelar la muestra, se deberá calentar lentamente a baño maría a 37°C, se lava las células con agua, esto incita al glicerol a salir de la célula y que el agua comience a ingresar de nuevo.

**4.3. ADAPTACIÓN DE LA CEPA NATIVA *RHIZOPUS SP.* A UN MEDIO DE PRODUCCIÓN ESPECIFICO DE ÁCIDO FUMÁRICO.** Se conformó un sistema de tubos de ensayo, en los cuales se colocaron concentraciones diferentes de medio PD y de medio de producción, estos tubos fueron inoculados con una alícuota de 1 ml de la cepa que crecía en el *seed reactor*. Se observó desde el segundo día de inoculación el crecimiento de cada uno de los tubos, debido a que en el primer día no se observaba crecimiento visual alguno.

Día / Tubo	Tubo 1(25%)	Tubo 2 (50%)	Tubo 3 (75%)	Tubo 4 (100%)
Día 2	++	+	+	+
Día 3	++	+	+	+
Día 4	+++	++	++	+
Día 5	++++	+++	+++	++

Tabla N°7. Adaptación de la cepa de *Rhizopus sp.*, en diferentes concentraciones de medio de producción.

La calificación fue solamente visual y por un sistema de cruces, únicamente se observó día a día si existía crecimiento miceliar y cómo iba este evolucionando al pasar el tiempo. Como se puede observar en la tabla N° 7, las concentraciones de cada tubo están referidas a la cantidad de medio de producción que existe en cada uno de ellos. En el tubo 1 con 25%, se observó que a lo largo del periodo de evaluación, fue el que tuvo mayor rango de

crecimiento en comparación con los demás tubos, pero ya que el objetivo es obtener una cepa que se adapte mejor al medio de producción, se optó por elegir a la cepa que crecía en el tubo 3 con 75%, ya que es la cepa que crece mejor a una concentración más alta del medio de producción. Esta cepa posteriormente fue colocada en un nuevo *seed reactor* para su crecimiento, ya que después tuvo que ser utilizada como inóculo para los cuatro tipos de biorreactores utilizados en este proyecto.

En la figura N°16 se puede observar el crecimiento de los hongos en tubos de ensayos con diferentes concentraciones del medio de producción, este crecimiento se dio en tres partes diferenciadas del tubo, al ser el género *Rhizopus* un hongo aerobio, una gran parte del crecimiento se ubicó en la parte superior del tubo, para luego extenderse en forma escasa por el medio y abundantemente en el final del tubo; ya que al ser colocado al Baño María existió mayor contacto del fondo del tubo con el agua temperada, es por ello que el hongo tuvo un crecimiento mayor en esta zona, incluso que en la zona superior del tubo que estaba en contacto con el aire.

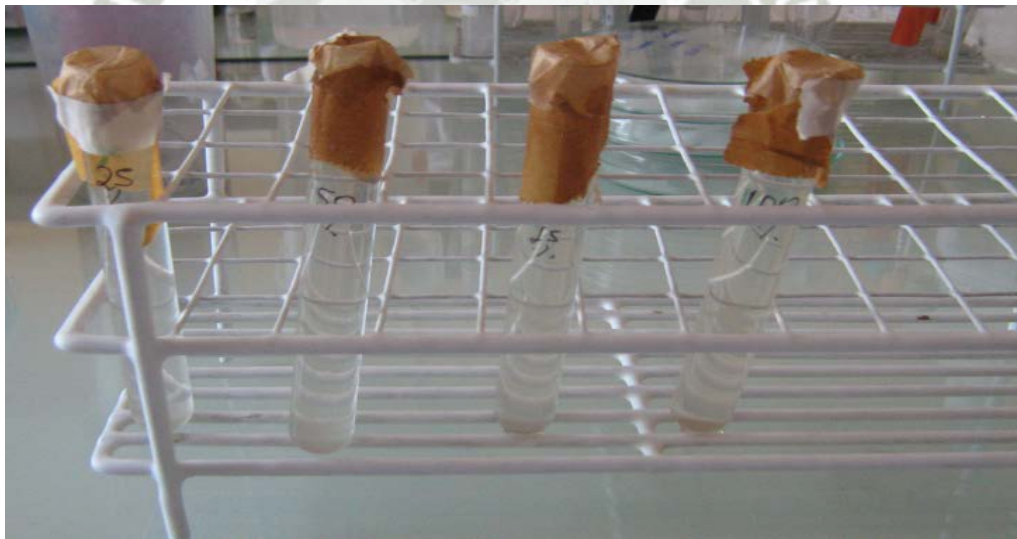


Figura N°16. Adaptación de la cepa nativa de *Rhizopus sp.* a diferentes concentraciones del medio de producción. (25%; 50%; 75%; 100%).

El uso de dos *seed reactors* se basa en que inicialmente se obtuvo una cepa nativa aislada e identificada de *Rhizopus sp.* que estaba adecuada a crecer en un medio de cultivo

PD, esto ocurrió en la primera multiplicación de la cepa en el primer sistema de *seed reactors*, pero para poder producir el ácido fumárico óptimamente fue necesario realizar otro sistema de *seed reactors* con el medio de producción y la cepa adaptada al nuevo medio de cultivo.

En el trabajo (Kenealy, *et al.* 1986 ) se determinó que la producción de ácido fumárico era mayor en un medio de glucosa con una cantidad de sales que permitieron el crecimiento de la cepa; en comparación con el trabajo presentado la cepa no presentó ningún cambio drástico en el crecimiento de su micelio comparando el medio de producción que, como principal fuente de carbono fue la glucosa, con el medio PD en el cual su principal fuente de carbono es el almidón, en ambos medio de cultivo se observó un correcto crecimiento.

**4.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CELULAR DEL INOCULO PARA LOS BIOREACTORES.** Se determinó la concentración celular del inóculo que iba a ingresar a los biorreactores utilizando la técnica de conteo celular con cámara de Neubauer, se realizaron tres conteos de tres tomas de alícuota del *seed reactor*, para poder obtener datos estadísticos.

	<b>Primer Conteo</b>	<b>Segundo Conteo</b>	<b>Tercer Conteo.</b>
<b>Sumatoria</b>	81	96	80
<b>Concentración celular (Cantidad de esporas/ml)</b>	202500	240000	200000
<b>Promedio (Cantidad esporas/ml)</b>	214166		

Tabla N°8. Cuadro comparativo de tres conteos celulares realizados para determinar la concentración celular del inóculo de *Rhizopus sp.*

Utilizando los valores de los promedios y utilizando la **Ecuación 8**, se obtuvieron los siguientes resultados:

Con el resultado del promedio se obtiene un valor aproximado de la concentración celular del inóculo, que va a ingresar a los bioreactores. Adicionalmente es importante tener en cuenta el horario (3pm) y el día (4° día después de inoculación en el *seed reactor*), ya que si se realizan diferentes conteos en diferentes intervalos de tiempo, estos variarían enormemente.

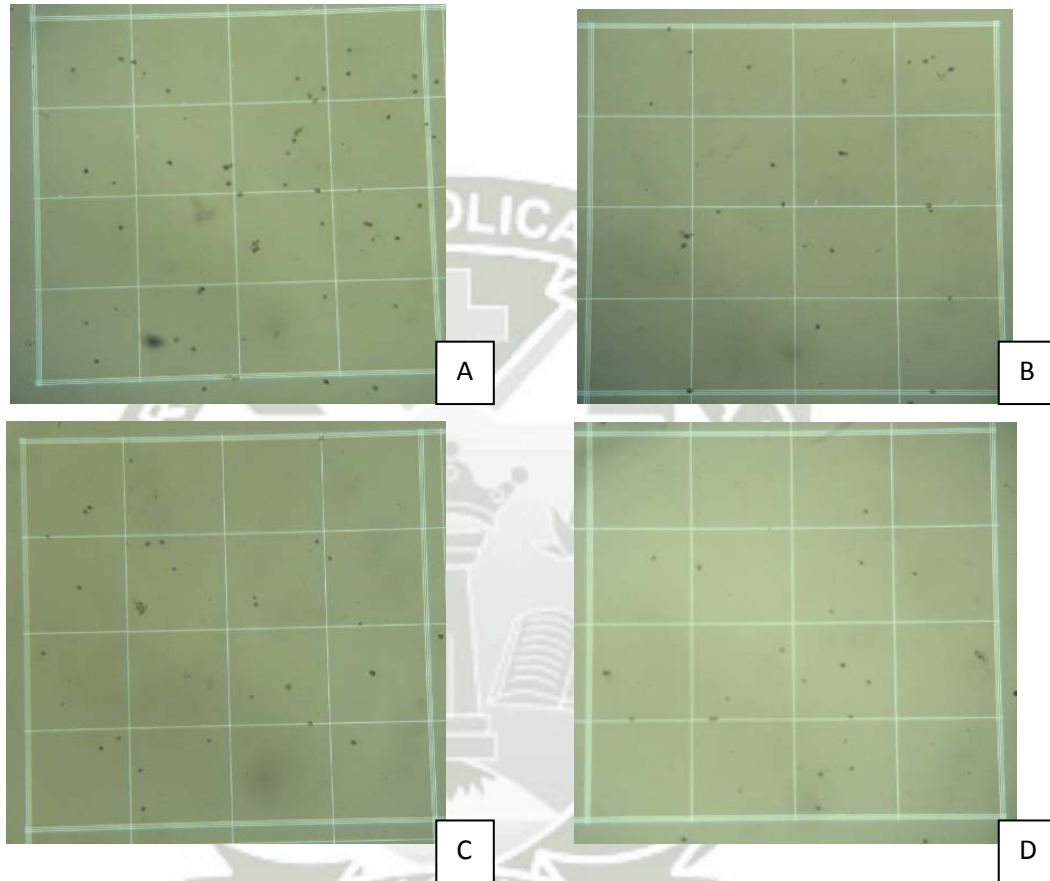


Figura N° 17. Vista del primer recuento celular vista 100X.

El conteo de las esporas se realizó en cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer (A, B, C, D); el conteo se comenzó de derecha a izquierda, se contabilizó las esporas que se localizaban en las líneas izquierdas dentro del cuadrante según esa dirección; y cuando se contaba de izquierda a derecha, se contabilizaron las esporas en las líneas derechas dentro del cuadrante.

Las esporas eran diferenciadas de otras manchas o pequeñas burbujas de agua, por medio del movimiento del condensador del microscopio, ya que al realizar el movimiento de arriba hacia abajo se lograba ver los bordes bien definidos de las esporas.

#### 4.5 DISEÑO Y CONFIGURACIÓN DE LOS REACTORES BIOLÓGICOS DE TIPO *BATCH*, TURBIDOSTATO Y SSF.

##### 4.5.1. DISEÑO Y CONFIGURACION DEL *HEADPLATE* Y DEL *FOUNDATION*.

El diseño del *headplate* y del *foundation* únicamente se basó en el uso de madera con las especificaciones proporcionadas en el capítulo anterior. La Figura 18 presenta un esquema de la distribución de los puertos de ingreso y salida como por ejemplo el ingreso de aire estéril como fuente de  $O_2$  y exhausto de gases agotados utilizados en el biorreactor tipo *batch* que fue considerado como *base case* para el tipo turbidostato y SSF; la figura también demuestra el puerto de toma de muestra; el de puerto de  $CaCO_3$  que tendría que ingresar al *vessel* de reacción y el puerto de temperatura para insertar el termostato para controlar el sistema isotérmico conformado.

Cabe resaltar que durante el experimento el puerto de  $CaCO_3$  no fue necesario para el uso que originalmente tuvo, en lugar de eso sirvió como el puerto de salida del aire.

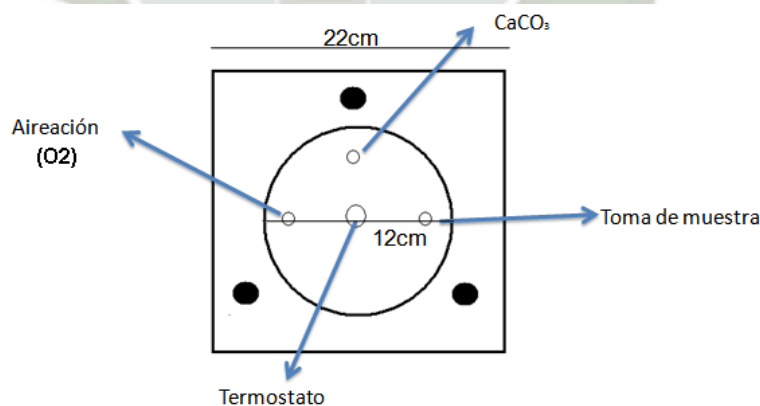


Figura N°18. Esquema del *base case* del *headplate* para los biorreactores tipo *batch*, turbidostato y SSF.

Se considera un modelo básico o *base case* ya que sirvió como prototipo en la configuración de los sistemas de biorreacción tipo turbidostato y SSF; también porque presentó similar funcionalidad durante el desarrollo de *Rhizopus sp.* y la generación extracelular de ácido fumárico como metabolito principal de la cepa.

En el caso de los biorreactores tipo SSF y turbidostato se necesitaron otras dos entradas ya que ambos poseían flujos de alimentación y de salida distribuidos adecuadamente en el *headplate*. Cabe resaltar, que el ingreso de un antiespumante que se pensaba necesario inicialmente, al momento de realizar el trabajo experimental, no fue útil debido a que la formación de espuma no tuvo lugar durante el periodo en que estuvo funcionando el biorreactor, esto es debido a que la formación de espuma es directamente influida por la degradación de proteínas, y como el medio de producción prácticamente no cuenta con proteínas o extractos, genero la ausencia de esta.

#### 4.5.2. DISEÑO Y CONFIGURACIÓN DEL BIORREACTOR TIPO *BATCH*.

A continuación se observará como se configuró el biorreactor tipo *batch*.

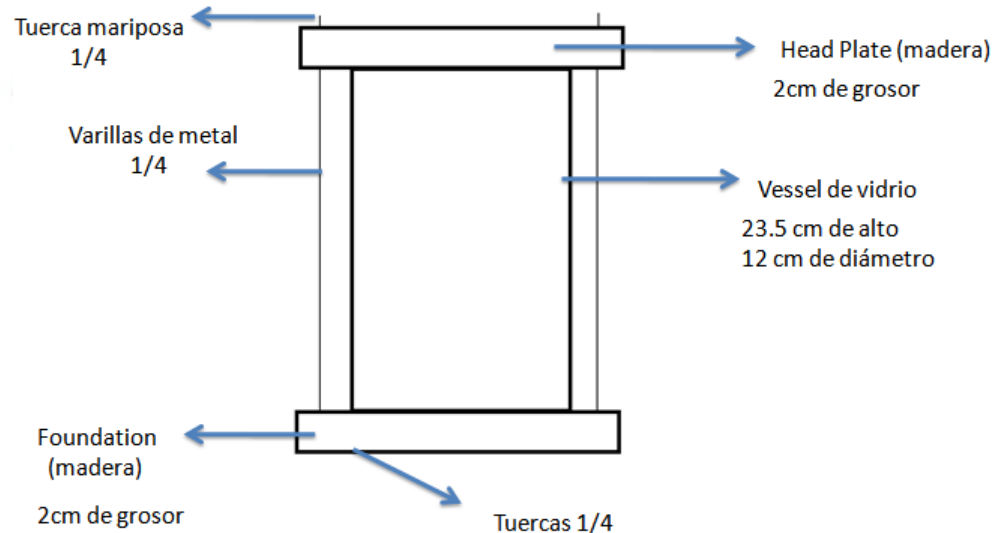


Figura N°19. Esquema del diseño del biorreactor tipo *batch*.

El biorreactor tipo *batch* posee únicamente un *vessel* asegurado con varillas de metal a dos superficies de maderas talladas para que el *vessel* embone adecuadamente. El biorreactor no posee entradas ni salidas, lo cual no generó aumento ni disminución del volumen del medio de producción, únicamente se administraba una fuente de oxígeno para que la cepa pueda crecer adecuadamente.

**4.5.3. DISEÑO Y CONFIGURACIÓN DEL BIORREACTOR TIPO TURBIDOSTATO.** A continuación se observará el esquema del diseño del biorreactor tipo turbidostato, mostrando así los equipos que fueron necesarios para su óptimo funcionamiento como las bombas del BIOFLO 3000. (Fig. N°20)

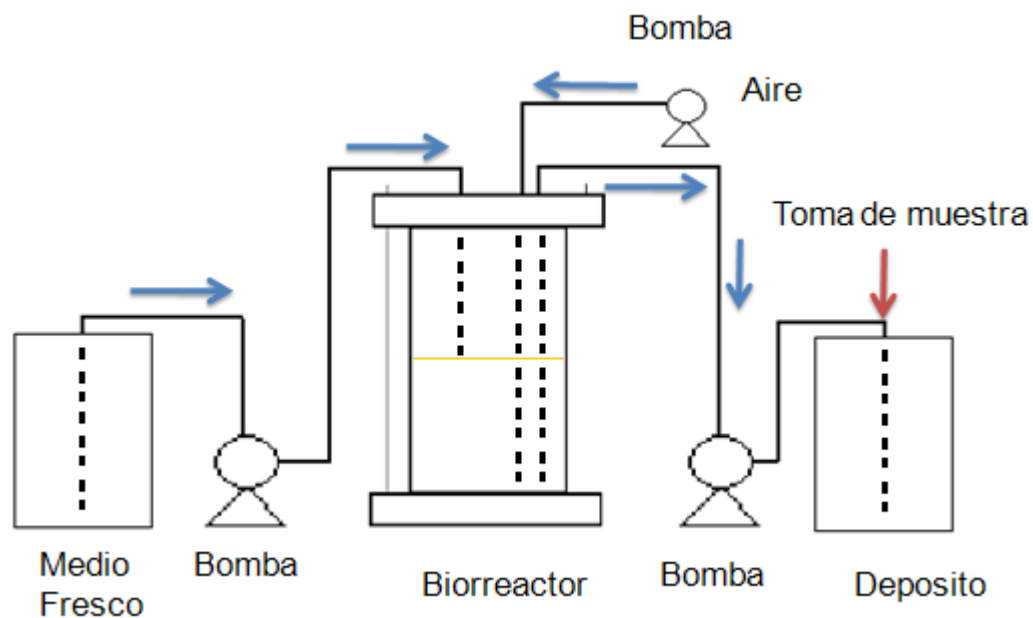


Figura N°20. Esquema del diseño del biorreactor tipo turbidostato.

Este tipo de biorreactor se caracteriza por el hecho de presentar entradas y salidas del medio de cultivo en el interior del bioreactor, como se puede observar en el esquema el medio de cultivo fresco es alimentado por una bomba peristáltica BIOFLO 3000 (Fig. N°20) y llevado al interior del bioreactor con un flujo volumétrico,

seguidamente otra bomba también del BIOFLO3000 absorbe parte del medio de cultivo del biorreactor y lo dirige al interior de un depósito, es en el transcurso de este trayecto, que se realizó la toma de muestras, justo antes de que el medio absorbido del biorreactor ingrese en el depósito. Adicionalmente, se puede observar una bomba en la parte superior del biorreactor; esta bomba es la encargada de suministrar el suficiente oxígeno en el interior del biorreactor para el adecuado crecimiento de la cepa.

**4.5.4. DISEÑO Y CONFIGURACIÓN DEL BIORREACTOR TIPO SSF.** A continuación se observa el esquema de diseño del bioreactor tipo SSF mostrando los equipos necesarios para su funcionamiento como: el lavador de gases y la bomba de aireación.

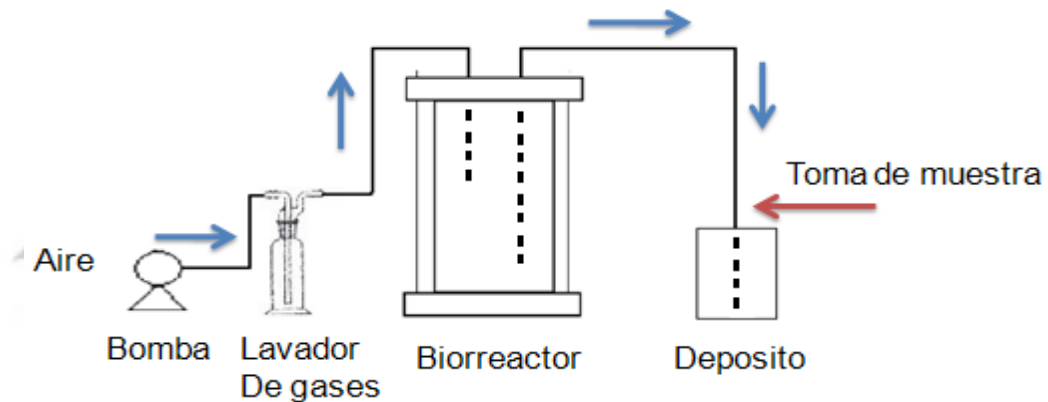


Figura N°21. Esquema del diseño del biorreactor tipo SSF.

En este tipo de biorreactor se utiliza un equipo de vidrio llamado lavador de gases, este equipo contenía el medio de producción, que al momento de recibir el flujo de aire suministrado por la bomba, generaba un ingreso de aire colmado con los componentes del medio de producción en el interior del biorreactor. Este al encontrarse totalmente cerrado generaba un efluente hacia el depósito exterior, antes de que este ingrese se realizaba la toma de muestra.

**4.5.5. DISEÑO Y CONFIGURACIÓN DEL BIORREACTOR TIPO PFTR.**A continuación se observará el esquema del diseño del biorreactor tipo PFTR mostrando en el los equipos necesarios para su funcionamiento, como lo son las bombas peristálticas del BIOFLO3000. (Fig. N°22)

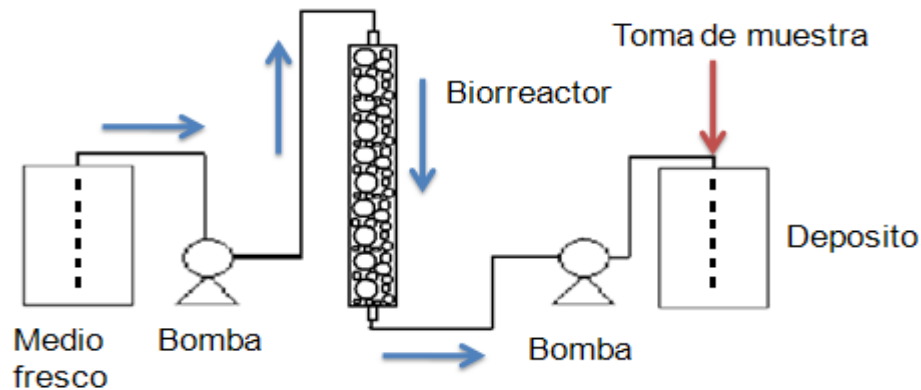


Figura N°22. Esquema del diseño del biorreactor tipo PFTR.

En este tipo de biorreactor se utilizan dos bombas peristálticas al igual que con el biorreactor tipo turbidostato. El medio fresco ingresa al biorreactor PFTR por la parte superior y es retirada por la parte inferior del biorreactor gracias a la ayuda de otra bomba peristáltica, el medio de producción es consumido por la cepa; y además de esto la recolección de muestra se realiza antes de ingresar al depósito. Cabe resaltar la presencia de las perlas de alginato en el interior del PFTR que permiten la inmovilización de la cepa pero que a su vez impide el crecimiento adecuado de las mismas.

**4.6. DETERMINACIÓN DEL PARAMETRO DE CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN EL REACTOR BIOLÓGICO TIPO BATCH.** Una vez conformado el biorreactor tipo *batch*, fue llenado con 2000 ml de medio de producción e inoculado con 10 ml de la cepa de *Rhizopus sp.* Se comenzó a tomar muestras un día después de su inoculación durante 4 días a diferentes intervalos de tiempo, tomando cantidades determinadas de

muestras en un tubo falcon. Antes de ello se tuvo que pesar el tubo falcon en el cual se iba a realizar la toma de muestra, para que después el peso del tubo vacío se restase del peso del tubo lleno con la muestra, dándonos así el valor exacto de la biomasa por diferencia de pesos.

El peso del tubo falcon vacío fue de 4.87 g, este dato fue útil para determinar la biomasa por diferencia de pesos porque una vez decantado el medio donde crecía el hongo, luego de centrifugar, la masa restante era pesada junto con el tubo, se restaba el peso del tubo y se obtenía la biomasa exacta. A continuación se observará un cuadro en el que se demuestra la cantidad de biomasa producida en un intervalo de tiempo.

<b>Tiempo Horas</b>	<b>Concentración Cel. g/ml</b>	<b>Volúmen ml</b>	<b>Biomasa g.</b>
		2010	
24	0.0012	2005	2.4
29	0.0013	2000	2.7
34	0.0017	1995	3.4
48	0.0026	1990	5.2
53	0.0027	1985	5.3
58	0.0031	1980	6.1
72	0.0047	1975	9.4
77	0.0052	1970	10.16
82	0.0053	1965	10.49
96	0.0056	1960	10.89
101	0.0059	1955	11.57
106	0.0061	1950	11.89

Tabla N°9. Valores obtenidos a partir de datos del ensayo de determinación de la cinética de crecimiento.

El cuadro demuestra los valores de biomasa obtenidos a partir de los datos experimentales del volúmen del medio de cultivo en el interior del reactor y los datos de concentración generados a partir del peso obtenido de biomasa en un volúmen de 5ml, por ejemplo para el primer caso, se obtuvo una concentración de 0.0012 mg/ml, esto quiere decir que se pesaron originalmente 0.06g de biomasa fungal a partir de 5ml de muestra. Estos datos como se pueden ver, están variando según el tiempo, obviamente debido al crecimiento de la biomasa del hongo, ya que esta se encuentra en un medio líquido óptimo para su crecimiento; adicionalmente, se puede observar como decrece el volúmen del medio de cultivo, debido a que en el momento en que se realiza la toma de muestra siempre se llega a sacar los 5 ml y no se logran reponer ya que es un biorreactor de tipo *batch*.

Utilizando los datos, se procedió a usar la fórmula de la **Ecuación 1**. Una vez, realizada la ecuación se obtuvieron los datos de  $M^{1/3}$  mediante el programa Microsoft Excel 2007, y con ellos se generó una ecuación lineal, la cual es fundamental para poder hallar el valor de  $\lambda$ . Los pasos para poder determinar este valor se encuentran en el **Anexo 21**.

<b>M 1/3</b>	<b>Tiempo h</b>
1.34	24
1.39	29
1.50	34
1.73	48
1.74	53
1.83	58
2.11	72
2.17	77
2.19	82
2.22	96
2.26	101
2.28	106

Tabla N°10. Valores de  $M^{1/3}$  obtenidos a partir de los datos de biomasa de la tabla N°9.

Utilizando los datos de  $M^{1/3}$  junto con los del tiempo se realiza una regresión lineal, asegurándose de que se obtenga la ecuación en el gráfico, ya que a partir de esta se obtendrá el valor exacto de  $\lambda$ .

Se puede observar cómo es que los datos de  $M^{1/3}$  aumentan de forma directamente proporcional al tiempo, y que por momento no se sabe en qué tiempo el crecimiento comienza a detenerse o estancarse.

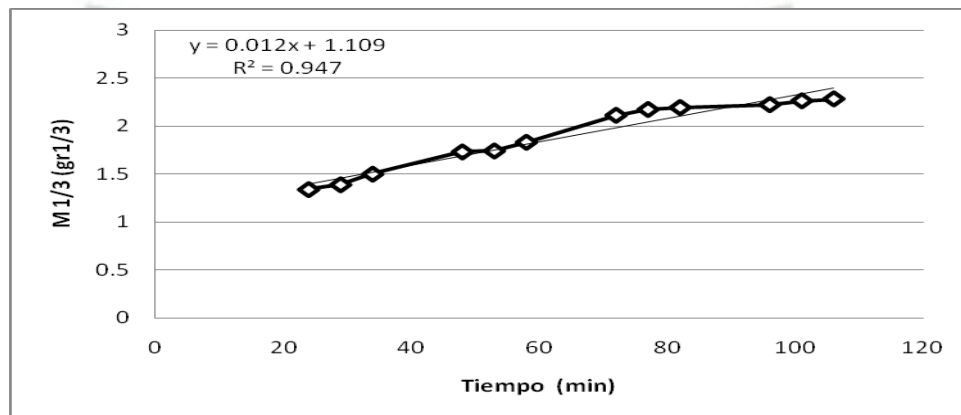


Figura N° 23. Gráfica de dispersión con marcadores entre los datos del tiempo (h) y los datos de  $M^{1/3}$ . Programa Microsoft Excel 2007

Como se puede observar los marcadores se están agrupando de tres en tres, debido a que existe un gran cambio tanto en  $M^{1/3}$  como en el tiempo cada día, y por ello las muestras que se tomaron en un día se asemejan entre sí. Adicionalmente se puede apreciar como los valores de  $M^{1/3}$ , aumentan en el tiempo, lo cual indica que la cantidad de masa celular está creciendo adecuadamente.

La ecuación lineal resultante fue  $y = 0.012x + 1.109$  y utilizando la **Ecuación 2**. Se obtuvo una tercera ecuación  $1/3 \lambda = 0.012$ ; y con la última ecuación se logró, obtener el valor de la cinética de crecimiento del hongo  $\lambda = 0.036 M^{1/3}$

Cabe resaltar que este valor representa el crecimiento de la cepa si existiesen las mejores condiciones de crecimiento y la cepa no estuviera en ningún estado de estrés.

**4.7. DETERMINACIÓN DEL PARAMETRO DE TRANSFERENCIA DE MASA EN EL REACTOR BIOLÓGICO TIPO *BATCH*.** Se determinó también el valor de transferencia de masa, regido por el transporte del oxígeno en el medio de cultivo OTR y el transporte de oxígeno al interior de la célula OUR. Luego de obtener los datos correspondientes a OUR (**Anexo 15**) y OTR (**Anexo 14**), se procedió a realizar una gráfica con los valores de OUR obtenidos en un tiempo determinado.

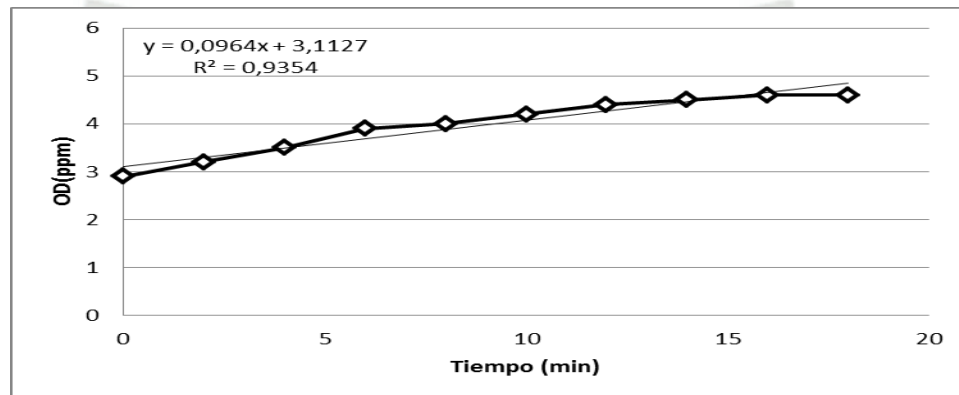


Figura N°24. Gráfica de dispersión entre los datos del tiempo (min) y los datos de OD (ppm) . Programa Microsoft Excel 2007.

La gráfica de la figura N°24, representa los datos obtenidos en el periodo de OTR, como se puede observar en el tiempo 0, se tiene un valor de OD de 2.9 ppm, debido a que en el interior del medio de cultivo aún se encontraba oxígeno disuelto, esto puede ser arreglado con un suministro de  $N_2$  gaseoso al medio, lo cual hubiese permitido tener un valor cercano a 0 en el tiempo 0; además de ello, se puede apreciar que después del tiempo 0, se comenzó a suministrar oxígeno hasta llegar a un punto cercano al minuto 18 en el que el valor de OD llegó a su tope de 4.6 ppm, esto corresponde al valor de  $C^*L$  que será utilizado a continuación.

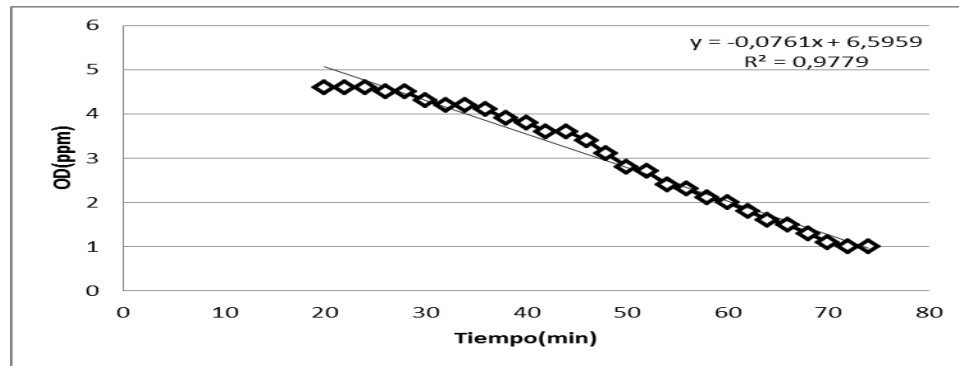


Figura N°25. Gráfica de dispersión entre los datos del tiempo (min) y los datos de OD (ppm) . Programa Microsoft Excel 2007.

La gráfica está demostrando como es que la cantidad de oxígeno disuelto comienza a disminuir a partir de los 20 minutos aproximadamente, justo cuando se inocula la cepa de *Rhizopus sp.*; estos datos corresponden a OUR, ya que este proceso representa el paso del oxígeno disuelto hacia la célula y la pérdida del mismo en el interior del medio cultivo. La ecuación lineal nos da un valor de 0.0761 , la cual corresponde al valor de OUR de todo el proceso, este valor sera utilizado posteriormente para calcular la OTR y la  $K_{la}$  por medio de diferentes ecuaciones.

Tiempo (min)	OD (ppm)	$\Delta CL/\Delta t$	OTR (OUR + $\Delta CL/\Delta t$ )	$C^*L - CL$	$K_{la}$
0	2.9	-	-	-	-
2	3.2	0.15	0.226	1.4	0.16
4	3.5	0.15	0.226	1.1	0.20
6	3.9	0.2	0.276	0.7	0.39
8	4	0.05	0.126	0.6	0.21
10	4.2	0.1	0.176	0.4	0.44
12	4.4	0.1	0.176	0.2	0.88
14	4.5	0.05	0.126	0.1	1.26
16	4.6	0.05	0.126	0	-
<b>promedio</b>			0.18±0.05	-	0.51±0.4

Tabla N° 11. Valores de  $K_{la}$  obtenidos junto con el promedio final.

Utilizando una serie de ecuaciones se obtiene el valor promedio de 0.51 para  $Kla$ . Debido a que  $Kla$  es el resultado de la agrupación de dos constantes, del área de transferencia de oxígeno de la burbuja al medio y de la constante de transferencia del oxígeno a la célula es por ello que al obtener el valor de 0.51  $Kla$ , es el tiempo en que el oxígeno pasa de la burbuja al medio, se transfiere inmediatamente a la célula y lo que tarda ella en consumirlo. No influye en nada si el medio está sobresaturado de oxígeno, la célula tomará ese tiempo para poder consumir la molécula de  $O_2$  que necesite. La metodología para poder obtener este resultado se detalla con mayor claridad en el **Anexo 22**.

#### **4.8. REQUISITOS PARA EL FUNCIONAMIENTO DE LOS REACTORES BIOLÓGICOS.**

**4.8.1. OBTENCIÓN DE BAGAZO DE YUCA (*MANIHOT ESCULENTA*).** Para el biorreactor con fermentación en estado sólido se necesitó un soporte hecho de bagazo de yuca. Inicialmente se obtuvo 2.220 Kg de bagazo de yuca, a partir de 2.50 Kg de yuca comprada y posteriormente 2.225 Kg de pulpa de yuca. La pérdida de peso de 275 g al inicio del ensayo, es debido a que la corteza cubre gran parte de la raíz de yuca y no es útil en la obtención de bagazo, y la siguiente pérdida de masa de 5g, se debe a que durante la esterilización en el autoclave cierta parte del bagazo se quedó pegada en el interior de la bolsa, haciendo dificultosa su obtención.

**4.8.2. DETERMINACIÓN DEL FLUJO DE LAS BOMBAS PERISTÁLTICAS DEL BIOFLO 3000.** Para el uso del biorreactor PFTR y turbidostato es necesario utilizar las bombas del equipo BIOFLO 3000 del laboratorio H301, se debió de determinar el flujo de las bombas manualmente, ya que el flujo programado varía debido al material de las bombas a al diámetro interior de la misma .

A continuación se muestran los resultados de tres medidas que se realizaron para poder determinar el flujo, para obtener así un promedio final, primeramente se presentan los resultados de la bomba utilizada para poder alimentar al biorreactor

(bomba A), seguidamente estarán los resultados de la bomba utilizada para extraer el medio de cultivo (bomba B)

	<b>Ensayo 1</b>	<b>Ensayo 2</b>	<b>Ensayo 3</b>
<b>Tiempo (s)</b>	76	75	76

Tabla N° 12. Datos del tiempo tardado de tres ensayos en el que el medio de producción lleno 10 ml de una probeta. Utilizando la bomba A.

Utilizando los datos obtenidos del tiempo en que demoro el medio en llenar 10 ml de la probeta, se puede calcular el flujo de la bomba.

	<b>Ensayo 1</b>	<b>Ensayo 2</b>	<b>Ensayo 3</b>
<b>Flujo (ml/s)</b>	0.1315	0.1333	0.1315

Tabla N° 13. Valores del flujo de tres ensayos en el que el medio de producción lleno 10 ml de una probeta. Utilizando la bomba A.

Seguidamente se observan los valores encontrados para la bomba B.

	<b>Ensayo 1</b>	<b>Ensayo 2</b>	<b>Ensayo 3</b>
<b>Tiempo (s)</b>	75	75	74

Tabla N° 14. Datos del tiempo tardado de tres ensayos en el que el medio de producción lleno 10 ml de una probeta. Utilizando la bomba B.

Utilizando los datos obtenidos del tiempo en que demoró el medio en llenar 10 ml de la probeta, se puede calcular fácilmente el flujo de la bomba, el cual es 0.1339ml/s como promedio resultante.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
<b>Flujo (ml/s)</b>	0.1333	0.1333	0.1351

Tabla N° 15. Valores del flujo de tres ensayos en el que el medio de producción lleno 10 ml de una probeta. Utilizando la bomba B.

#### 4.8.3. DETERMINACIÓN DE LAS DIMENSIONES DEL BIORREACTOR DE TIPO PFTR.

Para el biorreactor PFTR, se necesitaba una cantidad específica de *pellets* de alginato de calcio, pero para obtener el dato específico del volúmen necesario de *pellets* se necesitaba conocer el volúmen del tubo interior del biorreactor. Utilizando los datos respecto de las medidas de las dimensiones del tubo interior del PFTR, se determinó el volúmen interior.

Largo(cm)	Diámetro(cm)	Volúmen (cm <sup>3</sup> )
39	1.5	68.88

Tabla N° 16. Dimensiones del tubo interno del biorreactor de tipo PFTR.

Utilizando el valor del volúmen del tubo interior del PFTR, se tiene una idea de cuantos *pellets* de alginato de calcio se necesitan.

Adicionalmente se necesita el conocimiento del valor de la TRH, utilizando la **Ecuación 5** se obtiene. TRH=514.41s. como resultado de la división de 68.88 cm<sup>3</sup> con 0.1339 cm<sup>3</sup>/s.

El valor de TRH, está relacionado al tiempo de residencia del medio en el interior de biorreactor, ya que tiene un valor de 514.41 s. o 8.57 min. , significa que el medio se demora ese tiempo en recorrer todo el espacio en el interior del reactor.

Para poder conocer los valores del espacio hueco y espacio ocupado del reactor, se necesita primero conocer el valor del volúmen hueco, el cual es obtenido restando el volúmen total (68.88 cm<sup>3</sup>) con el volúmen total de *pellets* introducidos (43 cm<sup>3</sup>), teniendo como tal, volúmen hueco = 25.88 cm<sup>3</sup>.

Usando ese valor, se determina el volúmen hueco y el volúmen ocupado, utilizando la **Ecuación N°6**, se divide el volúmen hueco (25.88 cm<sup>3</sup>) entre el volúmen total (68.88 cm<sup>3</sup>) teniendo como resultado  $\epsilon = 0.375$  y  $\Psi = 0.625$ .

En porcentaje el valor de  $\epsilon$  es 37.5 % y para  $\Psi$  es 62.5%; esto nos indica de que los valores obtenidos son los adecuados para el funcionamiento del biorreactor, ya que se sabe que el valor de  $\epsilon$  debe de ser menor al 20% y el valor de  $\Psi$  no menor del 80%.(Cátedra dictada en Ing. de biorreactores, Año 2012)

**4.9 ANÁLISIS DE ÁCIDO FUMÁRICO POR EL MÉTODO DE ESPECTROFOTOMETRÍA.** Se determinó la longitud de onda de trabajo para el análisis de fumárico, teniendo como resultados para los valores de  $\lambda_S = 330$ ,  $\lambda_E = 200$ , Superior +1.50 A y para Inferior +0.00 A. Teniendo como longitud de onda más específica 208.4 nm. Durante el análisis de ácido fumárico por el método espectrofotométrico, resultó en una serie cinco patrones con una absorbancia cada uno.

CALIBRATION			CHANGE DATA Y/N ?
STD. No.	CONC.	ABS.	
1	0.0025	0.479	
2	0.0125	0.920	
3	0.0250	1.400	
4	0.0375	1.900	
5	0.0500	2.400	

Figura N° 26. Imagen obtenida del espectrofotómetro en donde se observan el número de patrones, con sus respectivas concentraciones (mg/ml) y absorbancias (nm)

Utilizando los datos obtenidos del espectrofotómetro, se realizó adicionalmente la curva de calibración, usando los patrones ya mostrados, obteniendo así la siguiente gráfica.

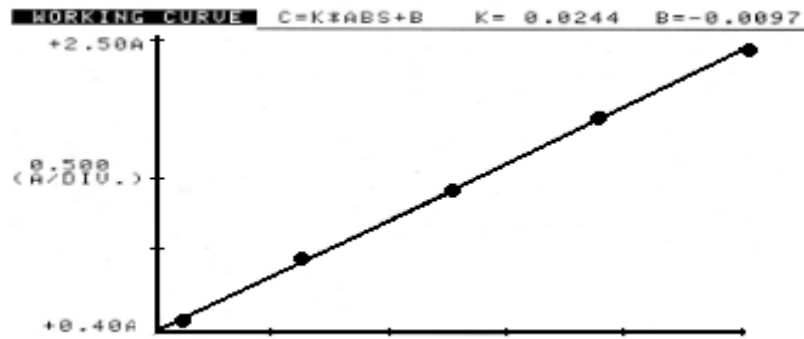


Figura N°27. Imagen obtenida del espectrofotómetro, en donde se observa la curva de calibración de los patrones.

Con los resultados de las absorbancias de los patrones, se obtienen los datos de la absortividad para cada uno de ellos, y sacando la media de los resultados, se obtiene la absortividad media que es igual a 84.68ml /mg.cm

Patrón	Absorbancia	Absortividad (ml/mg.cm)
1	0.479	191.6
2	0.926	74.08
3	1.426	57.04
4	1.957	52.19
5	2.426	48.52

Tabla N°17. Cuadro de comparación de los valores de las absorbancias y de las absortividades de cada una de las muestras patrones.

El valor de la absortividad promedio, es fundamental para poder calcular la concentración de ácido fumárico en las muestras utilizando la **Ecuación 10**.

#### 4.10 OBTENCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO EN LOS REACTORES BIOLÓGICOS.

**4.10.1. OBTENCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO UTILIZANDO *RHIZOPUS SP.* EN UN BIORREACTOR TIPO *BATCH*.** Los resultados de la concentración de ácido fumárico producido por la cepa nativa de *Rhizopus sp.* en un biorreactor tipo *batch*, serán mostrados a continuación en un cuadro con tres divisiones debido a que se realizaron tres diferentes ensayos, pero considerando las mismas condiciones en los mismos, tales como la misma cantidad de inóculo, la misma cantidad de medio de cultivo y el mismo intervalo de toma de muestras.

En el cuadro se observarán la concentración de cada una de las muestras, junto con su horario respectivo, las absorbancias se encuentran en **(Anexo 16)**.

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Concentración Primer ensayo (mg/ml)</b>	<b>Concentración Segundo ensayo (mg/ml)</b>	<b>Concentración Tercer ensayo (mg/ml)</b>
24	0.0001	0.0001	0.0001
29	0.0001	0.0001	0.0001
34	0.0001	0.0001	0.0001
48	0.0007	0.0005	0.0006
53	0.0007	0.0006	0.0007
58	0.0010	0.0008	0.0012
72	0.0015	0.0012	0.0017
77	0.0055	0.0044	0.0058
82	0.0084	0.0067	0.0098
96	0.0095	0.0085	0.0111
101	0.0122	0.0097	0.0127
106	0.0140	0.0112	0.0145

Tabla N°18. Concentraciones de ácido fumárico obtenido en tres diferentes ensayos en el biorreactor tipo *batch*.

La primera división muestra los datos de la concentración obtenidos de la muestras en el primer ensayo del biorreactor tipo *batch*, como se puede observar el valor máximo es de 0.0140 mg/ml en el horario de 6 pm del cuatro día. La segunda división muestra los datos de la concentración obtenidos de la muestras en el segundo ensayo del biorreactor tipo *batch*, como se puede observar el valor máximo es de 0.0112 mg/ml en el horario de 6 pm del cuatro día, un valor menor al del primer ensayo. La tercera división muestra los datos de la concentración obtenidos de la muestras en el tercer ensayo del biorreactor tipo *batch*, como se puede observar el valor máximo es de 0.0145 mg/ml en el horario de 6 pm del cuatro día, un valor semejante al del primer ensayo.

En el trabajo de (Petruccioli, *et al.* 1996); fue un trabajo de optimización de la producción de ácido fumárico con una cepa de *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526. Utilizando esta cepa en un inmovilizado de partículas de poliuteroano en el interior de un biorreactor tipo *batch*, el sistema tuvo una producción optimizada de 0.256g/l en un hora; realizando la comparación con los datos obtenidos en este trabajo experimental la producción en ese sistema fue mucho mayor que la que se presenta actualmente.

A continuación se observara un grafico en donde se compara la producción de acido fumárico en los tres diferentes ensayos del sistema batch

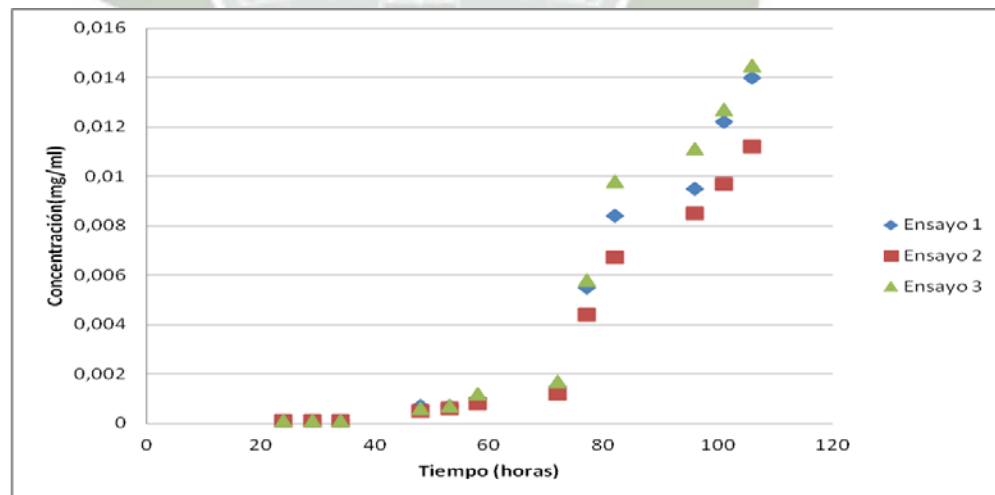


Figura N°28. Grafica comparativa de la producción de acido fumárico en los tres ensayos del sistema *batch*.

**4.10.2. OBTENCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO UTILIZANDO *RHIZOPUS SP.* EN UN BIORREACTOR TIPO TURBIDOSTATO.** Los resultados de la concentración de ácido fumárico producido por la cepa nativa de *Rhizopus sp.* en un bioreactor tipo turbidostato, serán mostrados a continuación en un cuadro dividido en tres secciones debido a que se realizaron tres diferentes ensayos, pero considerando las mismas condiciones en los mismos, tales como la misma cantidad de inóculo, la misma cantidad de medio de cultivo y el mismo intervalo de toma de muestras.

En el cuadro se observa la concentración de cada una de las muestras, junto con su horario respectivo, las absorbancias se encuentran en (**Anexo 17**).

La primera división muestra los datos de la concentración obtenidos de la muestras en el primer ensayo del bioreactor tipo turbidostato, como se puede observar el valor máximo es de 0.0004 mg/ml en el horario de 6 pm del cuatro día, un valor muy bajo en comparación con los obtenidos en el bioreactor tipo *batch*. La segunda división muestra los datos de la concentración obtenidos de la muestras en el segundo ensayo del bioreactor tipo turbidostato, como se puede observar el valor máximo es de 0.0008 mg/ml en el horario de 6 pm del cuatro día, también un valor muy bajo en comparación con los obtenidos en el bioreactor tipo *batch*, pero un poco más alto que en el primer ensayo. La tercera división muestra los datos de la concentración obtenidos de la muestras en el tercer ensayo del bioreactor tipo turbidostato, como se puede observar el valor máximo es de 0.0009 mg/ml en el horario de 6 pm del cuatro día, también un valor muy bajo en comparación con los obtenidos en el bioreactor tipo *batch*, y semejante al del primer ensayo.

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Concentración Primer ensayo (mg/ml)</b>	<b>Concentración Segundo ensayo (mg/ml)</b>	<b>Concentración Tercer ensayo (mg/ml)</b>
24	0.0000	0.0001	0.0000
29	0.0000	0.0001	0.0001
34	0.0000	0.0001	0.0001
48	0.0001	0.0002	0.0002
53	0.0001	0.0002	0.0002
58	0.0002	0.0003	0.0003
72	0.0002	0.0004	0.0004
77	0.0002	0.0004	0.0005
82	0.0002	0.0006	0.0006
96	0.0003	0.0006	0.0007
101	0.0003	0.0006	0.0007
106	0.0004	0.0008	0.0009

Tabla N°19. Concentraciones de ácido fumárico obtenido en tres diferentes ensayos en el biorreactor tipo turbidostato.

A continuación se observara un grafico en donde se compara la producción de ácido fumárico en los tres diferentes ensayos del sistema turbidostato.

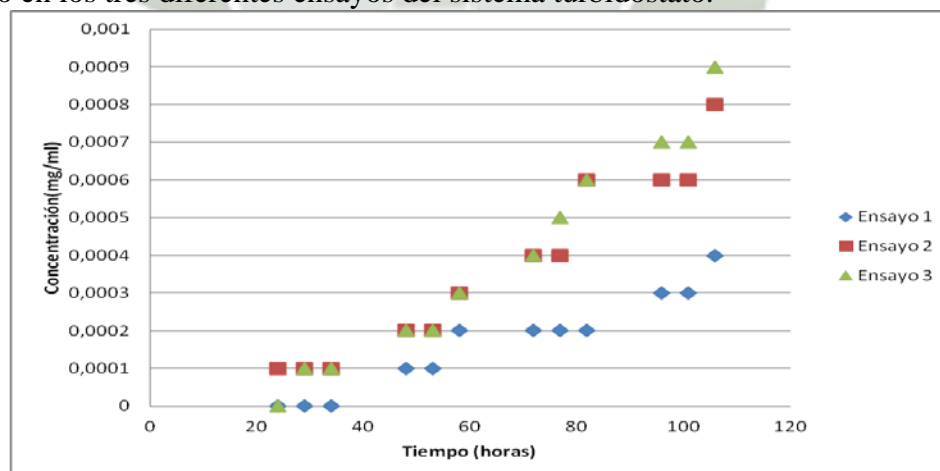


Figura N°29. Grafica comparativa de la producción de ácido fumárico en los tres ensayos del sistema turbidostato.

**4.10.3. OBTENCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO UTILIZANDO *RHIZOPUS SP.* EN UN BIORREACTOR TIPO (SSF).** Los resultados de la concentración de ácido fumárico producido por la cepa nativa de *Rhizopus sp.* en un biorreactor tipo SSF, serán mostrados a continuación en un cuadro dividido en tres partes debido a que se realizaron tres diferentes ensayos, pero considerando las mismas condiciones en los mismos, tales como la misma cantidad de inóculo, la misma cantidad de medio de cultivo y el mismo intervalo de toma de muestras.

En el cuadro se observarán la concentración de cada una de las muestras, junto con su horario respectivo, las absorbancias se encuentran en (**Anexo 18**). La primera división muestra los datos de la concentración obtenidos de la muestras en el primer ensayo del biorreactor tipo SSF, como se puede observar el valor máximo es de 0.0007 mg/ml en el horario de 6 pm del cuatro día, un valor muy bajo en comparación con los obtenidos en el biorreactor tipo *batch* y semejante a los valores obtenidos en el biorreactor tipo turbidostato. La segunda división muestra los datos de la concentración obtenidos de la muestras en el segundo ensayo del biorreactor tipo SSF, como se puede observar el valor máximo es de 0.0017 mg/ml en el horario de 6 pm del cuatro día, un valor un poco bajo en comparación al valor más alto obtenido en el biorreactor tipo *batch* y mucho más alto que los valores obtenidos en el biorreactor tipo turbidostato. La tercera división muestra los datos de la concentración obtenidos de la muestras en el tercer ensayo del biorreactor tipo SSF, como se puede observar el valor máximo es de 0.0012 mg/ml en el horario de 6 pm del cuatro día, un valor un poco bajo en comparación al valor más alto obtenido en el biorreactor tipo *batch*, mucho más alto que los valores obtenidos en el biorreactor tipo turbidostato y semejante al segundo valor obtenido del segundo ensayo del biorreactor tipo SSF.

En el trabajo (Moresi. *et al.*, 1991) se utiliza harina de papa como un sustrato sólido para el crecimiento de *Rhizopus arrhizus* y por consiguiente para la producción de ácido fumárico, cabe resaltar que en este trabajo se realizaron diferentes ensayos con diferentes concentraciones de carbono y nitrógeno como aditivos al medio, durante el trabajo se obtuvo una concentración de 6 a 8.4 g/l por

día de ácido fumárico; en comparación con el trabajo presentado, y sobre todo con la producción del ácido usando un sustrato sólido como la yuca para su crecimiento, es mucha la diferencia obtenida entre este trabajo y el trabajo presentado; pero esto debido a que el trabajo de (Moresi. *et al.*, 1991); es un trabajo netamente de optimización y tenían como objetivo principal incremental la producción de ácido fumárico usando harina de papa.

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Concentración</b>		
	<b>Concentración Primer ensayo (mg/ml)</b>	<b>Segundo ensayo (mg/ml)</b>	<b>Concentración Tercer ensayo (mg/ml)</b>
24	0.0001	0.0002	0.0002
29	0.0002	0.0004	0.0003
34	0.0002	0.0005	0.0003
48	0.0003	0.0006	0.0004
53	0.0003	0.0008	0.0004
58	0.0003	0.0010	0.0005
72	0.0004	0.0009	0.0007
77	0.0004	0.0010	0.0008
82	0.0005	0.0011	0.0009
96	0.0006	0.0013	0.0010
101	0.0006	0.0015	0.0011
106	0.0007	0.0017	0.0012

Tabla N°20. Concentraciones de ácido fumárico obtenido en tres diferentes ensayos en el biorreactor tipo SSF.

A continuación se observara un grafico en donde se compara la producción de ácido fumárico en los tres diferentes ensayos del sistema SSF.

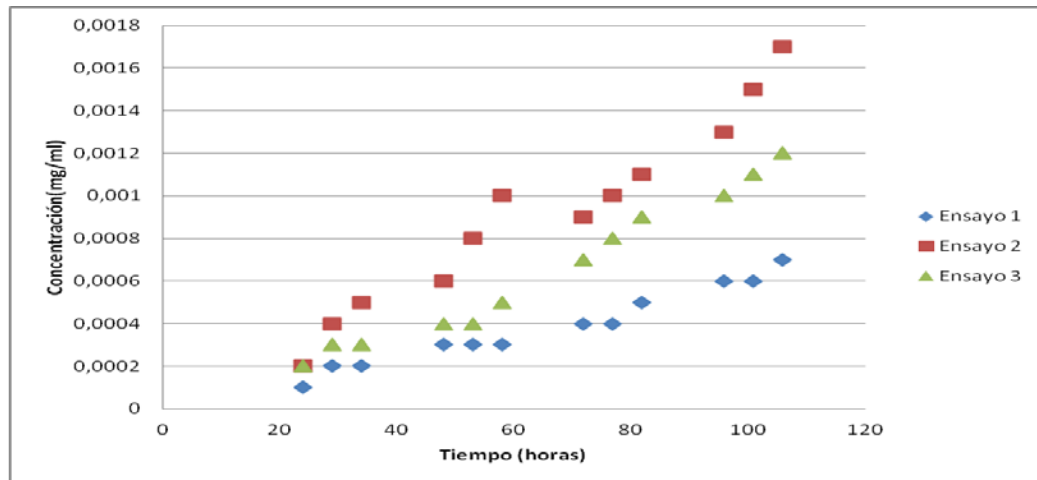


Figura N°30. Grafica comparativa de la producción de ácido fumárico en los tres ensayos del sistema SSF.

#### 4.10.4. OBTENCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO UTILIZANDO *RHIZOPUS SP.*

**EN UN BIORREACTOR TIPO (PFTR).** Los resultados de la concentración de ácido fumárico producido por la cepa nativa de *Rhizopus sp.* en un biorreactor tipo PFTR, serán mostrados a continuación en un cuadro dividido en tres, debido a que se realizaron tres diferentes ensayos, considerando las mismas condiciones en los mismos.

En los cuadros se observarán la concentración de cada una de las muestras, junto con su horario respectivo, las absorbancias se encuentran en (**Anexo 19**). La primera división muestra los datos de la concentración obtenidos de la muestras en el primer ensayo del biorreactor tipo PFTR, como se puede observar el valor máximo es de 0.0003 mg/ml en el horario de 6 pm del cuatro día, un valor muy bajo en comparación con los valores obtenidos en los demás biorreactores. La segunda división muestra los datos de la concentración obtenidos de la muestras en el segundo ensayo del biorreactor tipo PFTR, como se puede observar el valor máximo es de 0.0003 mg/ml en el horario de 6 pm del cuatro día, el mismo valor que en el segundo ensayo además, es un valor muy bajo en comparación con los valores obtenidos en los demás biorreactores. La tercera división muestra los datos de la concentración obtenidos de la muestras en el tercer ensayo del biorreactor tipo PFTR, como se puede observar el valor máximo es de 0.0003 mg/ml en el horario de 6 pm del cuatro

día, el mismo valor que en el segundo ensayo y el primero, además, es un valor muy bajo en comparación con los valores obtenidos en los demás biorreactores.

En el trabajo de (Gu, *et al* 2013); se utilizó un método de inmovilización en red de la cepa *Rhizopus arrhizus* RH-07-13; este trabajo fue optimizado únicamente durante la fermentación y estimulación de la esporulación de la cepa, la producción de ácido fumárico fue de 3.23g/l en 144h; en comparación con los datos obtenidos en este trabajo experimental, la producción con este tipo de inmovilizado fue mayor que la inmovilización en *pellets* de alginato; debido a que los *pellets* no permiten el crecimiento de las hifas, en cambio la red permite el crecimiento de esta, pero hasta un determinado espacio de 0.05 x 0.1 cm en un red con área de 150 cm<sup>2</sup>

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Concentración</b>		
	<b>Concentración Primer ensayo (mg/ml)</b>	<b>Segundo ensayo (mg/ml)</b>	<b>Concentración Tercer ensayo (mg/ml)</b>
24	0.0001	0.0001	0.0001
29	0.0001	0.0001	0.0001
34	0.0001	0.0001	0.0001
48	0.0001	0.0001	0.0001
53	0.0001	0.0001	0.0001
58	0.0001	0.0001	0.0001
72	0.0002	0.0002	0.0002
77	0.0002	0.0002	0.0002
82	0.0002	0.0002	0.0002
96	0.0002	0.0002	0.0002
101	0.0002	0.0002	0.0002
106	0.0003	0.0003	0.0003

Tabla N°21. Concentraciones de ácido fumárico obtenido en tres diferentes ensayos en el biorreactor tipo PFTR.

A continuación se observara un grafico en donde se compara la producción de acido fumárico en los tres diferentes ensayos del sistema SSF.

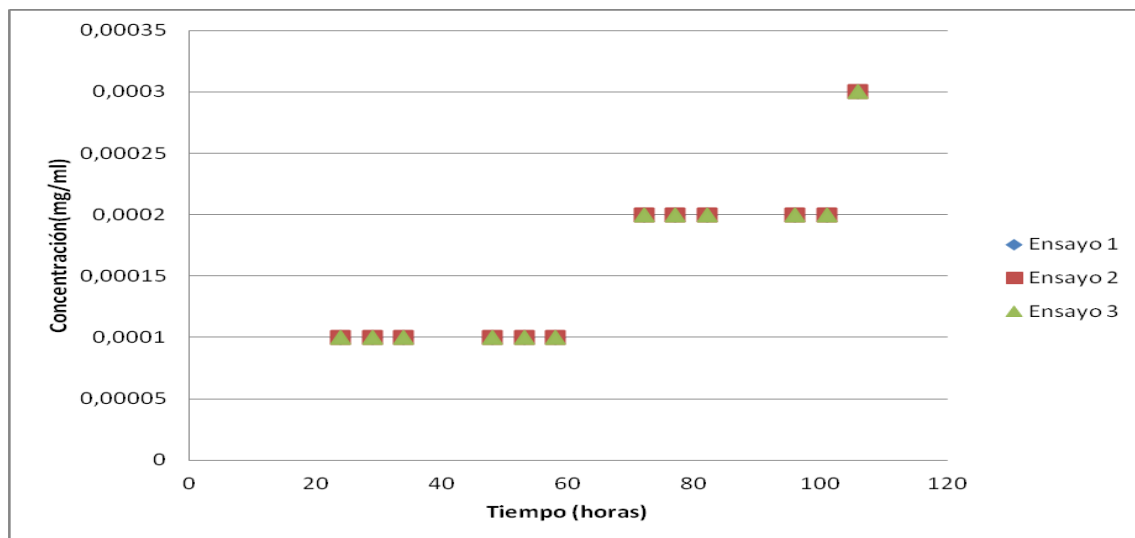


Figura N°31. Grafica comparativa de la producción de acido fumárico en los tres ensayos del sistema PFTR.

#### 4.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO EN CUATRO TIPOS DE BIORREACTORES.

##### 4.11.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO EN TRES ENSAYOS UTILIZANDO EL BIORREACTOR TIPO *BATCH*.

Mediante la configuración de la  $H_0$  (hipótesis nula), esta afirma que en los tres ensayos o grupos existe una igualdad, del mismo modo, la  $H_a$  (hipótesis alternativa) afirma que al menos dos medias no son iguales. Durante este proceso de aceptación rechazo, se lleva implícito un riesgo, que es cuantificado por el valor de  $p$ , el cual, expresa una probabilidad de aceptar la hipótesis nula como cierta o, cuando la cierta podría ser la hipótesis alternativa. El valor  $p$  utilizado fue de 0.05, lo cual indica una seguridad del 95% al momento de aceptar una de las hipótesis.

Por presentarse mas de dos grupos a analizar, se optó por utilizar una prueba de ANOVA, utilizando el programa estadístico SPSS statistics v.20. y los últimos datos experimentales obtenidos de la **Tabla 18. (pág. 99)**.

Según la tabla resultante del test ANOVA (**Anexo 23**), el nivel de significación (sig) del test es 0.201, el cual es mayor a 0.05 (valor de  $p$ ). Por lo que, hay suficiente evidencia experimental para aceptar la hipótesis nula; es decir, no existe diferencia significativa entre los datos generados en el biorreactor tipo *batch*.

**4.11.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO EN TRES ENSAYOS UTILIZANDO EL BIORREACTOR TIPO TURBIDOSTATO.** Utilizando los últimos datos experimentales de la **Tabla 19** (pág. 101) y por medio del programa estadístico SPSS statistics v.20., se obtuvo una tabla ANOVA, (**Anexo 23**) en la que el nivel de significación (sig) del test es 0.108, el cual es mayor a 0.05. Por lo que, hay suficiente evidencia experimental para aceptar la hipótesis nula; es decir, no existe diferencia significativa entre los datos generados en el biorreactor tipo turbidostato.

**4.11.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO EN TRES ENSAYOS UTILIZANDO EL BIORREACTOR TIPO SSF.** Utilizando los últimos datos experimentales de la **Tabla 20**(pág. 103) y por medio del programa estadístico SPSS statistics v.20, se obtuvo una tabla ANOVA (**Anexo 24**), en la que el nivel de significación (sig) es 0.401, el cual es mayor a 0.05. Por lo que hay suficiente evidencia experimental para aceptar la hipótesis nula; es decir, no existe diferencia significativa entre los grupos generados en el biorreactor tipo SSF.

**4.11.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO EN TRES ENSAYOS UTILIZANDO EL BIORREACTOR TIPO PFTR.** Utilizando los últimos datos experimentales de la **Tabla 21**(pág. 105) y por medio del programa estadístico SPSS statistics v.20., se obtuvo una tabla ANOVA (**Anexo 24**), en la que el nivel de significación (sig) es 1, el cual es mayor a 0.05. Por lo cual, hay suficiente evidencia experimental para aceptar la hipótesis nula; es

decir, no existe diferencia significativa entre los grupos generados en el biorreactor tipo PFTR.

#### **4.12 COMPARACIÓN DE LAS VARIABLES DEPENDIENTES EN CADA UNO DE LOS BIORREACTORES.**

##### **4.12.1. COMPARACION DE LA CEPA NATIVA DE *RHIZOPUS SP.* COMO VARIABLE DEPENDIENTE EN CADA UNO DE LOS BIORREACTORES.**

El crecimiento visual de la cepa nativa de *Rhizopus sp.* CMP1 demostró ser diferente en cada uno de los biorreactores, ya que se puede decir que en los biorreactores que trabajaron en medio sumergido como lo son el tipo *batch* y turbidostato generaron visualmente una mayor cantidad de biomasa fungal durante su periodo de crecimiento.

En el caso del crecimiento del hongo en el biorreactor tipo SSF, se pudo apreciar un crecimiento uniforme alrededor de la matriz solida del bagazo de yuca, este crecimiento es semejante visualmente al crecimiento ocurrido en el interior de los biorreactores tipo *batch* y turbidostato. En cambio, el crecimiento del hongo en el biorreactor tipo PFTR no demostró un crecimiento visual exuberante en comparación con los otros tres tipos, ya que como la cepa nativa de *Rhizopus sp.* se encontraba inmovilizada en el interior de *pellets* de alginato de calcio su crecimiento fue el menor, en comparación con los otros tres tipos de biorreactores.

##### **4.12.2. COMPARACIÓN DE LA CANTIDAD DE MEDIO DE PRODUCCIÓN COMO VARIABLE DEPENDIENTE EN CADA UNO DE LOS BIORREACTORES.**

Mediante el gráfico de barras de la **Gráfica N°29** se comparó la cantidad de medio de producción utilizado en cada uno de los biorreactores, debido a que los dos primeros biorreactores son de tipo sumergido se uso un volúmen de 2000 ml en cada uno, pero en comparación con el volúmen utilizado en el biorreactor tipo SSF, la cantidad fue minúscula, por el hecho de que la cepa nativa no necesita en gran parte

el medio de producción para crecer, ya que su mayor fuente de glucosa se encuentra en el almidón de la matriz solida, pero de igual manera el medio de producción suministra sales y glucosa como fuentes de crecimiento a la cepa. Adicionalmente se realizó la comparación del volúmen usado en el biorreactor tipo PFTR, y se demostró que tanto el volúmen usado en este tipo de biorreactor fue el mismo con el volúmen usado en el biorreactor tipo *batch* y turbidostato.

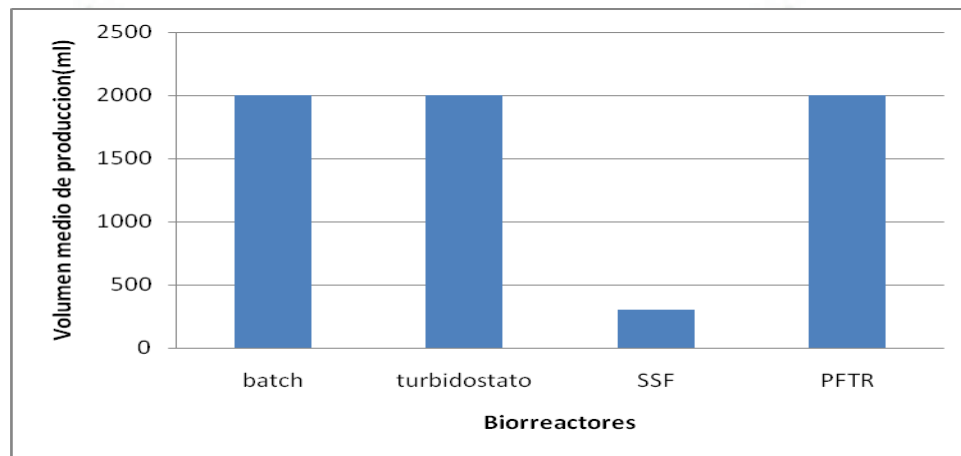


Figura N°32. Gráfica de columna del volúmen del medio de producción en cada uno de los biorreactores.

Este sistema de comparacion provee una herramienta para el fácil entendimiento de las variables dependientes en cada uno de los biorreactores.

#### **4.13 DETERMINACIÓN DEL BIORREACTOR CON MAYOR PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO.**

Se determinó mediante un gráfico de barras, utilizando los valores más altos de producción de ácido fumárico durante los tres ensayos.

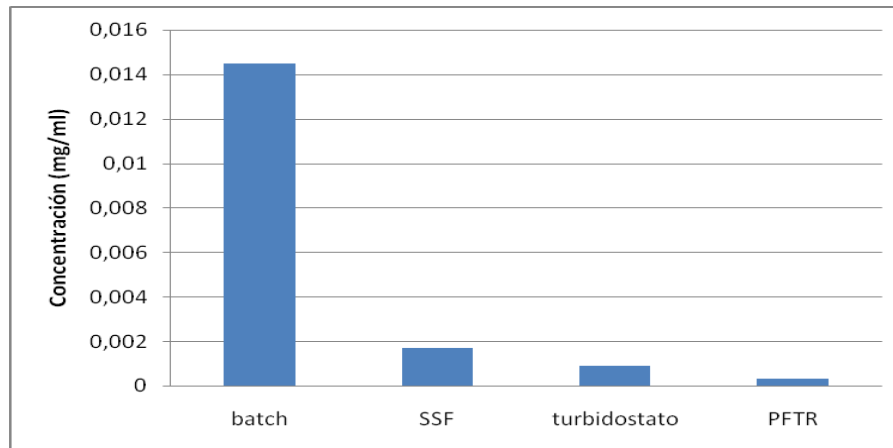


Figura N°33. Gráfica de columna de la máxima producción de ácido fumárico de los cuatro tipos de biorreactores.

Visualizando la gráfica de columnas, es obviamente que en el biorreactor de tipo *batch* produjo la mayor concentración de ácido fumárico con un valor de 0.0145 mg/ml, lo cual indica que el hongo produce mayor concentración de ácido en presencia de medio de producción líquido, el cual estimula al hongo a generar ácido fumárico. En comparación con los demás biorreactores, el segundo que produjo mayor concentración fue el SSF con una concentración máxima de 0.0017 mg/ml lo cual se puede deber a que todos los hongos prefieren crecer en sustratos sólidos, ya que tienen mayores facilidades para poder extender sus hifas en el interior de la matriz y poder consumir todos los nutrientes a partir de ella; debido a ello no necesitan de una atmósfera enriquecida, en este caso de medio de producción, para obtener los nutrientes, por lo tanto el medio no puede estimular la producción de ácido.

En el caso del biorreactor tipo turbidostato la producción máxima fue de 0.0009 mg/ml, una concentración muy baja en comparación con los resultados obtenidos del biorreactor tipo *batch*, lo cual indica que no basta con que el medio estimule la producción de ácido fumárico, sino que también el hongo no debe de ser sometido al estrés del cambio de medio constante por entradas y salidas. Lo cual indica que el hongo tiene un punto de saturación con la glucosa del medio, en comparación con el tipo *batch* la glucosa inicial no cambia hasta el momento en que el hongo haya consumido toda la

glucosa, pero en el caso del biorreactor tipo turbidostato la glucosa se renueva constantemente saturando así el metabolismo del hongo.

Por último en el biorreactor tipo PFTR es el que tuvo la más baja producción de ácido fumárico con un valor máximo de 0.0003 mg/ml; lo cual se debe a que el hongo al estar inmovilizado no puede extenderse y poder crecer en el interior de las perlas de alginato de calcio y al generarse hifas atrofiadas la producción de ácido fumárico decae demasiado.

En ensayos prácticos dados por la Universidad Politécnica de Madrid en el departamento de química industrial y polímeros, se realizaron experimentalmente la transformación de ácido maleico a ácido fumárico siendo este el principal medio de obtención química del ácido, en estos ensayos demostraron que de una cantidad de 10 ml de ácido maleico y que después de pasar por una serie de procesos químicos para obtener dicho ácido, solo se logró convertir el 17% de ácido maleico a ácido fumárico, pero aunque el 83% del ácido restante no se transformó; por medio de un proceso de recirculación, el 83% del ácido maleico se ira convirtiendo en ácido fumárico; pero debido a esto es que se genera una gran cantidad de efluentes contaminantes por parte de las industrias que realizan estos procesos.

Cabe resaltar que la concentración de ácido fumárico producida por cada uno de los biorreactores está expresada a partir de fumarato, ya que fue este compuesto el cual se utilizó en la técnica espectrofotométrica.

## V.-CONCLUSIONES.

**Primera.** Se aisló, seleccionó e identificó una cepa nativa de *Rhizopus sp.* a partir únicamente de muestras de pan contaminado.

**Segunda.** La determinación del parámetro de la cinética de crecimiento fungal de *Rhizopus sp.*, demostró que el valor de  $0.036 \text{ M}^{1/3}$  evidenció un óptimo desarrollo de la cepa; adicionalmente, se determinaron los parámetros de transferencia de masa del medio de producción, que tuvo como resultado los valores de 0.51 para  $K_{La}$ , de  $0.18 \text{ mgO}_2\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  para OTR y de  $0.076 \text{ mgO}_2\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  para OUR; lo cual, demostró una alta capacidad del medio de cultivo para permitir el adecuado transporte de los nutrientes y oxígeno en el interior del reactor, y por ende al interior de la célula.

**Tercera.** Se diseñaron las especificaciones de los reactores biológicos para la producción de ácido fumárico para el tipo *batch*, turbidostato y SSF; configurando así físicamente cada uno de ellos y utilizando el biorreactor tipo PFTR ya conformado.

**Cuarta.** La comparación de la capacidad de producción de ácido fumárico a partir de una cepa nativa de *Rhizopus sp.* utilizando reactores biológicos determinó, que el biorreactor tipo *batch* es el que generó una mayor producción con respecto a la concentración de ácido fumárico utilizando dicha cepa nativa obteniendo así  $0.0145 \text{ mg/ml}$  en comparación con los biorreactores tipo turbidostato, SSF y PFTR con los resultados de  $0.0009 \text{ mg/ml}$ ,  $0.0017 \text{ mg/ml}$  y  $0.0003 \text{ mg/ml}$  respectivamente.

## VI.- SUGERENCIAS.

Al finalizar este trabajo experimental y bajo las condiciones en que se desarrolló todos los métodos; se recomienda:

- Realizar una caracterización molecular para la identificación de la cepa de *Rhizopus sp.*, para poder identificar con mayor especificidad el género e incluso la especie a la que pertenece, eliminando la dependencia de las pruebas macroscópicas y microscópicas.
- Optimizar cada uno de los biorreactores, implementando sistemas de control para el ingreso de los medios de cultivos y salida de los mismos; así como, cambiar el tipo de material, en vez de vidrio y madera, poder utilizar acero inoxidable, lo cual permitirá dar mayor durabilidad e higiene al biorreactor.
- Determinar los parámetros de cinética de crecimiento y transferencia de masa de la cepa aislada de *Rhizopus sp* en los biorreactores de tipo turbidostato, SSF y PFTR.

**ANEXO 1.**

**COMPOSICIÓN DEL MEDIO PD.**

Uno de los medios más utilizados para el aislamiento de hongos. Es un medio económico y a la disponibilidad de quien quiera usarlo. A continuación se observará un cuadro con los compuestos y los pasos a seguir para su preparación.

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Papa sin pelar</b>	200 g
<b>Dextrosa</b>	20 g
<b>Cloranfenicol</b>	0.05 g
<b>Agua destilada</b>	1000 ml.

Tabla N° 22. Cuadro de los compuestos y sus respectivas cantidades.<sup>8</sup>

g. (Canelo V;*et al.* 2004)

Primero se pesan 200g de papa, se lavan, se pelan y se cortan en pequeños cubos para luego colocarlas en una olla con 1000 ml de agua destilada hirviendo. Luego se coloca la infusión de papa en un matraz de 1000 ml de capacidad y se agrega 20g de dextrosa y 18 g de agar, para después llevarlo a la autoclave para su esterilización. Una vez atemperada la solución se agrega el cloranfenicol.

Se pueden observar los reactivos utilizados del laboratorio H-302 junto con el medio finalizado. Si se desea hacer un medio sólido de PD, únicamente se agrega el agar (18g) a la solución, y se acidifica el medio a un valor cercano de 5.6 con ayuda del ácido tartárico al 10% o ácido cítrico.

## ANEXO 2.

## COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE PRODUCCIÓN.

El medio de producción utilizado en este trabajo de tesis, fue utilizado por primera vez en un trabajo de investigación realizado por Ningjun Cao, Jianxin Du, G. T. Tsao y C.S. Gong; titulado “*Simultaneous production and recovery of fumaric acid from immobilized Rhizopus oryzae with a rotary biofilm contactor and an adsorption column.*”; presentado en la Universidad de Indiana en 1996 y siendo una de las publicaciones del boletín de la Sociedad Americana de Microbiología.

El trabajo consistía principalmente en un sistema de fermentaciones a partir de glucosa usando la cepa de *Rhizopus oryzae* seguida por la recuperación del ácido fumárico por medio de una columna de adsorción; este sistema consistía en inmovilizar a la cepa en discos de plástico en un bioreactor rotatorio, estimular el crecimiento de la cepa con el medio de producción y finalmente obtener el ácido fumárico.

A continuación se presentara la composición del medio de producción.

Compuesto	Cantidad
Glucosa	100 g.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6 g
ZnSO <sub>4</sub>	0.088 g
Mg SO <sub>4</sub> - 7 H <sub>2</sub> O	0.25 g
Agua destilada	1000 ml.

Tabla N° 23. Cuadro de los compuestos y sus respectivas cantidades.<sup>9</sup>

9. (Tsao G;*et al.* 1996)

**ANEXO 3.**

**COMPOSICIÓN DEL MEDIO SABOURAUD.**

El medio Sabouraud es un medio de cultivo muy utilizado para aislar hongos de animales e insectos. Sirve de aislamiento y mantenimiento de hongos, debido a su composición; ya que los hongos crecen exuberantemente y esporulan bien.

A continuación se presentara la composición del medio Sabouraud.

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>
Glucosa	20 g
Peptona	10 g
Agar	18 g
Agua destilada	1000 ml.

Tabla N° 24. Cuadro de los compuestos y sus respectivas cantidades.<sup>10</sup>

<sup>10</sup>(Canelo V; *et al.* 2004)

#### ANEXO 4.

#### MATERIALES PARA EL ARMADO DE LOS BIORREACTORES



Figura N°34. Imagen del *Foundation* sobre el *Heatplate*.



Figura N°35. Varilla de vidrio de 0.5cm de diámetro interno, doblada por medio de calor en la parte superior.

**ANEXO 5.**

**MATERIALES PARA EL ARMADO DE LOS BIORREACTORES**



Figura N°36. Bomba de oxigenación.



Figura N° 37 . Difusor de micro burbujas.

**ANEXO 6.**

**MATERIALES PARA EL ARMADO DE LOS BIORREACTORES**



Figura N° 38 . Termostato regulable.

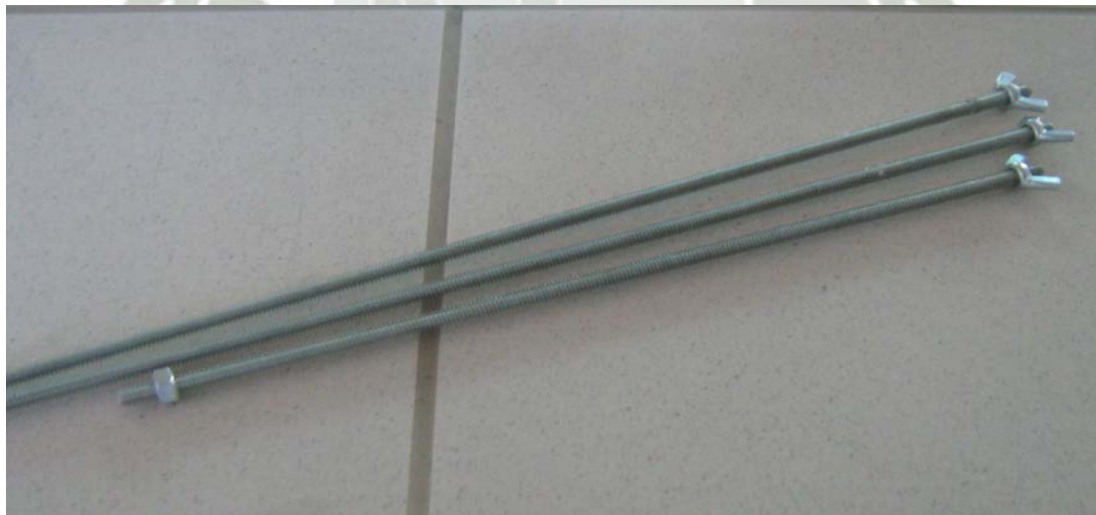


Figura N°39. Varillas de metal de  $\frac{1}{4}$  de pulg., junto con los pernos  $\frac{1}{4}$  de pulg. y las mariposas de  $\frac{1}{4}$  pulg.

## ANEXO 7.

### BIORREACTOR TIPO PFTR.



Figura N°40. .Imagen del biorreactor tipo (PFTR).

#### MEDIDAS DEL TUBO INTERNO:

**Alto:** 39 cm.

**Diámetro:** 1.5 cm.

**Volúmen:** 68.88cm<sup>3</sup>

#### MEDIDAS DEL TUBO EXTERNO REFRIGERANTE:

**Alto:** 30 cm.

**Diámetro:** 6 cm.

**MATERIAL:** Acero inoxidable.

## ANEXO 8.

### MEDIDOR DE OXÍGENO DISUELTO



Figura N°41. Imagen del medidor de oxígeno disuelto (Milwaukee).

#### ESPECIFICACIONES:

**Rango O<sub>2</sub>:** 0.0 a 19.9 mg/l +/- 1000 mV.

**Resolución O<sub>2</sub>:** 0.1 mg/l

**Precisión O<sub>2</sub>:** +/- 1.5% escala completa.

**Sonda:** MA840.

**Ambiente:** 0 a 50°C.

**Alimentación:** Pila 1x 9v.

**Vida pilas:** 70horas aprox.

**Dimensiones:** 145 x 80 x40 mm.

## ANEXO 9.

### BIORREACTOR TIPO *BATCH*



Figura N°42. Biorreactor tipo *batch*, en el primer ensayo, funcionando óptimamente.

ANEXO 10

**BIORREACTOR TIPO TURBIDOSTATO.**



Figura N°43. Biorreactor tipo turbidostato, en el primer ensayo, funcionando óptimamente.

ANEXO 11

BIORREACTOR TIPO PFTR



Figura N°44. Biorreactor tipo (PFTR), en el segundo ensayo, funcionando óptimamente.

**ANEXO 12.**

**BIORREACTOR TIPO SSF**



Figura N°45. Biorreactor con fermentación en estado sólido, en el primer ensayo, funcionando óptimamente.

### ANEXO 13.

#### LAVADOR DE GASES



Figura N°46. Lavador de gases usado en la obtención de ácido fumárico utilizando una cepa nativa de *Rhizopus sp.*

#### ESPECIFICACIONES:

**Capacidad:** 400ml.

**Material:** Vidrio.

**Dimensiones:** 30 x 30 x 25 cm.

**Peso bruto:** 1 kg

ANEXO 14

DATOS DE OTR

Tiempo (min)	OD (ppm)
0	2.9
2	3.2
4	3.5
6	3.9
8	4
10	4.2
12	4.4
14	4.5
16	4.6
18	4.6

Tabla N° 25. Valores de OTR junto con sus correspondientes horarios.

ANEXO 15

DATOS DE OUR

Tiempo(min)	OD(ppm)	Tiempo(min)	OD(ppm)
20	4.6	48	3.1
22	4.6	50	2.8
24	4.6	52	2.7
26	4.5	54	2.4
28	4.5	56	2.3
30	4.3	58	2.1
32	4.2	60	2
34	4.2	62	1.8
36	4.1	64	1.6
38	3.9	66	1.5
40	3.8	68	1.3
42	3.6	70	1.1
44	3.6	72	1
46	3.4	74	1

Tabla N°26. Valores de OUR junto con sus correspondientes horarios.

ANEXO 16

ABSORBANCIAS OBTENIDAS DEL BIORREACTOR TIPO *BATCH*.

Tiempo(h)	Absorbancia (nm)		
	1er ensayo	2do ensayo	3er ensayo
24	0.006	0.005	0.007
29	0.008	0.007	0.009
34	0.01	0.009	0.011
48	0.058	0.039	0.05
53	0.06	0.048	0.063
58	0.088	0.068	0.098
72	0.131	0.105	0.146
77	0.468	0.375	0.487
82	0.708	0.564	0.833
96	0.805	0.724	0.941
101	1.031	0.825	1.072
106	1.183	0.947	1.231

Tabla N° 27. Absorbancias obtenidas del primer, segundo y tercer ensayo correspondientemente de las muestras recolectadas del biorreactor tipo *batch*.

**ANEXO 17.**

**ABSORBANCIAS OBTENIDAS DEL BIORREACTOR TIPO TURBIDOSTATO.**

Tiempo(h)	Absorbancias (nm)		
	1er ensayo	2do ensayo	3er ensayo
24	0.000	0.005	0.004
29	0.000	0.005	0.006
34	0.000	0.008	0.009
48	0.007	0.013	0.015
53	0.01	0.019	0.021
58	0.013	0.026	0.029
72	0.015	0.03	0.032
77	0.019	0.036	0.041
82	0.021	0.047	0.053
96	0.026	0.051	0.058
101	0.029	0.053	0.061
106	0.032	0.064	0.075

Tabla N° 28. Absorbancias obtenidas del primer, segundo y tercer ensayo correspondientemente de las muestras recolectadas del biorreactor tipo turbidostato.

**ANEXO 18.**

**ABSORBANCIAS OBTENIDAS DEL BIORREACTOR TIPO SSF.**

Tiempo(h)	Absorbancia (nm)		
	1er ensayo	2do ensayo	3er ensayo
24	0.01	0.021	0.015
29	0.015	0.036	0.023
34	0.018	0.045	0.028
48	0.022	0.054	0.033
53	0.025	0.065	0.038
58	0.028	0.082	0.043
72	0.034	0.078	0.058
77	0.038	0.086	0.069
82	0.041	0.092	0.073
96	0.048	0.106	0.086
101	0.053	0.126	0.091
106	0.059	0.148	0.098

Tabla N°29. Absorbancias obtenidas del primer, segundo y tercer ensayo correspondientemente de las muestras recolectadas del biorreactor tipo SSF.

**ANEXO 19.**

**ABSORBANCIAS OBTENIDAS DEL BIORREACTOR TIPO PFTR.**

Tiempo(h)	Absorbancia (nm)		
	1er ensayo	2do ensayo	3er ensayo
24	0.008	0.01	0.008
29	0.008	0.011	0.009
34	0.009	0.011	0.009
48	0.009	0.012	0.0011
53	0.01	0.013	0.016
58	0.01	0.015	0.018
72	0.013	0.018	0.021
77	0.015	0.02	0.025
82	0.015	0.023	0.026
96	0.018	0.025	0.034
101	0.019	0.029	0.034
106	0.022	0.03	0.035

Tabla N° 30. Absorbancias obtenidas del primer, segundo y tercer ensayo correspondientemente de las muestras recolectadas del biorreactor tipo PFTR.

ANEXO 20

LONGITUD DE ONDA DE TRABAJO.

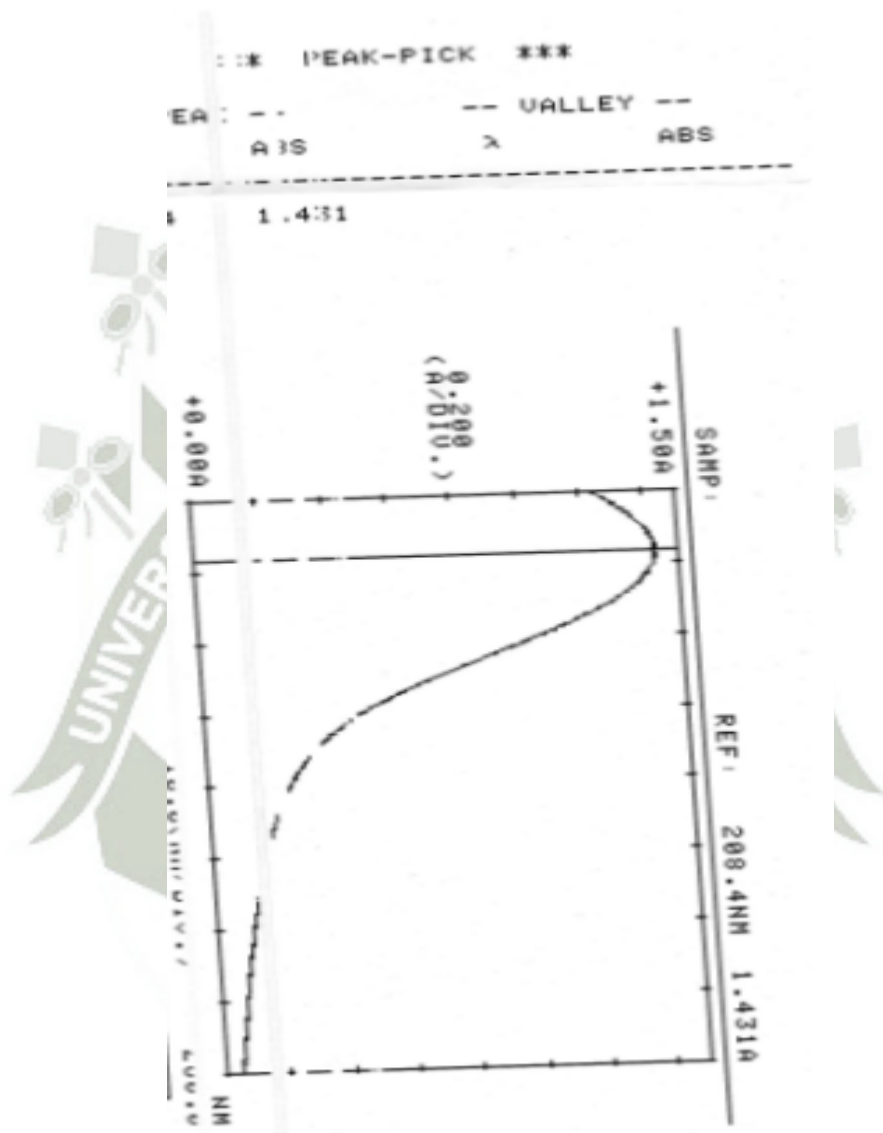


Figura N° 47. Longitud de onda de trabajo en la determinación de ácido fumárico.

## ANEXO 21.

**DESARROLLO DE LAS ECUACIONES UTILIZADAS PARA OBTENER EL  
PARÁMETRO DE CINÉTICA DE CRECIMIENTO FUNGAL.**

La **Ecuación 2**,  $M^{1/3} = (1/3) \lambda t + 0$  es una ecuación simplificada de la **Ecuación 1**  $M^{1/3} = M_0^{1/3} + (1/3) \lambda t$ , debido a que el  $M_0$  representa la masa inicial en el interior del biorreactor en el tiempo cero luego de su inoculación, este dato es irrelevante ya que el crecimiento fungal no puede ser medido con facilidad, se toma este dato como cero, para poder obtener así, la **Ecuación 2** en un modo simplificado.

Se toma un dato de la biomasa por ejemplo, el valor obtenido en el tiempo de 24 horas después de la inoculación que corresponde al dato de 2.4 g.; este valor es elevado a  $1/3$ , ya que representa la variable  $M$  (biomasa) en la ecuación, realizando esto se tiene como resultado  $1.34 M^{1/3}$ .

Realizando una gráfica lineal en el programa Microsoft Excel 2007 con todos los datos obtenidos de  $M^{1/3}$ , junto con sus respectivos datos de tiempo, se obtiene una ecuación lineal,  
 $y = 0.012 x + 1.109$  y utilizando la **Ecuación 2** se obtuvo una tercera ecuación  $1/3 \lambda = 0.012$ ; ya con esta última ecuación se logró, obtener el valor de la cinética de crecimiento del hongo  $\lambda = 0.036 M^{1/3}$ .

## ANEXO 22

**DESARROLLO DE LAS ECUACIONES UTILIZADAS PARA OBTENER LOS  
PARÁMETROS DE TRANSFERENCIA DE MASA.**

Para poder obtener el valor final de transferencia de masa ( $Kla$ ), se deben de seguir una serie de ecuaciones y junto con datos experimentales se podrá llegar a este valor.

Inicialmente se debe de obtener el valor de la concentración de oxígeno disuelto saturado ( $C^*L$ ), el cual experimentalmente es 4.6 ppm, luego se debe de realizar una ecuación lineal con los datos obtenidos en la fase de OUR; en la ecuación se obtuvo el dato de  $0.0761 \text{ mgO}_2\text{l}^{-1}.\text{h}^{-1}$  como el valor de OUR.

En la **Tabla N°11** se puede apreciar un grupo de ecuaciones con datos experimentales y calculados, siendo los datos de OD y tiempo los valores experimentales y los datos calculados, todos los demás; los datos presentados en la tabla correspondiente al tiempo y OD, son los datos del periodo de OTR, con estos se puede calcular utilizando la **Ecuación 3**  $\text{OTR} = \text{OUR} + \Delta\text{CL}/\Delta t$ . los valores de cada OTR en el transcurso del tiempo desde el minuto cero hasta los 16 minutos.

Finalmente para poder utilizar la **Ecuación 4**  $Kla = (\text{OTR} / (C^*L - CL))$ , se reemplazan los datos de OTR y se utiliza el dato de  $C^*L$ ; terminando con cada uno de los cálculos para cada uno de los tiempos se debe de obtener un promedio de todos los  $Kla$  resultante, para poder tener uno en representación del todo el sistema.

**ANEXO 23.**

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO EN  
TRES ENSAYOS UTILIZANDO EL BIORREACTOR TIPO *BATCH*.**

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO ANOVA.**

<b>ANOVA de un factor.</b>					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.000	2	.000	2.126	.201
Intra-grupos	.000	6	.000		
Total	.000	8			

Tabla N°31. Cuadro de la prueba ANOVA.

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO EN  
TRES ENSAYOS UTILIZANDO EL BIORREACTOR TIPO TURBIDOSTATO..**

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO ANOVA.**

<b>ANOVA de un factor.</b>					
	Suma de cuadrados	gl.	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.000	2	.000	5.444	.108
Intra-grupos	.000	6	.000		
Total	.000	8			

Tabla N°32. Cuadro de la prueba ANOVA.

**ANEXO 24**

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO EN  
TRES ENSAYOS UTILISANDO EL BIORREACTOR TIPO SSF.**

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO ANOVA.**

<b>ANOVA de un factor.</b>					
	Suma de cuadrados	gl.	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.000	2	.000	1.750	.401
Intra-grupos	.000	6	.000		
Total	.000	8			

Tabla N°33. Cuadro de la prueba ANOVA.

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO EN  
TRES ENSAYOS UTILISANDO EL BIORREACTOR TIPO PFTR.**

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO ANOVA.**

<b>ANOVA de un factor.</b>					
	Suma de cuadrados	gl.	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	.000	2	.000	.000	1.000
Intra-grupos	.000	6	.000		
Total	.000	8			

Tabla N°34. Cuadro de la prueba ANOVA.

## VII- .BIBLIOGRAFÍA.

### 7.1 TEXTOS, CAPÍTULOS DE TEXTOS, REVISIONES, ARTÍCULOS Y COMUNICACIONES PERSONALES.

- 1) Acevedo P., 2013, Espectrofotometría.
- 2) Alsabe S., Aramendía P.; Química 2 química en acción; pág. 322.
- 3) Arroyo G.; Biotecnología: ¿Una salida para la crisis agroalimentaria? pág. 9.
- 4) Avalos I.; Biotecnología e industria un ensayo de interpretación teórica. pág. 11
- 5) Aznar A., Cabanelas J; Ingeniería de Reacciones. Universidad Carlos II de Madrid. pág 78.
- 6) Barluengua J.; Manual de Química Orgánica. Editorial Reverte. 1987. pág. 358.
- 7) Boily J., Seward T.; Dissociation of fumárico acid: spectrophotometric investigation in aqueous solution from 10 to 90°C and theoretical considerations. Journals of solution chemistry. 2005. pág. 45-46.
- 8) Burns G., 2003 Técnicas espectrofotométricas.
- 9) Canelo V., Ames T., Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos; 2004; pág. 86-87.
- 10) Cao N., Du J., Tsao T., Simultaneous production and recovery of fumárico acid from an immobilized *Rhizopus oryzae* with a rotary biofilm contactor and an adsorption column.
- 11) Clark C.A., Moyer J.W.; Compendio de las enfermedades de la batata. *The american phytopathological Social, Centro internacional de la papa.* pág. 44-45
- 12) Cubero N., Monferrer A., Villalta J.; Aditivos alimentarios. Colección tecnología de los alimentos. 2002. pág. 104
- 13) Domsch H., Gams W., Anderson T.; Compendium of soil fungi. Volume 1. Academic Press. London. UK. 1980.
- 14) Duque J., Biotecnología. Panorámica de un sector. pág. 12.
- 15) Forbes B., Sham D., Diagnostico microbiológico, Edición 12, 2007, pág. 660-661.

- 16) Frazier C.W.; Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia España. 1978. pág. 173-176.
- 17) Gariabay G., Ramirez Q., Munguia L.; Biotecnología de los alimentos. Noriega Editores. 2004. pág. 58.
- 18) Garcia P., 1985, Micología, Edición 8.pag 104.
- 19) Gilchrist L., Fuentes Davila. G.; Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. pág. 14.
- 20) Gow N., Growing Fungus, 1995,pag 301.
- 21) Gu C., Zhou Y., Liu L., Tan T., Deng L.,2013, Production of fumaric acid by immobilized *Rhizopus arrhizus* on net.
- 22) Gutierrez E.; Química; Editorial Reverté; 1985, pág. 11.
- 23) Hacking A.J.; Economic Aspects of Biotechnology; Cambridge University; 1986
- 24) Heinzle E., Biwer A., Cooney C.; Development of sustainable bioprocesses, modeling and assessment. pág. 58.
- 25) Heller K.; Genetically engineered food, methods and detection. pág 78-80
- 26) Henry C., Hwa S.; Fed-Batch cultures, principles and applications of semi-batch bioreactors, pág 26-27.
- 27) Izquierdo J., Cunill F., Tejero J., Iborra M., Fite C.; Problemas resueltos de cinética de las reacciones químicas, metodología 17. pág. 68.
- 28) Kenealy W., Zaady E., Du Preez J., Stieglitz B., Goldberg I.; Biochemical Aspects of fumaric acid accumulation by *Rhizopus arrhizus* .
- 29) Klages F.; Tratado de química orgánica. Tomo I. Química Orgánica Sistemática. Editorial Reverte. 2005. pág. 102.
- 30) Kun Z.; Fumaric acid fermentation by *Rhizopus oryzae* with Integrated Separation Technologies.
- 31) Loayza P.; Cultivo de células animales y humanas. Vision Libros. pág. 103-104.
- 32) Mier T., Toriello C., Ulloa M.; Hongos microscópicos saprobios y parásitos: métodos de laboratorio. Universidad Autónoma Metropolitana. pág. 25-27.
- 33) Mitchell D., Krieger N., Berovic M.; Solid-State fermentation Bioreactor fundamentals of design and operation.

- 34) Montaldo A.; La yuca o mandioca. 1979. pág. 48-52.
- 35) Montoya H.; Microbiología básica para el área de la salud y afines. Segunda Edición. 2008. pág. 167.
- 36) Mordino P.; Preparación de medio de cultivo. Curso “Métodos en fitopatología “. 2009. pág. 75.
- 37) Moresi M., Parente E., Federici F.,1991, Optimization of fumaric acid production from potato flour by *Rhizopus arrhizus*, pag 35-39.
- 38) Pilco M.,1989, Identification of fungus from *eicchoria crassipes*.
- 39) Petrucoli M., Angiani E.,Federici F,1996, Semi-continuous fumárico acid production by *Rhizopus arrhizus* immobilized in polythanic sponge, pag 463-469.
- 40) Podgorska E., Kasprzak M., Szwajgier D.; Fumaric acid production by *Rhizopus nigricans* and *Rhizopus oryzae* using apple juice.
- 41) Reece C.; Biología, Editorial panamericana .pág.45.
- 42) Retrepo G.,Gomez J., Vasquez N.; Criopreservación de semen canino por congelación rápida con glicerol y dimetilformamida.
- 43) Shang. Y;Bioprocessing for Value-added products from a renewable resources.
- 44) Sharpe A.; Química Orgánica; Editorial Reverte;1993; pág. 518
- 45) Stainer R., Ingraham J., Wheelis M., Painter P.; Microbiología; Segunda Edición. pág. 123-130.
- 46) Strapasson R., Woiciechowski A., Yamanato C., Pandey A., Production of fumárico acid in solid state fermentation ssf *Rhizopus arrhizus* using cassava bagasse as the sole carbon source . Optimization with neural network.
- 47) Tsao T., Ningjun C., Jianxin D.; 1996,Simultaneous production and recovery of fumaric acid from immobilized *Rhizopus oryzae* with a rotary biofilm contactor and an adsorption column.
- 48) Vera G; Introducción a la microbiología. Editorial Universidad estatal a distancia. pág. 89-92.

## 7.2 WEB- SITES.

- 1) Generalidades de los hongos. Disponible en:  
[http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/file.php/410/Modulo\\_2/generalidades\\_de\\_hongos.pdf](http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/file.php/410/Modulo_2/generalidades_de_hongos.pdf)
- 2) *Rhizopus stolonifer*. Disponible en:  
<http://hongos-alergenicos.reviberoammicol.com/files/038.PDF>.
- 3) Taxonomía de *Rhizopus sp.*  
<http://www.uniprot.org/taxonomy/4846>
- 4) Pan bregado. Disponible en:  
<http://www.eufic.org/article/es/rid/pan-alimento-basico-de-nuestra-dieta/>
- 5) Formulación de agar papa. Disponible en:  
<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/gifuj/Medios%20procedimientos%20art%EDculos.PDF>
- 6) Micro cultivo de hongos. Disponible en:  
<http://www.biblioteca.upibi.ipn.mx/Archivos/Material%20Didactico/T%C3%A9cnicas%20microbiol%C3%B3gicas/T%C3%A9cnicas%20Microbiol%C3%B3gicas%20Parte%202.pdf>
- 7) Cultivo sumergido de *Rhizopus nigricans*. Disponible en:  
<http://148.206.53.231/UAMI12018.PDF>
- 8) Producción de ácido fumárico a partir de *Rhizopus arrhizus*. Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1057471/?page=1>
- 9) Bioacumulación de ácido fumárico en *Rhizopus arrhizus*. Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC203406/?page=1>
- 10) Optimización de la producción de ácido fumárico a partir de *Rhizopus arrhizus*.  
Disponible en:  
<http://link.springer.com/article/10.1007%2F978-3-319-16469-5?LI=true#page-1>

- 11) Aplicaciones del ácido fumárico. Disponible en:  
<http://www.aditivosalimentarios.com/index.php/codigo/297/Ácido-fumarico>
- 12) Características fisicoquímicas del ácido fumárico. Disponible en:  
<http://www.caslab.com/Fumaric-Acid.php5>
- 13) Técnicas de análisis de ácido fumárico. Disponible en:  
<http://www.shodex.com/english/dc030832.html>
- 14) Propiedades de la *Fumaria officinalis* L. Disponible en:  
<http://www.botanical-online.com/medicinalsfumariaofficinalis.htm>  
<http://www.bartek.ca/pdfs/Newsletter/LaSelecciondelosAcidulantes.pdf>  
<http://www.andercol.com.co/es/acidulantes/ácido-fumarico.html>  
[http://www.alimentariaonline.com/media/MA050\\_edu.pdf](http://www.alimentariaonline.com/media/MA050_edu.pdf)
- 15) Capacidad cosmopolita de *Rhizopus sp* .Disponible en:  
[http://manosanta.com.uy/contenidos/ceibal/\\_pdf/ciencias-naturales/reino-de-los-hongos/005-hongo-negro-del-pan.pdf](http://manosanta.com.uy/contenidos/ceibal/_pdf/ciencias-naturales/reino-de-los-hongos/005-hongo-negro-del-pan.pdf)
- 16) Tinciones de hongos. Disponible en:  
[http://www.google.com.pe/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=11&ved=0CCcQFjAAOAo&url=http%3A%2F%2Fclon.uab.es%2Frecursos%2Fdescargar.asp%3Fclau%3D%270000001162%27&ei=YNBUuKOHMX1kQfLh4DQAQ&usg=AFQjCNHv-CIYBd7gRd9SO\\_kdN-IY-1OI8Q](http://www.google.com.pe/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=11&ved=0CCcQFjAAOAo&url=http%3A%2F%2Fclon.uab.es%2Frecursos%2Fdescargar.asp%3Fclau%3D%270000001162%27&ei=YNBUuKOHMX1kQfLh4DQAQ&usg=AFQjCNHv-CIYBd7gRd9SO_kdN-IY-1OI8Q)
- 17) Empresa Refine Technology. Disponible en:  
<http://www.refinotech.com/applications-cell-banking-seed-expansion.php>
- 18) Diapositivas de cultivo de hongos. Disponible en:  
[http://www.sochinf.cl/documentos/micro2009/5\\_Diaz\\_MCristina.pdf](http://www.sochinf.cl/documentos/micro2009/5_Diaz_MCristina.pdf)