

ENSAYOS PARA LA PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO FUMÁRICO
EMPLEANDO RESIDUOS AGRÍCOLAS

SARA GIRALDO DURANGO

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERÍAS
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
MEDELLÍN
2013

ENSAYOS PARA LA PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE ÁCIDO FUMÁRICO
EMPLEANDO RESIDUOS AGRÍCOLAS

SARA GIRALDO DURANGO

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Químico

Director

OSCAR HERNÁN VASCO ECHEVERRI

Magister en Biotecnología

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA

ESCUELA DE INGENIERÍAS

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

MEDELLÍN

2013

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por su paciencia y apoyo incondicional a lo largo de mi formación como Ingeniera Química.

A todas las personas del grupo de investigación CIBIOT, por la ayuda y asesoría que me brindaron durante el desarrollo de la tesis y en especial a mi director por guiarme durante este proceso.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	9
1. MARCO TEÓRICO	12
1.1 ÁCIDO FUMÁRICO	12
1.2 FERMENTACIÓN FUMÁRICA	14
1.3 RESIDUOS AGRÍCOLAS EMPLEADOS EN LA FERMENTACIÓN	16
1.3.1 Mango criollo (<i>Mangifera indica</i> linn var. Criollo.)	16
1.3.2 Piña Manzana (<i>Ananas comosus</i>)	19
1.3.3 Totumo (<i>Crescentia cujete</i>)	21
1.4 <i>Rhizopus stolonifer</i>	23
2. METODOLOGÍA	25
2.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS	25
2.1.1 Humedad	25
2.1.2 Cenizas	26
2.1.3 Extractivos acuosos	26
2.1.4 Extractivos orgánicos	26
2.1.5 Azúcares	26
2.1.6 Metales pesados	27
2.1.7 Análisis elemental	27
2.2 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO	28
2.3 MANTENIMIENTO DEL MICRORGANISMO	29

2.4	PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	29
2.5	ENSAYOS PRELIMINARES DE FERMENTACIÓN FUMÁRICA	30
2.6	OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO	31
2.7	CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO	32
3.	ANÁLISIS Y RESULTADOS	33
3.1	CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS	33
3.2	MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN	36
3.3	ENSAYOS PRELIMINARES DE LA FERMENTACIÓN FUMÁRICA	43
3.4	OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO	48
3.5	CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO	52
4.	CONCLUSIONES	58
5.	RECOMENDACIONES	59
	BIBLIOGRAFÍA	60

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físico-químicas del ácido fumárico	13
Tabla 2. Composición química del mango criollo	18
Tabla 3. Composición química de la piña	20
Tabla 4. Composición del medio de cultivo	29
Tabla 5. Matriz de diseño del método de superficie de respuesta	31
Tabla 6. Composición química de los sustratos	34
Tabla 7. Condiciones iniciales de cuantificación de azúcares	36
Tabla 8. Condiciones iniciales de cuantificación de ácidos orgánicos	37
Tabla 9. Condiciones del método de cuantificación por HPLC	38
Tabla 10. Parámetros de evaluación de aptitud del sistema	39
Tabla 11. Parámetros de evaluación de linealidad	39
Tabla 12. Parámetros de evaluación de exactitud	40
Tabla 13. Resultados estandarización método de cuantificación por HPLC	43
Tabla 14. Resultados ensayos preliminares	44
Tabla 15. Resumen producción de ácido fumárico con <i>Rhizopus</i> sp.	45
Tabla 16. Selección de mejor especie <i>Rhizopus</i> productora de ácido fumárico	46
Tabla 17. Matriz de diseño y resultados de ácido fumárico producido	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del ácido fumárico	12
Figura 2. Consumo mundial de ácido fumárico	14
Figura 3. Mango	17
Figura 4. Piña Manzana	20
Figura 5. Totumo	22
Figura 6. <i>Rhizopus stolonifer</i>	23
Figura 7. Cromatograma azúcares – ácido fumárico	39
Figura 8. Curvas de calibración por HPLC	41
Figura 9. Ensayos preliminares fermentación fumárica	44
Figura 10. Superficie de respuesta	51
Figura 11. Curva de crecimiento de <i>Rhizopus stolonifer</i>	53
Figura 12. Producción de ácido fumárico	54
Figura 13. Producción de ácido fumárico y crecimiento de biomasa	55

RESUMEN

Los desarrollos en biotecnología han demostrado ser alternativas para el aprovechamiento de residuos en la producción de ácido fumárico, reemplazando procesos tradicionales que requieren el uso de sustancias derivadas del petróleo, contribuyendo a la preservación del medio ambiente. Se realizaron ensayos con el hongo *Rhizopus stolonifer* y se evaluaron tres residuos agrícolas como sustratos en la fermentación fumárica: mango criollo (*Mangifera indica* linn var. *Criollo*.), cáscaras de piña Manzana (*Ananas comosus*) y totumo (*Crescentia cujete*). Las cáscaras de piña fueron elegidas como fuente de carbono para realizar la optimización de la fermentación, ya que se produjo 5.93 mg/L de ácido fumárico contra 4.52 mg/L con mango y la no producción con totumo. Se realizó un diseño de experimentos de superficie respuesta para la optimización de la concentración de fuente de nitrógeno y fuente de carbono utilizando como variable respuesta la producción de ácido fumárico y se construyeron curvas de crecimiento de biomasa y producción de ácido fumárico para ajustar el tiempo de fermentación. La concentración de ácido fumárico obtenida con las variables optimizadas, 2.87 g/L de KNO₃ y 170.19 g/L de cáscaras de piña, después de 18 horas de fermentación fue 258.39 mg/L.

PALABRAS CLAVE: Ácido fumárico, Residuos agrícolas, *Rhizopus stolonifer*, Fermentación fumárica.

INTRODUCCIÓN

El ácido fumárico se produce principalmente por síntesis química basada en derivados del petróleo, con una producción anual de aproximadamente 90.000 toneladas (Roncal, Cadierno, & Torrecilla, 2010). El petróleo es un recurso natural no renovable que está dando señales de agotamiento a nivel mundial, en 2002 quedaban en el mundo aproximadamente 1 billón de barriles de crudo por extraer, lo que implica que al ritmo del consumo mundial las reservas de petróleo se agotarán hacia el año 2043 (Consumer, 2010).

El consumo mundial de ácido fumárico ha crecido durante los últimos años a una tasa promedio anual de 1.1%, siendo utilizado en un 33% como acidulante en alimentos y bebidas, seguido por un 20% para resinas en la industria del papel, 18.6% en resinas de poliéster insaturado y finalmente 12.3% para resinas alquídicas (IHS, 2010). El mercado de las resinas de poliéster insaturado y las alquídicas depende mundialmente del sector de la construcción y de la fabricación de automóviles. Se estima que el crecimiento global de la construcción superará al del Producto Interno Bruto (PIB) mundial en los próximos diez años, en el 2011 este sector representó el 11% del PIB mundial y se predice que será un 13.2% en el 2020 (PricewaterhouseCoopers, 2011).

La demanda actual y potencial del ácido fumárico junto con la escasez del petróleo, el aumento de los costos y la necesidad de disminuir la dependencia de productos derivados del petróleo, han despertado interés por el desarrollo de bio-productos que se produzcan a partir de recursos renovables. Mundialmente se realizan investigaciones sobre la utilización de recursos renovables alternativos

que sustituyan al petróleo. Una alternativa para la producción de ácido fumárico por vías biotecnológicas, es el aprovechamiento de productos agrícolas.

Los países tropicales, entre los que se encuentra Colombia, poseen disponibilidad de recursos naturales renovables que tienen una velocidad de reposición alta, tales como el agua, los bosques, los alimentos y la biodiversidad en general (Alviar Ramirez, 2012). Colombia ocupa el segundo lugar en biodiversidad en el mundo, factor que ofrece al país ventajas comparativas mundiales, presentando posibilidades para la satisfacción de necesidades de la sociedad (Alviar Ramirez, 2012). Las ventajas comparativas se deben transformar en ventajas competitivas a través del conocimiento científico y las aplicaciones tecnológicas que permitan generar valor agregado por medio de la biotecnología (Alviar Ramirez, 2012), para el desarrollo de procesos y productos verdes.

La fermentación fumárica fue estudiada poco antes de la época de los 50's (Foster & Davis, 1948), antes del auge de la industria petroquímica. En los últimos diez años se retoma el estudio de este proceso biotecnológico, principalmente por investigadores asiáticos, europeos, estadounidenses y brasileños (Vasco, 2007). El ácido fumárico es obtenido mediante la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos por medio de hongos filamentosos de la especie *Rhizopus sp.* En la producción de ácido fumárico se emplea como materia prima fuentes de carbohidratos como sacarosa, glucosa, fructosa, almidón y residuos agroindustriales, principalmente la melaza y la yuca (Carta, Soccol, Ramos, & Fontana, 1999; Rhodes, Moyer, Smith, & Kelley, 1959).

En el mundo se generan 1550 millones de toneladas anuales de residuos agrícolas (Dashtban, Schraft, & Qin, 2009) que a pesar de ser recursos alternativos, limpios y renovables, son considerados desechos ambientales. El uso de estos residuos ayuda a la reducción de la dependencia externa de recursos no renovables como el petróleo y contribuye al abastecimiento del mercado de algunos productos a partir de materia prima proveniente de fuentes locales.

En Colombia la agricultura es un sector clave que ha contribuido entre 10 y 14% al PIB nacional entre 1994 y 2007, generando el 21% del empleo del país y ocupa el 44.8% del total de área planimetrada nacional (PNUD, 2009). Debido a esto, el país es un generador de residuos agrícolas. Las estadísticas muestran que alrededor del 40% de los productos agrícolas en Colombia se pierden por inadecuados manejos durante el período poscosecha, y en consecuencia también se pierden los recursos naturales, físicos y humanos invertidos para llevar a cabo la producción de los mismos (UNAL, 2012).

Utilizar residuos agrícolas para el desarrollo de productos, representa una opción prometedora y potencializa el aprovechamiento de estos desechos. Imponiendo retos para lograr desarrollo y crecimiento (Alviar Ramirez, 2012), buscando relaciones armónicas entre el sistema económico y el medio ambiente, aprovechando la variedad y disponibilidad de los recursos, sin descuidar su sostenibilidad.

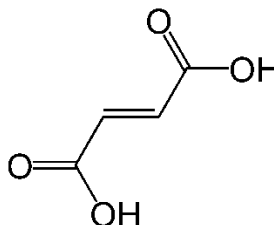
En el presente trabajo se optimizó la producción de ácido fumárico por vías biotecnológicas utilizando residuos agrícolas. Se realizaron fermentaciones con el hongo *Rhizopus stolonifer*, comparando tres residuos agrícolas como sustratos en la fermentación: mango criollo (*Mangifera indica linn var. Criollo.*), cáscaras de piña Manzana (*Ananas comosus*) y totumo (*Crescentia cujete*).

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ÁCIDO FUMÁRICO

El ácido fumárico es un compuesto orgánico dicarboxílico, su estructura se muestra en la Figura 1. Es también conocido como ácido 2-butenodioico, ácido trans-1,2-etilendicarboxílico, ácido alomaléico, ácido boléico, ácido liquénico o ácido tumárico. Fue aislado por primera vez de la planta *Fumaria officinalis*, de la que deriva su nombre (Roa Engel, Straathof, Zijlmans, Van Gulik, & Van der Wielen, 2008).

Figura 1. Estructura del ácido fumárico



Fuente: (ACADEMIC, 2010)

El ácido fumárico cristaliza en forma de prismas monoclinicos incoloros. Se funde a 287°C, y fundido hierve a 290°C. Es casi insoluble en agua fría, pero bastante soluble en agua caliente. Su solubilidad a 25 y 100°C es 0.7 y 9.8 g respectivamente en 100 ml de agua, y se disuelve fácilmente en alcohol. En la Tabla 1 se muestran las propiedades físico-químicas del ácido fumárico (Vasco, 2007).

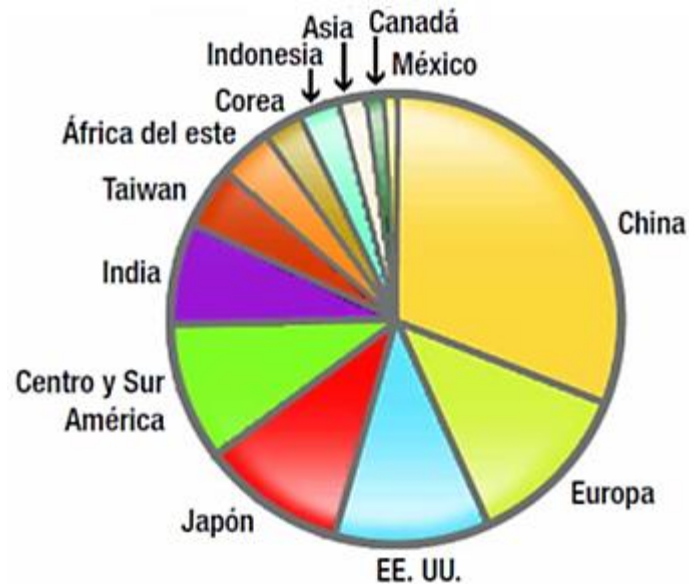
Tabla 1. Propiedades físico-químicas del ácido fumárico

CARACTERÍSTICAS	UNIDAD	VALOR
Color / Forma	-	Agujas, prismas monoclinicos o laminillas en agua; cristales incoloros; polvo blanco cristalino
Punto de fusión	°C	287
Punto de ebullición a 760 mmHg	°C	290
a 1.7 mmHg	°C	165 sublima
Peso molecular	g/mol	116.07
Solubilidad en agua	-	Ligeramente soluble en agua
En 100 mL de agua a 20°C	g	0.63
En 100 mL de agua a 25°C	g	0.70
En 100 mL de agua a 100°C	g	8.93
Solubilidad en solventes orgánicos	-	
En 100 mL de acetona a 20°C	g	1.29
En 100 mL de etanol a 25°C	g	4.20
Gravedad específica 25°C	g/mL	1.001
Densidad 20/4°C	g/cm ³	1.635

Fuente: (Vasco, 2007)

El ácido fumárico es producido usualmente por síntesis química y es utilizado principalmente como acidulante en la industria de alimentos debido a su carácter no tóxico y a sus propiedades no higroscópicas. Mundialmente es utilizado en un 33% como acidulante en alimentos y bebidas, seguido por un 20% para resinas en la industria del papel, 18.6% en resinas de poliéster insaturado y finalmente 12.3% para resinas alquídicas (IHS, 2010). En la Figura 2 se muestra el consumo mundial de ácido fumárico.

Figura 2. Consumo mundial de ácido fumárico



Fuente: (IHS, 2010)

1.2 FERMENTACIÓN FUMÁRICA

El inicio de la producción de ácido fumárico por vías biotecnológicas se da en 1911 tras el descubrimiento de la fermentación fumárica con *Rhizopus nigricans* por Felix Ehrlich (Roa Engel et al., 2008).

Posteriormente en 1938 Foster y Waksman estudiaron 41 cepas de 8 géneros diferentes para identificar la cepa con mayor productividad de ácido fumárico. Los géneros de producción de fumarato identificados fueron: *Rhizopus*, *Mucor*, *Cunninghamella* y *Circinella*. De estas cepas, las especies *Rhizopus* (*nigricans* o *stolonifer*, *arrhizus*, *oryzae* y *formosa*) fueron las que mejor dieron resultado, produciendo ácido fumárico bajo condiciones aerobias y anaerobias (Roa Engel et al., 2008).

El ácido fumárico es ante todo un intermediario del ciclo de Krebs y también está involucrado en otras rutas metabólicas. En 1949, Foster et al. propusieron un mecanismo para la producción aerobia de ácido fumárico con *Rhizopus nigricans* por condensación directa de dos ácidos orgánicos de dos carbonos (C_2). Los autores proponen que las reacciones en esta ruta se asemejan a las del ciclo del glioxilato (Roa Engel et al., 2008). Años después el mecanismo del ciclo del glioxilato fue descartado cuando se descubrió que la enzima clave de la ruta del glioxilato, isocitrato-glioxilato liasa, se reprime cuando está expuesta a concentraciones de glucosa altas, como las que se utilizan en los experimentos de producción de ácido fumárico (Roa Engel et al., 2008).

Luego en 1969, Overman y Romano descubrieron otro mecanismo para la producción de ácido fumárico que suponía la condensación de un ácido de tres carbonos (C_3) más uno de un carbono (C_1), e implicaba la fijación catalizada de CO_2 con piruvato carboxilasa bajo condiciones aerobias, explicando los altos rendimientos molares en la producción de fumarato (Roa Engel et al., 2008). La fijación de CO_2 conduce a la formación de ácido oxálico (Osmani & Scrutton, 1985) de modo que los ácidos orgánicos de cuatro carbonos (C_4), intermediarios del ciclo de Krebs, pueden ser retirados por biosíntesis durante la fase de crecimiento del microorganismo bajo condiciones aerobias. Cuando el nitrógeno es limitado y el microorganismo termina la fase de crecimiento, el metabolismo de la glucosa y la fijación de CO_2 pueden continuar y llevar a la acumulación de ácidos C_4 (Romano, Bright, & Scott, 1967). Sin embargo, si la carboxilación piruvato reductora fuera la única ruta para la producción, no se produciría ningún ATP para fines de mantenimiento y transporte, por lo tanto, el ciclo de Krebs también se encuentra activo durante la producción de ácido fumárico (Kenealy et al., 1986). Estudios de marcación de carbono demuestran que en la producción de ácido fumárico se utilizan simultáneamente las dos rutas, el ciclo de Krebs y la carboxilación piruvato reductora bajo condiciones aerobias (Roa Engel et al., 2008).

Como fuente de carbono para la fermentación fumárica se requiere sustratos ricos en carbohidratos. Comúnmente la glucosa ha sido empleada como sustrato, pero no ha sido la única fuente de carbono utilizada en la fermentación. Se ha estudiado el uso de diferentes materias primas como xilosa, sacarosa, almidón y residuos agroindustriales como melaza, bagazo de yuca y estiércol lechero, con el fin de evaluar la viabilidad de ser utilizados para la producción de ácido fumárico (Bulut, Elibol, & Ozer, 2004; Carta et al., 1999; Kautola & Linko, 1989; Liao, Liu, Frear, & Chen, 2008; Moresi, Parente, Petruccioli, & Federici, 1991; Vasco, 2007; Xu, Li, Fu, Tai, & Huang, 2010; Zhang, Jin, & Kelly, 2007).

La producción de ácido fumárico por fermentación se debe realizar a una temperatura y pH óptimos, según el tipo de microorganismo, una concentración adecuada del sustrato y sales nutrientes a base de nitrógeno y metales esenciales (Vasco, 2007).

1.3 RESIDUOS AGRÍCOLAS EMPLEADOS EN LA FERMENTACIÓN

1.3.1 Mango criollo (*Mangifera indica* linn var. Criollo.)

El mango es un fruto tropical que se clasifica quinto entre los frutos más cultivados a nivel mundial (Ajila, Bhat, & Prasada Rao, 2007). Se cultiva desde hace más de 4000 años y la primera plantación comercial se remonta a 1556 en la India (Gálvez-López, Adriano-Anaya, Mayek-Pérez, Villarreal-Treviño, & Salvador-Figueroa, 2007).

Como el mango es una fruta de temporada, el 20% de los frutos se procesan para obtener productos tales como puré, néctar, encurtidos, enlatados y rodajas. Durante el procesamiento del mango se generan subproductos como la cáscara y el núcleo, los cuales constituyen del 15 al 20% de la fruta. Como la cáscara no es

utilizada comúnmente para fines comerciales, se descarta como residuo y se convierte en una fuente de contaminación. Estos residuos deben ser tratados como residuos especializados debido a los altos niveles residuales de compuestos fenólicos, que pueden tener efectos adversos en el medio ambiente (Ajila et al., 2007).

El mango es uno de los miembros más importantes de la familia Anacardiaceae. El género *Mangifera* comprende alrededor de 69 especies nativas del sureste de Asia y las islas circundantes. De las especies de *Mangifera* nativas de Asia sólo cuatro producen frutos comestibles. La ubicación taxonómica lo ubica bajo la siguiente clasificación: CLASE: Dicotyledoneae; SUBCLASE: Rosidae; ORDEN: Sapindales; FAMILIA: Anacardiaceae; GENERO: *Mangifera*; ESPECIE: *indica* (Gálvez, 2006).

El fruto se trata de una pulpa carnosa que puede contener uno o más embriones. Su peso varía desde 150g a 2kg. Su forma también es variable, pero generalmente es ovoide-elongada, notoriamente aplanada de 4 a 25 cm de largo y 1.5 a 10 cm de grosor, como se muestra en la Figura 3. El color puede estar entre verde, amarillo y diferentes tonalidades rojas. El fruto es una importante fuente de vitamina A y algo menor de B y C (INFOJARDIN, 2012). La composición química del mango criollo (*Mangifera indica linn var. Criollo.*) se muestra en la Tabla 2.

Figura 3. Mango



Fuente: (PPC Geeks, 2011)

Tabla 2. Composición química del mango criollo

COMPOSICIÓN	VALOR
% Humedad	82.0
% Sólidos totales	18.0
% Sólidos solubles	16.8
% Carbohidratos	11.8
% Fibra	4.6
% Cenizas	0.19
Vitamina A (UI)	3894
Vitamina C (mg/100g)	14.65

Fuente: (Universidad de Antioquia, 2012a)

En el 2012, en Colombia habían sembradas 23,624 hectáreas de mango, con una producción de 311,920 toneladas/año, y se estima que durante ese año el consumo de mango en el país fue de 250,452 toneladas (J. Alvarado, 2012), lo que implica que durante el 2012 en Colombia se dejó de consumir 61,468 toneladas de mango.

En el país se produce mango principalmente en dos épocas del año, de Marzo a Junio y de Octubre a Enero, lo que favorece la alta producción (J. Alvarado, 2012). El costo de la producción de mango criollo en el país, para el año 2012, se encontraba entre 4,681,662 y 7,441,210 pesos/hectárea, dependiendo del tamaño del mango (J. Alvarado, 2012).

En el país, el departamento de Antioquia ocupa el tercer lugar en la producción de mango, con un 10% de la producción total, después de Cundinamarca y Tolima (J. Alvarado, 2012), por lo tanto en Antioquia se producen 31,192 toneladas/año. Estas estadísticas muestran la situación de la producción de mango en Colombia, y establece un estimado de los residuos que se generan en el país, abriendo una posibilidad al aprovechamiento de estos.

1.3.2 Piña Manzana (*Ananas comosus*)

La piña es una hierba perenne originaria de Brasil. Es la única planta de alimento común de la familia Bromeliaceae. Se cultiva comercialmente en trópicos y subtrópicos, siendo Hawaii el lugar donde se produce la tercera parte de la cosecha mundial (University of Connecticut, 2012). Es una fruta múltiple formada por la fusión parcial de numerosos segmentos carnosos de varias flores separadas, en los que los sépalos endurecidos de una corteza continúan sobre el exterior. La fruta es normalmente sin semillas debido a la incompatibilidad con ella misma (University of Connecticut, 2012).

La mayor parte de la cosecha de piña se conserva. El jugo es una fuente de alcohol desnaturalizado, las hojas son una fuente de fibra. La fruta madura contiene alrededor de 15% de azúcares, además de ácidos, vitaminas y minerales (University of Connecticut, 2012).

La ubicación taxonómica lo ubica bajo la siguiente clasificación: CLASE: Liliopsida; SUBCLASE: Commelinids; ORDEN: Poales; FAMILIA: Bromeliaceae; GENERO: *Ananas*; ESPECIE: *comosus* (University of Connecticut, 2012).

Una de las variedades reconocidas de la piña en Colombia es la piña Manzana, la cual es una mutación de la variedad Perolera, seleccionada y multiplicada de cultivos de Risaralda. Sus hojas no presentan espinas en los bordes, el fruto, como se muestra en la Figura 4, es de color rojo intenso cuando madura, de ahí su nombre. Tiene ojos menos profundos que la Perolera; presenta un número alto de bulbitos en la corona lo cual dificulta su manejo y mercadeo. Los colinos tanto de la corona como basales, axiales e hijuelos, presentan coloración cobriza, lo que permite diferenciarlos fácilmente de la Perolera (Universidad de Antioquia, 2012a). En la Tabla 3 se muestran la composición química de la piña (*Ananas comosus*).

Figura 4. Piña Manzana

Fuente: (A. Alvarado, 2011)

Tabla 3. Composición química de la piña

COMPOSICIÓN	VALOR
% Agua	85.1
% Proteínas	0.1
% Grasas	13.5
% Cenizas	0.1
Calcio (mg/100g)	21.0
Fósforo (mg/100g)	10.0
Hierro (mg/100g)	0.4
Tiamina (mg/100g)	0.9
Riboflavina (mg/100g)	0.03
Niacina (mg/100g)	0.2
Vitamina C (mg/100g)	12.0
Calorías (mg/100g)	51.0

Fuente: (Universidad de Antioquia, 2012a)

En Colombia, la piña se produce en 23 departamentos, con un área sembrada en el 2010 de 11,303 hectáreas, y una producción de 568,377 toneladas/año, con un rendimiento de 50,285 kilogramos por hectárea (COSMOAGRO, 2012). En el país el cultivo de piña se distribuye principalmente en los departamentos de Santander, Valle, Risaralda y Cauca, siendo la Perolera, Manzana y Cayena Lisa las variedades más cultivadas (COSMOAGRO, 2012).

En Antioquia, en el 2012, había 152.5 hectáreas de piña sembradas en diferentes municipios, siendo Mutatá el que más hectáreas plantadas tenía, y donde se produce el mayor rendimiento promedio de la fruta, 33,900 kg/hectárea (Centro de Investigación en Biotecnología (CIBIOT), 2012).

La piña Manzana tiene un porcentaje de pulpa de 67.3, de corteza 29.55 y de jugo 52.78 y presenta potencial para ser utilizado agroindustrialmente en la elaboración de pulpas, néctares y productos deshidratados (COSMOAGRO, 2012), por lo que las cáscaras de la piña son un residuo importante, aunque no se tienen datos estimados de la cantidad de estos en el país.

1.3.3 Totumo (*Crescentia cujete*)

Es un fruto originario de América tropical perteneciente a la familia Bignoniaceae, género *Crescentia*, especie *cujete*. El árbol puede alcanzar 6 m de altura, normalmente ramifica a muy poca altura. La corteza es ligeramente fisurada y corchosa. Su copa es amplia y abierta. Hojas simples, alternas, espiraladas y fasciculadas, generalmente dispuestas en grupos de 3 a 5, cuneado-oblancoeladas o espatuladas. Las flores nacen sobre el tronco y las ramas, son de forma campanulada y de color blanquecino, con veteados oscuros, rojos y púrpuras. Los frutos son bayas globosa, leñosas, pesadas que pueden alcanzar cerca de 30 cm de diámetro (Universidad de Antioquia, 2012b), como se muestra en la Figura 5.

Figura 5. Totumo



En Colombia, el totumo está presente alrededor del país en 19 departamentos, en altitudes entre 0 y 2,000 m sobre el nivel del mar. El árbol crece en suelos arcillosos a una temperatura media anual de 26°C (United Nations, 2005).

La pulpa de los frutos cocida tiene propiedades medicinales, cruda es tóxica. Sus ingredientes activos aún no han sido definidos y sus aplicaciones son principalmente en fitofármacos. El extracto de la fruta es efectivo en el tratamiento de la fiebre. La planta se utiliza con mayor frecuencia para el tratamiento de enfermedades del tracto respiratorio tales como: bronquitis, tos ferina y asma (United Nations, 2005).

El totumo es frecuentemente cultivado como ornamental. En Colombia, el fruto maduro, una vez seco y limpio en el interior, se utilizan como recipientes para contener agua; además es valorado en la fabricación de artesanías e instrumentos musicales (United Nations, 2005). Comúnmente los troncos son empleados para sembrar orquídeas (Universidad de Antioquia, 2012b).

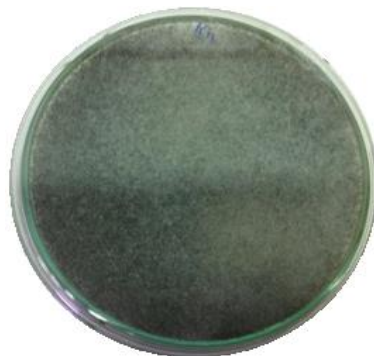
En Colombia, el totumo es un componente fundamental de los sistemas silvopastoriles más tradicionales de la región Caribe, donde además de proporcionar sombra ayuda a complementar la alimentación del ganado, los caballos y otras especies domésticas con sus frutos maduros, de gran valor nutricional.

1.4 *Rhizopus stolonifer*

Es un hongo filamentoso que presenta esporangióforos sin ramificar (de hasta 2 mm x 20 μ m), de color pardo oscuro que nacen de un nudo de rizoides bien desarrollados. Posee esporangios esféricos negros (de hasta 275 μ m de diámetro) con columela y esporangiosporas negras de 8 a 15 μ m. Abundantes rizoides y zigosporas esféricas de pared gruesa, desnuda (de hasta 200 μ m de diámetro). Clamidosporas ausentes (Pontón, Moragues, Gené, Guarro, & Quindós, 2002).

Colonias de crecimiento rápido (cubren prácticamente toda la superficie de la placa en tres días a 25°C) de aspecto consistente, con denso micelio aéreo, algodonosas, al principio blancas, después gris oscuras, como se muestra en la Figura 6. Se reconoce fácilmente por sus espolones hialinos o parduzcos, sus rizoides numerosos y pardos y sus esporangios negros y lustrosos (brillantes) (Pontón et al., 2002).

Figura 6. *Rhizopus stolonifer*



La posición taxonómica lo ubica bajo la siguiente clasificación: *Phylum*: Zygomycota; *ORDEN*: Mucorales; *FAMILIA*: Mucoraceae; *GENERO*: *Rhizopus*; *ESPECIE*: *stolonifer* (Pontón et al., 2002).

Es uno de los mucorales más frecuentes y tiene una distribución amplia en todo el planeta. Su temperatura de crecimiento va desde los 10 hasta los 33°C, con una temperatura óptima de 25°C. Se encuentra con frecuencia en suelos con arena, en el compost, en el polvo de las casas, en la pulpa de la madera, estiércol, panales de abejas, nidos y plumas de aves y en diferentes frutos y semillas (Pontón et al., 2002). El *Rhizopus stolonifer*, es apto para la fabricación de ácido fumárico y en la elaboración de cortisona (Vasco, 2007).

Luego del descubrimiento de la producción de ácido fumárico con *Rhizopus nigricans* en 1911, este hongo fue categorizado en 1938 por Foster y Waksman, como una de las especies que mejor producía ácido fumárico bajo condiciones aerobias y anaerobias (Roa et al, 2008). Ha sido empleado por varios autores en la fermentación fumárica (Foster & Davis, 1948; Foster et al., 1949; Overman & Romano, 1969; Romano et al., 1967; Vasco, 2007), reconociéndose como un hongo fácil de adquirir y maniobrar, lo que le da ventajas sobre otro tipo de microorganismos (Vasco, 2007).

2. METODOLOGÍA

2.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS

Se evaluó, como fuente de carbono para la fermentación, residuos de mango criollo (*Mangifera indica linn var. Criollo.*), cáscaras de piña Manzana (*Ananas comosus*) y totumo (*Crescentia cujete*). Cada uno de los sustratos fue almacenado a -20°C en un refrigerador (LG electronics, GR 39W62CPC).

Para la caracterización del mango se utilizó la cáscara y la fruta, de la piña sólo las cáscaras y del totumo la fruta con semillas. La caracterización se realizó determinando humedad, cenizas, extractivos acuosos, extractivos orgánicos, azúcares (sacarosa, glucosa, fructosa), metales pesados (Fe, Mn, Ca, Mg, Cu) y análisis elemental (C, H, N, S) a cada uno de los residuos, realizando las pruebas por duplicado.

2.1.1 Humedad

En un crisol de porcelana se pesó aproximadamente 5 g de muestra húmeda. Se introdujo en un horno de convección forzada (WTB binder, IP 20) a 105°C durante 4 horas. Pasado este tiempo se retiró la muestra del horno, se llevó a un desecador por 30 minutos y se pesó de nuevo. Esta operación se repitió hasta obtener un peso constante (Centro de Investigación en Biotecnología (CIBIOT), 2011).

2.1.2 Cenizas

Se pesó aproximadamente 3 g de muestra de humedad conocida en un crisol previamente calcinado y pesado. Se introdujo en una mufla (Labtech, LEF-103S) y se incineró a 600°C durante 3 horas. Pasado este tiempo se llevó el crisol al desecador durante 30 minutos y luego se pesó (Centro de Investigación en Biotecnología (CIBIOT), 2011).

2.1.3 Extractivos acuosos

Se tomó alrededor de 1.5 g de muestra seca y se trituró, luego se empacó en papel de filtro y se llevó a secar en un recipiente de vidrio, se registró el peso del conjunto recipiente, filtro y muestra. Luego se sometió a extracción con agua destilada en un equipo de extracción Randall (Velp, SER 148). Se realizó el secado a 80°C por 15 horas aproximadamente, se llevó al desecador y finalmente se pesó de nuevo el conjunto recipiente, filtro y muestra. El agua obtenida al final de la extracción se almacenó a 4°C para posteriores análisis (Centro de Investigación en Biotecnología (CIBIOT), 2011).

2.1.4 Extractivos orgánicos

Se tomó la muestra libre de extractivos acuosos y se sometió a extracción con una mezcla de etanol: tolueno (1: 2) en un equipo de extracción Randall (Velp, SER 148). Se secó la muestra a 80°C para retirar los solventes, luego se llevó al desecador y finalmente se pesó (Centro de Investigación en Biotecnología (CIBIOT), 2011).

2.1.5 Azúcares

Los extractos acuosos que contienen los azúcares solubles de la muestra se utilizaron para la cuantificación por cromatografía líquida.

El análisis se realizó en un cromatógrafo líquido (Shimadzu, Prominence) con una solución de H_2SO_4 0.01 N en agua desionizada como fase móvil en una columna Ion Exclusion 7.8 x 300 mm. De los extractos acuosos se filtró 1 mL utilizando un filtro de jeringa de 0.45 μm , se introdujo en un vial y se inyectó 10 μL . El flujo fue de 0.8 mL/min y la temperatura de la columna 30°C. Los azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) fueron detectados en un detector de índice de refracción (RID. 10A) (Centro de Investigación en Biotecnología (CIBIOT), 2011).

2.1.6 Metales pesados

Se pesó aproximadamente 1 g de muestra y se secó durante 5 horas a 105°C. La muestra seca se sometió a digestión ácida, adicionando 10 mL de HNO_3 concentrado y 4 mL de HClO_4 concentrado. Esta solución se llevó a una campana de extracción (Esco, Frontier Junior) y se sometió a calentamiento hasta que la materia orgánica se disolvió, cuando se liberaron vapores incoloros. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se filtró y finalmente se llevó a dilución con agua destilada en un matraz de 50 mL. La cuantificación de metales se realizó en un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer, AAnalyst 400) (Centro de Investigación en Biotecnología (CIBIOT), 2011).

2.1.7 Análisis elemental

Se pesó aproximadamente 1 g de muestra y se trituró en un mortero de porcelana limpio y seco. La muestra triturada se secó y se llevó a una cápsula de estaño, la cual se sella y se lleva al equipo para el análisis. El análisis se realizó en un analizador elemental (Perkin Elmer, CHNS/O 2400) (Centro de Investigación en Biotecnología (CIBIOT), 2011).

2.2 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO

La cuantificación de ácido fumárico se realizó por cromatografía líquida utilizando un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) (Shimadzu, Prominence). El método se estandarizó con el fin de asegurar una cuantificación adecuada.

El HPLC estaba equipado con degasificador DGU-20A₅, bomba LC-20AD, inyector automático SIL-20AHT, Horno/Portacolumnas CTO-20A, detector PDA UV/VIS SPD-M20A, sistema controlador CBM-20A y detector de índice de refracción RID-10A. Los parámetros cromatográficos se calcularon utilizando el software LCsolution.

Para los análisis se inyectaron diez microlitros de muestra en una columna Ion Exclusion 7.8 x 300 mm, utilizando el inyector automático del equipo. La fase móvil consistió en una solución 0.01 N de H₂SO₄ en agua desionizada. Se trabajó con un flujo de 0.8 mL/min y una temperatura de la columna de 30°C. El ácido fumárico y los azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) se detectaron por índice de refracción. El área de los picos se utilizó para la evaluación de la señal.

Las muestras y los estándares se filtraron utilizando un filtro de jeringa de 0.45 µm.

Los ensayos desarrollados en el HPLC se estandarizaron en términos de linealidad, exactitud y aptitud del sistema. Se realizaron pruebas utilizando estándares de sacarosa, glucosa, fructosa y ácido fumárico con el método de cuantificación expuesto anteriormente.

Se realizó un análisis estadístico de los datos con el fin de determinar si el método desarrollado era apropiado para el análisis de las muestras de la fermentación.

2.3 MANTENIMIENTO DEL MICRORGANISMO

Se preparó el medio de cultivo Agar Sabouraud, según las especificaciones técnicas de la casa comercial. Se tomó una caja de petri con *Rhizopus stolonifer* y se realizó el repique del hongo en otra caja de petri con Agar Sabouraud previamente esterilizado. Este procedimiento se realizó en cámara de flujo laminar utilizando mecheros alrededor de las cajas de petri con el fin de garantizar condiciones asépticas. El hongo se dejó a temperatura ambiente durante 8 días en una cámara de crecimiento, para ser utilizado posteriormente en el inóculo de la fermentación.

2.4 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Se preparó el medio de cultivo como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición del medio de cultivo

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Fuente de carbono	65 (g/L)
KNO ₃	0.37 (g/L)
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.04 (g/L)
KH ₂ PO ₄	0.15 (g/L)
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25 (g/L)
Biotina	10 (µg/L)
Metanol	15 (mL/L)

Fuente: (Carta et al., 1999).

Al medio se le ajustó el pH a 6 con NaOH 1M, se aforó con agua destilada y se esterilizó utilizando un autoclave (SANYO, MLS-3781L) durante 20 minutos a 120°C y 15 psig.

2.5 ENSAYOS PRELIMINARES DE FERMENTACIÓN FUMÁRICA

Los ensayos de la fermentación se realizaron utilizando los diferentes sustratos, mango criollo, cáscaras de piña y totumo, cambiando la fuente de carbono de la fermentación.

Las fermentaciones se realizaron en erlenmeyer de 250 mL utilizando el medio descrito en la Tabla 1. Los recipientes se taparon con algodón y gasa para permitir la salida de los gases de fermentación y se llevaron a esterilizar durante 20 minutos a 120°C y 15 psig.

Se preparó el inóculo tomando una caja de petri con *Rhizopus stolonifer* y adicionando agua destilada estéril para realizar un raspado de esporas. Estas esporas se llevaron a un beaker previamente esterilizado y se realizó una solución de esporas que posteriormente se adicionó al medio de cultivo. Se adicionó 10% del volumen de reacción de inóculo a cada uno de los erlenmeyer y se llevaron a agitar en un shaker orbital (Heindolph, Unimax 1010DT) a 130 rpm.

Después de tres días se filtraron las muestras de la fermentación y se desechó la biomasa. El caldo se utilizó para la cuantificación de azúcares y ácido fumárico por HPLC como se describe en la sección 2.2.

2.6 OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO

Se realizó el diseño de experimentos por superficie de respuesta para determinar el valor óptimo de variables de la fermentación fumárica, concentración de la fuente de carbono y nitrógeno. Se utilizó la metodología de superficie de respuesta 2^2 con estrella, rotable y ortogonal, empleando como variable respuesta la concentración de ácido fumárico. La matriz de diseño se creó con el software STATGRAPHICS Centurion y se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Matriz de diseño del método de superficie de respuesta

ENSAYO	KNO ₃ (g/L)	FUENTE DE CARBONO (g/L)
1	1.6	220
2	2.5	340
3	1.6	220
4	1.6	50.2944
5	1.6	220
6	0.7	340
7	1.6	220
8	2.5	100
9	1.6	220
10	1.6	220
11	1.6	389.706
12	2.87279	220
13	0.327208	220
14	1.6	220
15	0.7	100
16	1.6	220

Los medios de cultivo se prepararon como se describe en la sección 2.4, modificando las concentraciones de las variables que se querían optimizar. El inóculo se preparó realizando un raspado de esporas, con agua previamente esterilizada, al hongo *Rhizopus stolonifer* que se encontraba sembrado en una caja de petri.

Las fermentaciones se agitaron a 130 rpm durante tres días. Pasado este tiempo se filtraron las muestras y el caldo de la fermentación se utilizó para la cuantificación de ácido fumárico por HPLC como se describe en la sección 2.2.

2.7 CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO

Se preparó 300 mL de medio de cultivo según la Tabla 1, llevándolos a un pH de 6 con NaOH 1M. Se tomaron 7 recipientes de vidrio de 100 mL, se les adicionó 30 mL de medio a cada uno, se marcaron del 1 al 7 donde cada uno corresponde a 6 horas de muestreo y finalmente se cerraron utilizando un tapón de algodón, el cual permite la salida de los gases producidos en la fermentación. Posteriormente se llevaron a esterilizar.

Se preparó 30 mL de inóculo como se explica en la sección 2.5. Las fermentaciones se llevaron a agitación a 130 rpm. A partir del primer día del montaje, hora cero, se tomó muestra cada 6 horas durante 36 horas. Se filtró la muestra y se almacenó a 4°C para posterior cuantificación de azúcares y ácido fumárico por HPLC.

Se realizaron curvas de crecimiento de biomasa y producción de ácido fumárico en el tiempo.

3. ANÁLISIS Y RESULTADOS

3.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS

En esta investigación se evaluó como fuente de carbono para la fermentación fumárica residuos de mango criollo (*Mangifera indica linn var. Criollo.*), cáscaras de piña Manzana (*Ananas comosus*) y totumo (*Crescentia cujete*).

Para la caracterización del mango se utilizó la cáscara y la pulpa, esto con el fin de aprovechar el mango que se pierde por inadecuados manejos durante el período poscosecha, magulladuras por caída del árbol, picaduras de aves o proliferación de enfermedades; de la piña se utilizó sólo las cáscaras para aprovechar la abundancia de estos residuos generados luego del consumo de la pulpa; y del totumo se utilizó la pulpa con semillas, empleando así el fruto que se pierde gracias a la cantidad y el amplio uso del árbol como sombra para ganado en regiones calientes del país, además de que la pulpa es un desecho en la fabricación de artesanías. Con el uso de estos sustratos se pretende desarrollar una alternativa para el aprovechamiento biotecnológico de residuos agrícolas en Colombia, contribuyendo a la disminución de gases de efecto invernadero y al desarrollo de productos verdes, dándole valor agregado a residuos agrícolas y disminuyendo la dependencia de derivados del petróleo, favoreciendo a la disminución de costos en la fermentación fumárica.

La caracterización se realizó determinando humedad, cenizas, extractivos acuosos, extractivos orgánicos, azúcares (sacarosa, glucosa, fructosa), metales

pesados (Fe, Mn, Ca, Mg, Cu) y análisis elemental (C, H, N, S) a cada uno de los residuos, realizando las pruebas por duplicado.

La composición química del mango criollo (*Mangifera indica linn var. Criollo.*), las cáscaras de piña Manzana (*Ananas comosus*) y el totumo (*Crescentia cujete*) se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Composición química de los sustratos

COMPOSICIÓN QUÍMICA	MANGO	PIÑA	TOTUMO
% Humedad	79.48	86.99	78.84
% Cenizas	2.37	4.87	5.41
% Extractivos acuosos	55.64	46.95	46.03
% Extractivos orgánicos	9.05	3.41	18.92
Sacarosa (%P/P)	27.34	3.01	16.70
Glucosa (%P/P)	4.61	17.96	8.96
Fructosa (%P/P)	14.88	22.47	8.69
% C	40.88	44.54	40.15
% H	5.84	5.98	6.34
% N	0.76	2.65	1.47
% S	0.43	0.43	0.49
Magnesio (mg/kg)	12.65	11.90	12.35
Calcio (mg/kg)	62.50	67.75	53.20
Hierro (mg/kg)	65.85	98.65	22.10
Manganeso (mg/kg)	<1	<1	<1
Cobre (mg/kg)	<1	<1	<1

La composición química de los sustratos analizados depende del origen de estos y de la maduración del fruto (J. Alvarado, 2012; COSMOAGRO, 2012). El mango criollo utilizado en este trabajo era del municipio de San Jerónimo, Antioquia; este municipio se encuentra a 780 metros sobre el nivel del mar, tiene una temperatura

promedio de 25°C (Alcaldía Municipal San Jerónimo, 2013), y en el 2012 contaba con 75 hectáreas de mango plantadas, con un rendimiento promedio de 12,500 kg/hectáreas (Governación de Antioquia, 2011). La piña provenía del municipio de Barbosa, Antioquia; municipio que en términos climáticos está clasificado como bosque húmedo subtropical, con una temperatura promedio de 23°C y con una altura sobre el nivel del mar es de 1,300 metros (Alcaldía de Barbosa, 2013), y en el 2012 contaba con 14 hectáreas de piña plantadas, con un rendimiento promedio de 30,000 kg/hectáreas (Governación de Antioquia, 2011). El totumo era del municipio de Montería, Córdoba; el clima de este municipio es cálido tropical con una estación de sequía y una de lluvias a lo largo del año. La temperatura promedio anual es de 28°C con picos superiores a 40°C en temporada canicular y la humedad relativa promedio es de 78% (Alcaldía de Montería, 2013).

Comparando la humedad de los sustratos analizados mostrados en la Tabla 6, se observa que las cáscaras de piña son las que mayor porcentaje de humedad tienen, 8.6% más que el mango y 9.4% más que el totumo, por lo que se necesitará una mayor cantidad de cáscaras de piña para obtener la misma proporción de fuente de carbono disponible, que si se trabajara con mango o totumo. Por otro lado, las cenizas de los sustratos representan las sales inorgánicas que usualmente no son aprovechables por el microorganismo, siendo el totumo el que mayor porcentaje de cenizas tiene, 56.2% más que el mango y 10.0% más que la piña, lo que implica que este residuo es el que contiene mayor cantidad de sustancias no biodegradables.

Como fuente de carbono para la fermentación fumárica, el hongo *Rhizopus stolonifer* requiere sustratos ricos en carbohidratos; el mango criollo presenta 46.83 %P/P de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa), la piña Manzana 43.44 %P/P y el totumo 34.35 %P/P, lo que teóricamente representa que todos los sustratos evaluados son una fuente de carbono apta para la producción de ácido fumárico. El mango y el totumo presentan la mayor cantidad de azúcares como

sacarosa, por lo que las cáscaras de piña presenta ventajas sobre estos, ya que la mayor cantidad de azúcar presente es glucosa y esta es más fácilmente metabolizada por el microorganismo que la sacarosa (Bulut et al., 2004). El totumo es el que menor cantidad de azúcares contiene, por lo que teóricamente será la fuente de carbono que menos favorecerá la fermentación fumárica con *Rhizopus stolonifer* y las cáscaras de piña la que mayor la favorecerá. Además, al utilizar cáscaras de piña la fermentación podría ser más corta que si se utiliza mango y totumo, ya que el *Rhizopus stolonifer* tendrá disponible mayor cantidad de glucosa inicial para su consumo.

3.2 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN

La cuantificación simultánea de azúcares (sacarosa, glucosa, fructosa) y ácido fumárico se realizó por cromatografía líquida en un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) (Shimadzu, Prominence), inicialmente utilizando las condiciones de operación del cromatógrafo propuestas por protocolos de cuantificación de azúcares y ácidos orgánicos (Ball, Bullock, Lloyd, Mapp, & Ewen, 2011), los cuales se muestran en las Tablas 7 y 8.

Tabla 7. Condiciones iniciales de cuantificación de azúcares

VARIABLE	VALOR
Flujo (mL/min)	0.4
Temperatura horno (°C)	65
Columna	Agilent Hi-Plex H, 7.7x300 mm, 8µm
Fase móvil	H ₂ SO ₄ 0.0085 M
Detector	RI

Tabla 8. Condiciones iniciales de cuantificación de ácidos orgánicos

VARIABLE	VALOR
Flujo (mL/min)	0.6
Temperatura horno (°C)	50
Columna	Agilent Hi-Plex H, 7.7x300 mm, 8µm
Fase móvil	H ₂ SO ₄ 0.1 M
Detector	RI

Para el análisis de azúcares (sacarosa, glucosa, fructosa) y ácido fumárico en las fermentaciones, se requería desarrollar un método que permitiera la cuantificación de todas las sustancias en un solo corrido, por lo que era necesario combinar las condiciones de los métodos presentados en las Tablas 7 y 8, buscando las condiciones óptimas que facilitarían la cuantificación de las muestras por HPLC.

La columna propuesta inicialmente, Agilent Hi-Plex H, 7.7x300 mm, 8µm, es una columna de intercambio iónico, la cual contiene grupos funcionales iónicos y retiene el soluto, de características iónicas pero de signo opuesto, intercambiándolo por un proceso reversible de la fase móvil (Quattrocchi, Abelaira, & Laba, 1992), por lo cual era apta para la cuantificación de sacarosa, glucosa, fructosa y ácido fumárico ya que estas son todas sustancias iónicas, sin embargo no se contaba con esta columna para el desarrollo de los análisis, por lo que se decidió utilizar una columna Ion Exclusion 7.8x300 mm, que igualmente contenía grupos funcionales iónicos en su interior y que cumplía con las características necesarias para la cuantificación de las sustancias.

La fase móvil de ambos métodos eran soluciones de ácido sulfúrico pero a diferentes concentraciones, al realizar ensayos con las dos soluciones propuestas se encontró que los picos de los tres azúcares analizados no se separaban, lo que impedía su cuantificación. Es por esto que era necesario aumentar el tiempo de retención de estas sustancias y en una fase móvil con contraión divalente como el SO₄⁼, la retención es inversamente proporcional al cuadrado de su concentración

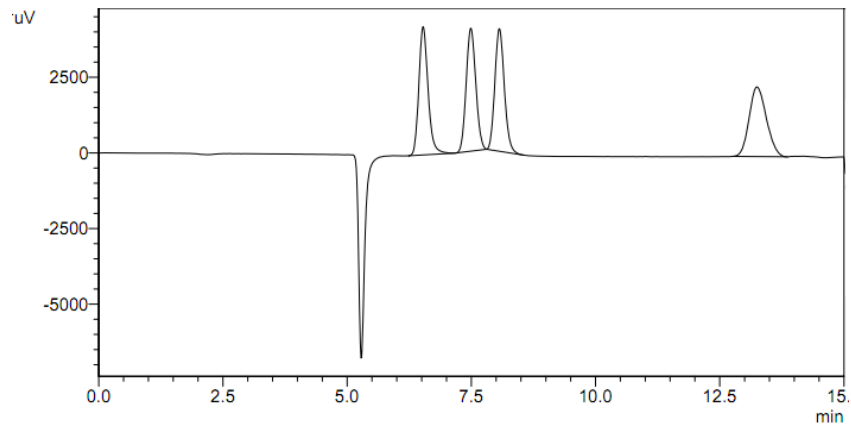
(Quattrocchi et al., 1992), por lo que se eligió una solución de H_2SO_4 0.005 M, una concentración menor a las propuestas inicialmente. Por otro lado, a mayor temperatura del horno, menor retención del soluto (Quattrocchi et al., 1992), por lo que se decidió trabajar a una temperatura de 30°C , menor a las propuestas, para favorecer la retención de los azúcares y con esto facilitar su cuantificación.

Habiendo elegido estas condiciones, se ajustó el flujo de operación y el volumen de inyección analizando los resultados de los corridos realizados preliminarmente. Las condiciones del método que se utilizó para la cuantificación de las muestras de fermentación fumárica se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Condiciones del método de cuantificación por HPLC

VARIABLE	VALOR
Flujo (mL/min)	0.8
Presión de trabajo (bar)	37
Temperatura horno ($^\circ\text{C}$)	30
Columna	Ion Exclusion 7.8x300 mm
Fase móvil	H_2SO_4 0.01 N
Detector	RID
Volumen de inyección (μL)	10
Tiempo de corrido (min)	15

En la Figura 7 se muestra el cromatograma obtenido bajo las condiciones del método desarrollado. El primer pico de izquierda a derecha corresponde a la sacarosa, el segundo a la glucosa, el tercero a la fructosa y el último al ácido fumárico. De la Figura 7 se observa que los picos están bien definidos y que se logró una separación adecuada de estos, lo que implica una buena cuantificación.

Figura 7. Cromatograma azúcares – ácido fumárico

Finalmente el método de cuantificación fue estandarizado en términos de linealidad, exactitud y aptitud del sistema, realizando un análisis estadístico de los datos con el fin de determinar si el método desarrollado era apropiado para el análisis de las muestras de la fermentación. En las Tablas 10 - 12 se presentan los criterios para la evaluación de la aptitud del sistema, la exactitud y la linealidad respectivamente.

Tabla 10. Parámetros de evaluación de aptitud del sistema

PARÁMETRO	CRITERIO
Número Platos Teóricos	> 2000
Asimetría de pico	< 2.0
% RSD Área	< 2.0

Tabla 11. Parámetros de evaluación de exactitud

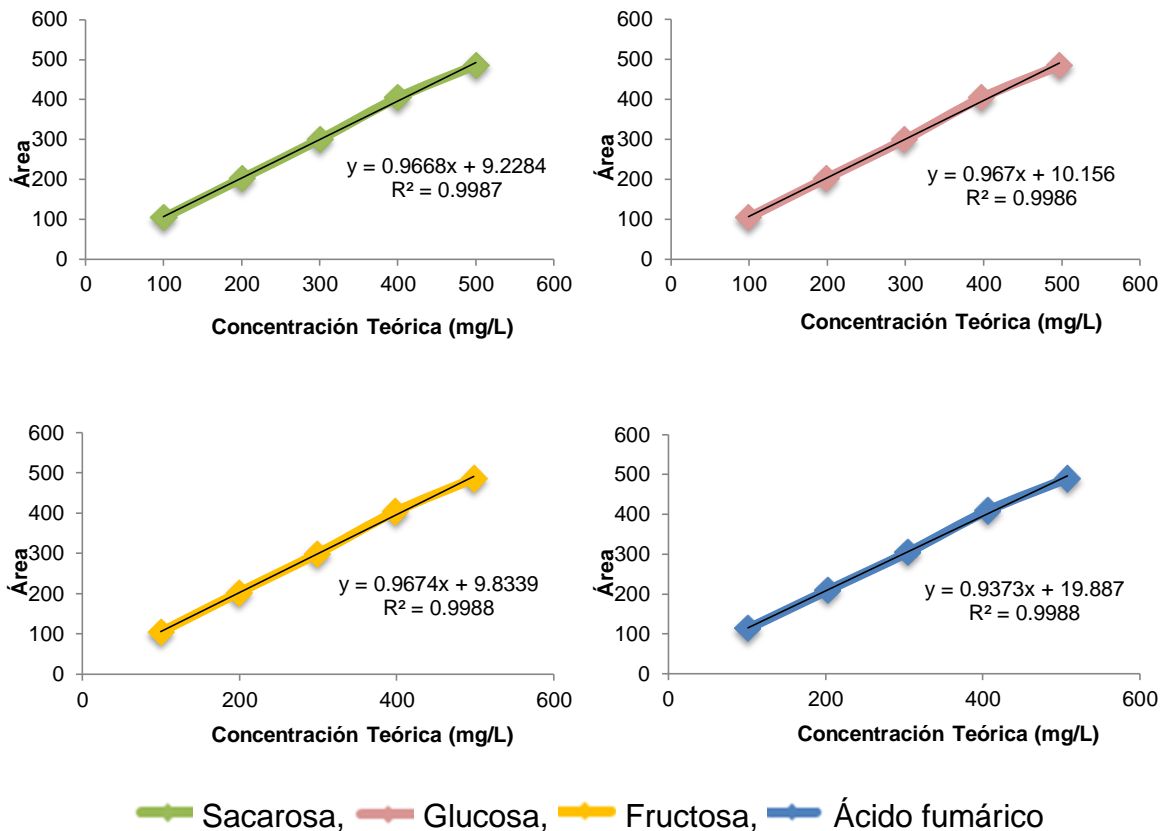
PARÁMETRO	CRITERIO
%RSD de cada nivel	$\leq 2\%$
Test Igualdad de Varianzas	$G_{Exp} < G_{Tabla}$

Tabla 12. Parámetros de evaluación de linealidad

PARÁMETRO	CRITERIO
Coeficiente de correlación (r)	≥ 0.999
Coeficiente de determinación (r^2)	≥ 0.990
%RSD Factores de respuesta (RF)	$\leq 4\%$
Test Linealidad	$t_{Exp} \geq t_{Tabla}$
Test Proporcionalidad	$t_{Exp} \leq t_{Tabla}$

Los parámetros fueron evaluados individualmente para las sustancias cuantificadas (sacarosa, glucosa, fructosa y ácido fumárico). Para la estandarización se prepararon cinco soluciones de las cuatro sustancias (sacarosa, glucosa, fructosa y ácido fumárico) con concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 ppm, cada una de estas concentraciones corresponde a un nivel de cuantificación. En la Figura 8 se muestran las curvas de calibración para cada sustancia con sus respectivas ecuaciones.

Figura 8. Curvas de calibración por HPLC



Los criterios para la estandarización del método de cuantificación desarrollado, fueron evaluados para las sustancias de interés en muestras preparadas de los cuatro estándares mezclados, simulando lo que ocurrirá en las muestras de la fermentación fumárica. Al llevar a cabo la estandarización se confirma y documenta que los resultados producidos por el método son confiables (Quattrocchi et al., 1992).

La evaluación de la aptitud del sistema con los criterios de número de platos teóricos, asimetría de pico y %RSD área, pretende establecer la adecuabilidad del sistema, asegurando que el método genera resultados de precisión y exactitud aceptables (Quattrocchi et al., 1992). Los resultados de estos criterios han sido

satisfactorios, sobrepasando los límites establecidos en todos los casos para las cuatro sustancias analizadas.

La linealidad se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta, arrojando como resultado la curva de calibración del analito (Quattrocchi et al., 1992). Los parámetros evaluados para esta prueba, coeficiente de correlación (r), coeficiente de determinación (r^2), %RSD factores de respuesta (RF), test linealidad, test proporcionalidad también cumplieron con los criterios, siendo el estándar de ácido fumárico el que obtuvo valores más cercanos a los límites establecidos, siempre cumpliendo con estos.

La evaluación de exactitud del método permite observar que tan lejos están los valores obtenidos de los valores verdaderos (Quattrocchi et al., 1992) y se realiza comprobando los parámetros %RSD de cada nivel y test igualdad de varianzas. De los resultados obtenidos se observa que todos los criterios fueron cumplidos, y que el %RSD para el nivel uno (N1) es el que más cercano se encuentra a los límites establecidos en el criterio, lo que puede deberse a que este nivel comprende el estándar de menor concentración y por lo general es el que mayor error presenta en la preparación.

En la Tabla 13 se presentan los resultados obtenidos para la estandarización del método de cuantificación por HPLC.

Tabla 13. Resultados estandarización método de cuantificación por HPLC

PARÁMETRO	CRITERIO	SAC	GLU	FRU	Á. FUM
Número Platos Teóricos	>2000	5906.35	6707.38	8159.42	6693.05
Asimetría de pico	<2.0	1.24	1.10	1.18	1.10
%RSD Área	<2.0	0.55	0.08	0.02	0.13
Coefficiente de correlación (r)	≥0.999	0.999	0.999	0.999	0.999
Coefficiente determinación (r ²)	≥0.990	0.999	0.999	0.999	0.999
%RSD Factor respuesta (RF)	≤4%	2.33	2.67	2.51	4.00
Test Linealidad (t _{Exp})	≥3.182	48.397	46.374	50.783	50.019
Test Proporcionalidad (t _{Exp})	≤3.182	1.393	1.477	1.563	3.151
%RSD de cada nivel	≤2%	N1=2.0 N3=0.55 N5=0.54	N1=1.3 N3=0.08 N5=0.09	N1=1.82 N3=0.02 N5=0.20	N1=0.90 N3=0.13 N5=0.45
Test Igualdad de Varianzas (G _{Exp})	<0.8709	0.4863	0.8705	0.7964	0.8029

Los resultados de la Tabla 13 muestran que para el método de cuantificación propuesto se cumplen todos los parámetros de estandarización evaluados para las sustancias de interés en la fermentación. El método desarrollado se utilizó para la cuantificación de sacarosa, glucosa, fructosa y ácido fumárico en los ensayos de las fermentaciones realizados para este trabajo.

3.3 ENSAYOS PRELIMINARES DE LA FERMENTACIÓN FUMÁRICA

Para los ensayos preliminares, las fermentaciones se realizaron en erlenmeyer de 250 mL adicionando a cada uno 100 mL de medio, el cual se preparó como se describe en la sección 2.4. Los ensayos se realizaron con el fin de evaluar los tres sustratos como fuente de carbono para la fermentación. En la Figura 9 se muestra los montajes para la fermentación fumárica.

Figura 9. Ensayos preliminares fermentación fumárica

Cada ensayo se realizó por duplicado, y se cuantificó al inicio y al final de la fermentación los azúcares (sacarosa, glucosa, fructosa) y el ácido fumárico. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 14.

Tabla 14. Resultados ensayos preliminares

FUENTE DE CARBONO	AZÚCARES INICIALES (%P/P)	AZÚCARES FINALES (%P/P)	Á. FUMÁRICO INICIAL (mg/L)	Á. FUMÁRICO FINAL (mg/L)
Mango	46.83	4.45	0.00	4.52
Cáscara de piña	43.44	0.32	0.00	5.93
Totumo	34.35	0.04	0.00	-

De los resultados presentados en la Tabla 14 se observa que hay consumo de azúcares por parte del microorganismo y que hay producción de ácido fumárico en las fermentaciones que se realizaron con mango y cáscaras de piña pero no en las que se utilizó totumo como fuente de carbono, lo que muestra el potencial de los sustratos para la fermentación fumárica.

En la Tabla 15 se presenta un resumen de algunos estudios reportados en la literatura sobre la producción de ácido fumárico con diferentes hongos del género *Rhizopus*,

Tabla 15. Resumen producción de ácido fumárico con *Rhizopus sp.*

CEPA	MATERIAL	PRODUCCIÓN (g/L)	PRODUCTIVIDAD (g/L/h)	RENDIMIENTO	REFERENCIA	
<i>R. nigricans</i>	glucosa	14.7	-	0.5	Fodter et al., 1938	
	glucosa	20	0.25	0.66	Romano et al., 1962	
<i>R. arrhizus</i>	glucosa	90	0.25	0.7	Rhodes et al., 1962	
	xilosa	15.3	0.07	0.23	Kautola y Linko, 1989	
	glucosa	121	1.02	0.37	Ling y Ng, 1989	
	glucosa	73	9.5	0.7	Gangl et al., 1990	
	harina de papa	43.5	0.42	0.58	Moresi et al., 1991	
	almidón de maíz	71.9	0.5	0.6	Moresi et al., 1992	
	melaza	17.5	0.36	0.36	Petruccioli, 1996	
	glucosa	40	0.33	0.31	Riscaldati et al., 2000	
	<i>R. oryzae</i>	glucosa	85	4.25	0.91	Cao et al., 1996
		glucosa	37.8	0.81	0.75	Du et al., 1997
glucosa		37.2	1.03	0.53	Zhou et al., 2002	
estiércol lechero		31	0.32	0.31	Liao et al., 2008	
glucosa		56.2	0.7	0.54	Fu et al., 2010	
glucosa		41.1	0.37	0.48	Huang et al., 2010	
glucosa		32.1	0.32	0.45	Kang et al., 2010	
almidón de maíz		27.8	0.33	0.35	Xu et al., 2010	
glucosa		30.2	0.19	0.28	Roa et al., 2010	
almidón de maíz		45	0.55	0.47	Huang et al., 2011	
<i>R. formosa</i>	bagazo de yuca	21.3	-	0.34	Carta et al., 1999	

Fuente: (Xu, Li, Huang, & Wen, 2012).

La concentración más baja de ácido fumárico registrada en la Tabla 15 para la cepa utilizada en este trabajo, *Rhizopus nigricans*, es de 14.7 g/L (Xu et al., 2012), al compararla con la concentración más alta obtenida en los ensayos preliminares realizados, la cual se obtuvo con cáscaras de piña y es de 5.93 mg/L, se encuentra que el dato de los ensayos experimentales está por debajo del dato teórico. Esta discrepancia en los resultados se presenta principalmente por la fuente de carbono utilizada en cada fermentación, el dato experimental de este

trabajo que se utilizó para la comparación se obtuvo de la fermentación que tuvo como fuente de carbono las cáscaras de piña, las cuales contenían 17.96% P/P de glucosa, mientras que la fuente de carbono de la fermentación utilizada como dato teórico era glucosa pura por lo que el microorganismo utilizado en esta fermentación disponía de una mayor cantidad de fuente de carbono para producir ácido fumárico. El rendimiento para la fermentación presentada en la Tabla 15 es de 0.5, comparado con el obtenido experimentalmente con cáscaras de piña el cual es de 0.0005 calculado como g de ácido fumárico por g de glucosa, se encuentra que este está 1000 veces por debajo del dato experimental.

En la Tabla 16 se presenta un estudio realizado por Carta et al. en 1999 donde compara diferentes especies de *Rhizopus* en la producción de ácido fumárico, utilizando como fuente de carbono una mezcla de hidrolizados de yuca y residuos de papa (80% y 20% peso respectivamente), donde la especie de mayor producción de ácido fumárico es el *Rhizopus formosa* 28422 (Vasco, 2007).

Tabla 16. Selección de mejor especie *Rhizopus* productora de ácido fumárico

CEPA	METABOLITOS (g/L)					ETANOL
	ÁCIDO FUMÁRICO	ÁCIDO MALEICO	ÁCIDO LÁCTICO	ÁCIDO ACÉTICO	ÁCIDO CÍTRICO	
<i>R. delemar</i> 34612	0.07	n.d.	1.81	0.57	n.d.	4.58
<i>R. delemar</i> 28168	0.68	n.d.	0.62	0.77	0.43	6.9
<i>R. oryzae</i> 28627	1.22	2.9	0.02	0.58	0.67	4.55
<i>R. oligosporus</i> 3267	0.6	1.72	0.15	0.33	n.d.	3.96
<i>R. arrhizus</i> 28425	0.16	n.d.	n.d.	0.13	0.23	0.6
<i>R. arrhizus</i> 16179	0.56	n.d.	0.15	0.41	0.45	8.01
<i>R. arrhizus</i> 2582	0.04	n.d.	0.88	1.04	0.35	4.14
<i>R. oryzae</i> 395	0.46	n.d.	n.d.	0.35	0.58	8.9
<i>R. formosa</i> 28422	2.76	5.03	n.d.	n.d.	n.d.	0.36
<i>R. circicans</i> 1475	n.d.	n.d.	n.d.	0.9	0.17	7.31
<i>R. sp</i> 25975	0.82	2.43	0.65	1.06	0.68	8.26

Fuente: (Vasco, 2007).

Al comparar las concentraciones de ácido fumárico en la Tabla 16 con el valor más alto obtenido de las fermentaciones preliminares con los tres sustratos analizados, el cual fue de 5.93 mg/L obtenido con cáscaras de piña sin la optimización de variables, se observa que este se encuentra por debajo de los resultados mostrados en la Tabla 16, sin embargo los valores de esta tabla son producto de un proceso de optimización del medio de fermentación y de la cepa productora.

De los resultados obtenidos con los ensayos preliminares se observa que con el mango y las cáscaras de piña hay producción de ácido fumárico, por lo que estos dos sustratos son aptos para la fermentación fumárica con *Rhizopus stolonifer*, mientras que con el totumo no hubo formación de producto, lo que puede ser debido a que durante esta fermentación, utilizando totumo como fuente de carbono, se producen otras sustancias diferentes al ácido fumárico, tal como lo predicen algunos autores en sus estudios, donde afirman que en la fermentación con cepas de *Rhizopus sp* se producen además de ácido fumárico otros ácidos carboxílicos como maléico, láctico, acético, succínico y cítrico (Carta et al., 1999; Rhodes et al., 1959) y algunas veces también se produce etanol (Roa Engel et al., 2008), sustancias que pudieron haber inhibido las enzimas responsables de la producción de ácido fumárico con el microorganismo. Con estos resultados se desecha el totumo como sustrato y no se realizarán ensayos posteriores con esta fuente de carbono.

La concentración de azúcares iniciales (sacarosa, glucosa y fructosa) de la fermentación al utilizar el mango como sustrato fue de 46.83% P/P y la final de 4.45% P/P por lo que el consumo fue de 90.4% y al utilizar cáscaras de piña los azúcares iniciales fueron 43.44% P/P y los finales 0.32% P/P y el consumo fue de 99.3%. El consumo de azúcares en la fermentación con cáscaras de piña fue 1.1 veces mayor que el de la fermentación con mango, lo que concuerda con los resultados de la producción de ácido fumárico, que para la fermentación utilizando cáscaras de piña fue 1.3 veces mayor que la fermentación con mango.

Al utilizar mango como sustrato en la fermentación se obtuvo 4.52 mg/L de ácido fumárico y al utilizar cáscaras de piña se obtuvo 5.93 mg/L, comparando estos valores se observa que la producción con cáscaras de piña es 23.78% mayor que la producción con mango, lo que puede ser debido al consumo de azúcares por el microorganismo en cada fermentación, que como se mencionó en el párrafo anterior fue mayor 1.1 veces en la fermentación con cáscaras de piña; además, como se muestra en la Tabla 6, la mayor cantidad de azúcares presentes en el mango se encontraba como sacarosa y este es un azúcar más difícil de metabolizar por el microorganismo, haciendo la ruta más larga según el ciclo de krebs (Vasco, 2007), mientras que la mayor cantidad de azúcares presentes en las cáscaras de piña se encontraba como glucosa y como este último es más fácil de metabolizar por el microorganismo, era de esperarse que la producción de ácido fumárico fuera más alta durante el mismo tiempo de fermentación.

La producción de ácido fumárico, en los ensayos preliminares, fue mayor al utilizar cáscaras de piña como fuente de carbono para la fermentación con *Rhizopus stolonifer*, se escoge este residuo para continuar con la investigación y realizar la optimización de las variables.

3.4 OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO

El objetivo del diseño de experimentos fue determinar la concentración óptima de cáscaras de piña y KNO_3 para la producción de ácido fumárico, ya que estas variables son determinantes en la producción y afecta severamente la eficiencia del proceso (Carta et al., 1999).

Para realizar los ensayos de la optimización se fijaron varios parámetros de la fermentación: temperatura ambiente (promedio de 23.4°C (Tutiempo.net, 2012)),

velocidad de agitación (130 rpm), pH inicial (ajustado a 6 con NaOH 1M), tiempo de fermentación (3 días) y composición del medio (descrito en la sección 2.4). Estas condiciones fueron elegidas a partir de estudios encontrados en la literatura (Carta et al., 1999; Vasco, 2007), sin embargo el tiempo de fermentación será ajustado una vez se cuente con el medio óptimo para la fermentación utilizando cáscaras de piña, realizando la curva de producción de ácido fumárico en el tiempo.

Los valores límites de la concentración de fuente de carbono (cáscaras de piña) y fuente de nitrógeno (KNO_3) se seleccionaron de acuerdo a los valores utilizados por Carta et al. en su evaluación de la relación C/N para la fermentación fumárica (Carta et al., 1999). Se trabajó la concentración de cáscaras de piña un el rango de 100 a 340 g/L y la concentración de KNO_3 de 0.7 a 2.5 g/L.

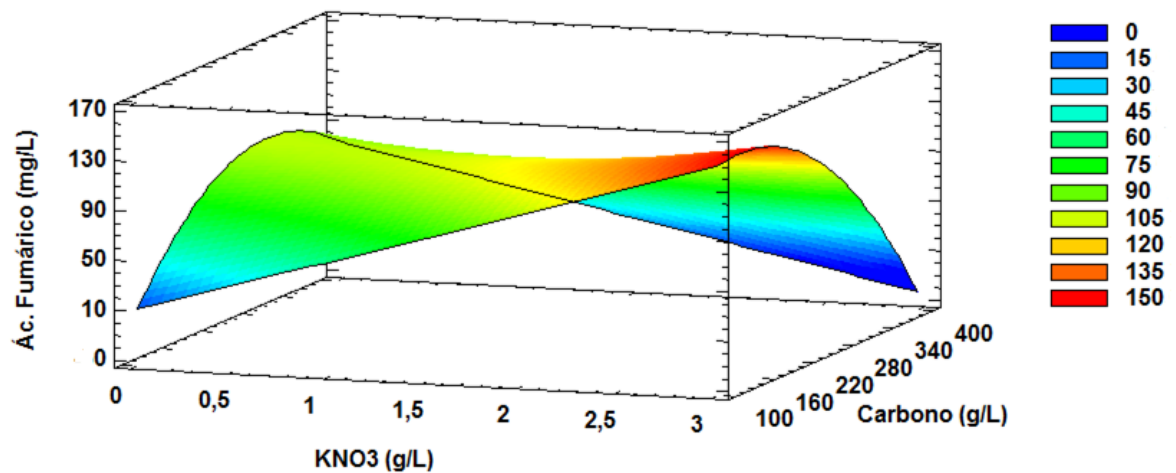
La matriz de diseño con los resultados de la producción de ácido fumárico se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17. Matriz de diseño y resultados de ácido fumárico producido

ENSAYO	FACTORES		VARIABLE RESPUESTA
	KNO ₃ (g/L)	FUENTE DE CARBONO (g/L)	ÁCIDO FUMÁRICO (mg/L)
1	1.6	220	112.429
2	2.5	340	31.542
3	1.6	220	113.329
4	1.6	50.2944	0.000
5	1.6	220	111.787
6	0.7	340	30.788
7	1.6	220	112.628
8	2.5	100	133.334
9	1.6	220	112.848
10	1.6	220	111.841
11	1.6	389.706	80.112
12	2.87279	220	132.409
13	0.327208	220	138.833
14	1.6	220	111.778
15	0.7	100	19.094
16	1.6	220	112.393

En el diseño de experimentos realizado con el software STATGRAPHICS Centurion se obtuvo la superficie de respuesta que se muestra en la Figura 10.

Figura 10. Superficie de respuesta



En la Figura 10 se muestra la superficie de respuesta que representa matemáticamente, en un espacio tridimensional, la ecuación del modelo arrojado por el diseño de experimentos, donde se demuestra la influencia de las variables (concentración de KNO_3 y fuente de carbono) sobre la respuesta de interés (concentración de ácido fumárico). La superficie de respuesta obtenida tiene la forma de cresta ascendente, donde la respuesta a la condición óptima de operación para las variables de la fermentación presenta un máximo en un costado de la superficie. Como se observa, el punto máximo para la superficie se alcanza a medida que la variable concentración de fuente de nitrógeno (KNO_3) aumenta y la variable concentración de fuente de carbono (Carbono) disminuye.

Una de las principales ventajas del método de superficie de respuesta es que ofrece la posibilidad de encontrar puntos óptimos a lo largo del intervalo de estudio e incluso fuera de este por la evaluación de los niveles axiales (Vasco, 2007). Del diseño de experimentos se obtuvo que para la producción de ácido fumárico el valor óptimo de KNO_3 fue 2.873 g/L y de fuente de carbono (cáscaras de piña) 170.189 g/L, lo que teóricamente llevaría a que en la fermentación se produjeran 144.948 mg/L de ácido fumárico. Con estos valores óptimos se corrobora el

máximo observado en la superficie de respuesta (Figura 10), donde se anotaba que el máximo se alcanzaba cuando la variable KNO_3 se acercaba a su límite superior y la variable Carbono a su límite inferior.

En los ensayos preliminares de la fermentación utilizando cáscaras de piña se obtuvo una producción de ácido fumárico de 5.93 mg/L sin optimizar las variables, mientras que con la optimización de variables se espera obtener 144.98 mg/L, empleando concentraciones de KNO_3 y cáscaras de piña de 2.873 g/L y 170.189 g/L respectivamente y preparando el medio como se indica en la sección 2.4.

Al comparar los resultados obtenidos inicialmente en los ensayos preliminares con los hallados mediante la optimización de las concentraciones de KNO_3 y fuente de carbono, se puede observar que en la producción de ácido fumárico hubo un incremento de 24.4 veces respecto al ensayo inicial, lo que demuestra que las variables elegidas fueron acertadas para realizar la optimización de la fermentación fumárica.

Una vez determinadas las variables óptimas para el medio de fermentación es necesario ajustar el tiempo de fermentación requerido para mejorar la producción de ácido fumárico.

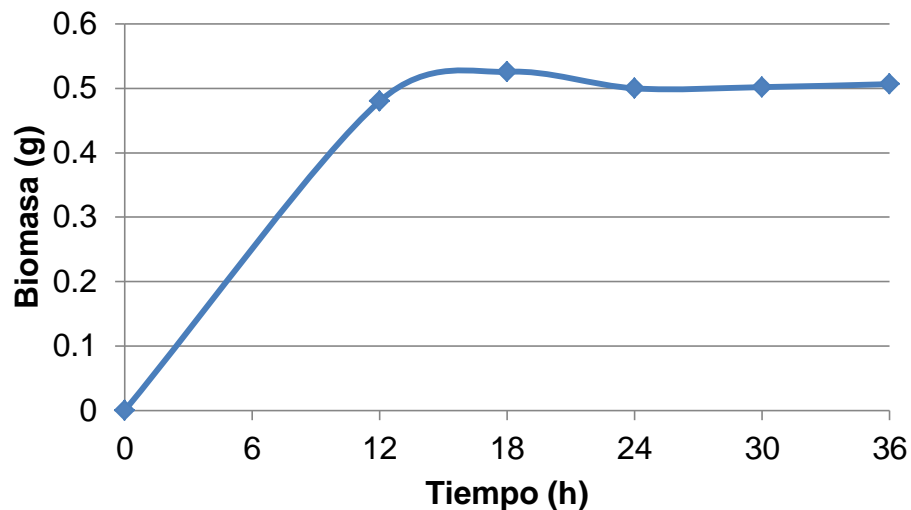
3.5 CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO FUMÁRICO

Para el análisis de la cinética de producción de ácido fumárico con *Rhizopus stolonifer* se realizaron curvas de crecimiento de biomasa y producción de ácido fumárico en el tiempo. Estas curvas se realizaron con cáscaras de piña como fuente de carbono y el medio se preparó como se describe en la sección 2.4, con las composiciones de KNO_3 y fuente de carbono (cáscaras de piña) halladas en el

diseño de experimentos, 2.873 g/L y 170.189 g/L respectivamente, ya que estos valores corresponden a las condiciones óptimas de la fermentación.

En la Figura 11 se muestra la curva de crecimiento del microorganismo, donde se observa que el *Rhizopus stolonifer* no presenta fase de adaptación para un muestreo realizado cada 6 horas, esta fase se puede presentar durante las primeras horas de crecimiento del hongo en el medio de fermentación y por lo tanto no se registra en la curva.

Figura 11. Curva de crecimiento de *Rhizopus stolonifer*

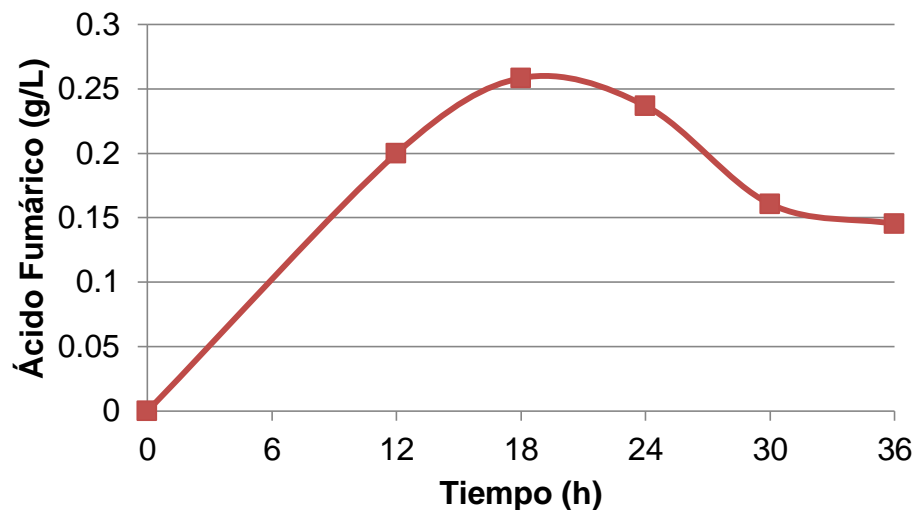


El crecimiento microbiano del *Rhizopus stolonifer* en el tiempo muestra dos fases: la fase exponencial, la cual se presenta entre las horas 0 y 18, y la fase estacionaria que se da entre las 18 y 36 horas de crecimiento. La fase exponencial es rápida, lo que demuestra nuevamente que el medio es óptimo para el crecimiento del hongo. La fase estacionaria es larga, por lo que se asume que el microorganismo encuentra fuentes alternativas para su crecimiento, probablemente durante esta etapa el hongo degrada la sacarosa presente en las cáscaras de piña para utilizarla como fuente de carbono, pero además de esto, durante esta etapa

se da la acumulación de sustancias tóxicas para el hongo, por lo que el crecimiento bruto se equilibra con las muertes celulares. La fase de muerte del microorganismo no se alcanza a observar durante las horas de muestreo realizado.

Los resultados de la producción de ácido fumárico obtenidos para las 36 horas de muestreo se presentan en la Figura 12.

Figura 12. Producción de ácido fumárico



La producción de ácido fumárico con *Rhizopus stolonifer* muestra crecimiento en las primeras 18 horas, siendo este el tiempo donde se alcanza la mayor concentración de ácido en la fermentación. A partir de allí se observa un decrecimiento de la producción de ácido fumárico, lo que se atribuye a la inhibición del microorganismo y a la posible formación de alguna sal del ácido, formada por la reacción de este con las sustancias presentes en el medio de fermentación.

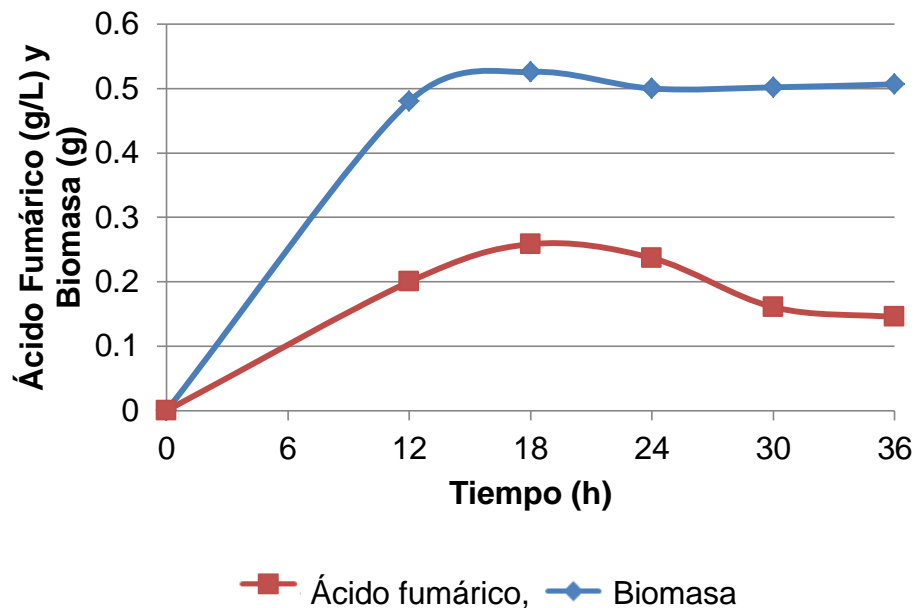
La máxima producción de ácido fumárico fue de 258.393 mg/L a las 18 horas, por lo que 18 horas es el tiempo óptimo de fermentación para el hongo *Rhizopus stolonifer* utilizando cáscaras de piña como fuente de carbono.

La concentración de ácido fumárico obtenida en el tiempo óptimo de fermentación, 258.393 mg/L a las 18 horas, es mayor a la que se obtuvo en el diseño de experimentos, 144.948 mg/L, el cual se llevó a cabo durante 3 días, por lo que se comprueba que no es necesario tantas horas de fermentación, debido a que a partir de las 18 horas la concentración de ácido fumárico decrece.

Comparando los resultados obtenidos en el diseño de experimentos con los hallados mediante la curva de producción de ácido fumárico, se observa que la producción de ácido fumárico tuvo un incremento de 1.78 veces respecto al ensayo de la optimización de variables, lo que demuestra que el tiempo de fermentación óptimo es el hallado en la curva de producción (Figura 12).

Al sobreponer las curvas de crecimiento de biomasa y producción de ácido fumárico se obtiene la Figura 13.

Figura 13. Producción de ácido fumárico y crecimiento de biomasa



En la Figura 13, se observa que el punto de equilibrio entre las dos variables se da en la hora 18, ya que en este tiempo se obtiene la mayor producción de ácido fumárico y la mayor cantidad de biomasa, lo que indica que este es un tiempo óptimo para realizar la fermentación, utilizando el medio optimizado con el diseño de experimentos.

Al final del trabajo, la concentración más alta de ácido fumárico obtenida fue de 258.393 mg/L, al comparar este valor con el estudio sobre la selección de la mejor especie de *Rhizopus* productora de ácido fumárico, presentado en la Tabla 16, se observa que el resultado obtenido se encuentra 6.5 veces por encima del valor más bajo presentado en la Tabla 16, el cual fue 0.04 g/L obtenido con la cepa *R. arrhizus* 2582, y 10.7 veces por debajo del valor más alto, 2.76 g/L obtenido con *R. formosa* 28422. La baja producción de ácido fumárico obtenida puede ser debido a varios factores como el no control del pH a lo largo de la fermentación, ya que la neutralización continua del pH durante la fermentación ha sido demostrada por varios autores como necesaria para la obtención de rendimientos óptimos de ácido fumárico (Gangl, Weigand, & Keller, 1990; Riscaldati, Moresi, Federici, & Petruccioli, 2000; Roa Engel et al., 2008; Zhou, Du, & Tsao, 2002), lo cual pudo producir la inhibición del microorganismo por el producto, demostrado por Riscaldati et al (2000), quien encontró que el ácido fumárico libre inhibía su propia producción ya que los protones acumulados en el medio disminuyen el pH, ejerciendo un efecto inhibitorio progresivo sobre la producción de ácido fumárico (Riscaldati et al., 2000). A pH bajos el ácido fumárico excretado pasivamente se difunde de vuelta a través de la membrana del hongo, disminuyendo el pH intracelular, haciendo que la fermentación falle (Roa Engel et al., 2008). Otro de los factores pudo ser la morfología del hongo, siendo esta una de las dificultades de las fermentaciones con especies de *Rhizopus sp*, ya que estas tienden a crecer en las paredes y en los agitadores del reactor, a veces, en forma de masas, haciendo que la fermentación pueda sufrir de limitaciones de oxígeno (Roa Engel et al., 2008), lo cual perjudica la producción de ácido fumárico en la fermentación. Además, como se mencionó anteriormente en la fermentación con cepas de

Rhizopus se producen además de ácido fumárico otras sustancias como ácido maléico, ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico y etanol (Carta et al., 1999; Rhodes et al., 1959), lo que pudo influir en el bajo rendimiento obtenido para la fermentación, el cual es de 0.85% calculado como g de ácido fumárico por g de glucosa. A pesar de la baja producción de ácido fumárico con *Rhizopus stolonifer* utilizando cáscaras de piña como fuente de carbono, el hecho de que este residuo sea más económico y abundante que la glucosa y la posibilidad del aprovechamiento de este, hace que la fermentación optimizada pueda ser atractiva para la producción de ácido fumárico.

4. CONCLUSIONES

Las cáscaras de piña son el residuo más adecuado para la fermentación fumárica con *Rhizopus stolonifer*, comparadas con el mango que produce menos cantidad de ácido fumárico y el totumo que no produce.

Las condiciones de operación para realizar la fermentación fueron: velocidad de agitación de 130 rpm, temperatura ambiente (promedio de 23.4°C), pH inicial de 6 y tiempo de fermentación de 18 horas.

La producción de ácido fumárico sin la optimización de variables, utilizando cáscaras de piña como fuente de carbono para la fermentación fue de 5.93 mg/L con un rendimiento producto/sustrato de 0.05%.

Los valores óptimos de concentración de KNO_3 y concentración de cáscaras de piña para la fermentación fumárica fueron 2.87 g/L y 170.19 g/L respectivamente y el tiempo óptimo de fermentación es 18 horas.

La producción de ácido fumárico con las variables optimizadas después de 18 horas de fermentación fue de 258.39 mg/L con un rendimiento producto/sustrato de 0.85%, 17 veces mayor a la fermentación sin optimizar.

5. RECOMENDACIONES

Controlar el pH en la fermentación con el fin de mantener el medio en un pH aproximado de 6 y evitar la inhibición del *Rhizopus stolonifer* por el ácido fumárico producido.

Evaluar la influencia de la velocidad de agitación y la aireación sobre la morfología del microorganismo, para evitar el crecimiento del hongo como una masa y favorecer la formación de pellets.

Detectar y cuantificar otros ácidos orgánicos que se pueden estar produciendo en la fermentación con *Rhizopus stolonifer*.

BIBLIOGRAFÍA

- ACADEMIC. (2010). Ácido Fumárico. Recuperado de <http://www.esacademic.com/dic.nsf/eswiki/33745>
- Ajila, C. M., Bhat, S. G., & Prasada Rao, U. J. S. (2007). Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chemistry*, 102(4), 1006–1011.
- Alcaldía de Barbosa. (2013). Barbosa. Recuperado de <http://www.barbosa.gov.co/portal/>
- Alcaldía de Montería. (2013). Montería. Recuperado de <http://www.monteriacordoba.gov.co/>
- Alcaldía Municipal San Jerónimo. (2013). San Jerónimo. Recuperado de <http://www.sanjeronimo-antioquia.gov.co/nuestromunicipio.shtml?apc=mlxx-1-&m=f>
- Alvarado, A. (2011). Piña. Recuperado de <http://www.saborysalud.com>
- Alvarado, J. (2012). Situación actual y perspectivas de la cadena Productiva del Mango en Colombia.
- Alviar Ramirez, M. (2012, Marzo 7). El futuro y los recursos naturales. *El Colombiano*. Recuperado de http://www.elcolombiano.com/BancoConocimiento/E/el_futuro_y_los_recursos_naturales/el_futuro_y_los_recursos_naturales.asp
- Ball, S., Bullock, S., Lloyd, L., Mapp, K., & Ewen, A. (2011). Analysis of carbohydrates, alcohols, and organic acids by ion-exchange chromatography. Recuperado de [https://www.bgb-shop.de/files/master/Agilent/PolymerLabs/Agilent Hi-Plex Compendium.pdf](https://www.bgb-shop.de/files/master/Agilent/PolymerLabs/Agilent%20Hi-Plex%20Compendium.pdf)
- Bulut, S., Elibol, M., & Ozer, D. (2004). Effect of different carbon sources of L(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, 21, 33–37.

- Carta, F., Soccol, C., Ramos, L., & Fontana, J. (1999). Production of fumaric acid by fermentation of enzymatic hydrolysates derived from cassava bagasse. *Bioresource technology*, 68, 23–28.
- Centro de Investigación en Biotecnología (CIBIOT). (2011). Protocolos de caracterización físico-química. Medellín, Colombia.
- Centro de Investigación en Biotecnología (CIBIOT). (2012). Biomasa de residuos agrícolas en el departamento de Antioquia.
- Consumer. (2010). ¿Cuánto petróleo queda en el mundo? *Eroski Consumer*. Recuperado de <http://revista.consumer.es/web/es/20040101/medioambiente/>
- COSMOAGRO. (2012). Colombia: Producción de piña es significativa en el país. Recuperado de <http://www.cosmoagro.com/site/blog/colombia-produccion-de-pina-es-significativa-en-el-pais/>
- Dashtban, M., Schraft, H., & Qin, W. (2009). Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues: Opportunities & Perspectives. Recuperado de <http://www.biolsci.org/v05p0578.htm>
- Foster, J., Carson, S., Anthon, D., Davis, J., Jeferson, W., & Long, M. (1949). AEROBIC FORMATION OF FUMARIC ACID IN THE MOLD RHIZOPUS NIGRICANS: SYNTHESIS BY DIRECT C2 CONDENSATION. *National Academy of Sciences*, 35(12).
- Foster, J., & Davis, J. B. (1948). Anaerobic formation of fumaric acid by the mold *Rhizopus nigricans*. *s.n*, 56, 329–338.
- Gálvez, D. (2006). *Caracterización molecular de mangos criollos chiapanecos y relaciones genéticas con mangos de otras regiones de México*.
- Gálvez-López, D., Adriano-Anaya, M. L., Mayek-Pérez, N., Villarreal-Treviño, C., & Salvador-Figueroa, M. (2007). Diversidad Isoenzimática de mangos criollos, 13(1), 71–76.
- Gangl, I., Weigand, W., & Keller, F. (1990). Economic comparison of calcium fumarate and sodium fumarate production by *Rhizopus arrhizus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24-25, 663–677.
- Gobernación de Antioquia. (2011). Banco del conocimiento para el desarrollo rural. *Libro zonificación 2011*. Recuperado de <http://antioquia.gov.co/index.php/atlas2>

- IHS. (2010). Fumaric acid. Recuperado de <http://www.ihs.com/products/chemical/planning/ceh/fumaric-acid.aspx?pu=1&rd=chemihs>
- INFOJARDIN. (2012). Mango: *Mangifera indica*. Recuperado de <http://articulos.infojardin.com/Fructales/fichas/mango-mangos.htm>
- Kautola, H., & Linko, Y. (1989). Fumaric acid production from xylose by immobilized *Rhizopus arrhizus* cells. *Appl Microbiol Biotechnol. Applied microbiology and biotechnology*, 31, 448–452.
- Kenealy, W., Zaady, E., Preez, J. C., Stieglitz, B., Goldberg, I., Zaady, E. L., & Preez, J. C. D. (1986). Biochemical Aspects of Fumaric Acid Accumulation by *Rhizopus arrhizus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(1), 128–133.
- Liao, W., Liu, Y., Frear, C., & Chen, S. (2008). Co-production of fumaric acid and chitin from a nitrogen-rich lignocellulosic material - dairy manure - using a pelletized filamentous fungus *Rhizopus oryzae* ATCC 20344. *Bioresource technology*, 99(13), 5859–66.
- Moresi, M., Parente, E., Petruccioli, M., & Federici, F. (1991). Optimization of fumaric acid production from potato flour by *Rhizopus arrhizus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 36, 35–39.
- Osmani, S., & Scrutton, M. (1985). The sub-cellular localization and regulatory properties of pyruvate carboxylase from *Rhizopus arrhizus*. *European Journal Biochemistry*, 147, 119–128.
- Overman, S., & Romano, A. H. (1969). Pyruvate carboxylase of *Rhizopus nigricans* and its role in fumaric acid production. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 37, 457–463.
- PNUD. (2009). Diálogo interministerial sobre el cambio climático. *Programa de las naciones unidas para el desarrollo*. Recuperado de http://www.pnud.org.co/img_upload/61626461626434343535373737353535/CAMBIOClimatico/3.MemoriasDiálogoNacionalInterministerialSobrecambioClimáticoenelSectorAgropecuario/2DocdiscusionAgriculturayMitigacionColombia.pdf
- Pontón, J., Moragues, M., Gené, J., Guarro, J., & Quindós, G. (2002). Hongos y Actinomicetos Alergénicos. *Revista Iberoamericana de Micología*. Recuperado de <http://hongos-alergenicos.reviberoammicol.com/files/038.PDF>

- PPC Geeks. (2011). Mango. Recuperado de <http://www.ppcgeeks.com/2011/05/24/wp7-mango-announced-500-features/>
- PricewaterhouseCoopers. (2011). Crecimiento del sector construcción superará el PIB mundial en diez años. *América Economía*. Recuperado de <http://www.americaeconomia.com/economia-mercados/finanzas/pricewaterhousecoopers-crecimiento-del-sector-construccion-superara-el-pi>
- Quattrocchi, O. A., Abelaira, S. I., & Laba, R. F. (1992). *INTRODUCCIÓN A LA HPLC: Aplicación y Práctica* (p. 405).
- Rhodes, R., Moyer, A., Smith, M., & Kelley, S. (1959). Production of fumaric acid by *Rhizopus arrhizus*. *Applied microbiology*, 7(2), 74–80. Recuperado de <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1057471&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Riscaldati, E., Moresi, M., Federici, F., & Petruccioli, M. (2000). Direct ammonium fumarate production by *Rhizopus arrhizus* under phosphorous limitation. *Biotechnology Letters*, 22, 1043–1047.
- Roa Engel, C. A., Straathof, A. J., Zijlmans, T. W., Van Gulik, W. M., & Van der Wielen, L. A. (2008). Fumaric acid production by fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 78(3), 379–89.
- Romano, A. H., Bright, M. M., & Scott, W. E. (1967). Mechanism of Fumaric Acid Accumulation in *Rhizopus nigricans*. *Journal of Bacteriology*, 93(2).
- Roncal, T., Cadierno, U., & Torrecilla, J. (2010). La biotecnología en el sector químico (II): Nuevas tendencias en la producción industrial de productos químicos básicos. *Ingeniería Química*, (478). Recuperado de <http://www.ingenieriaquimica.es/files/pdf/iq/478/12ARTICULOENE-10.pdf>
- Tutiempo.net. (2012). Tutiempo. *Clima en Medellín / Olaya Herrera*. Recuperado de http://www.tutiempo.net/clima/Medellin_Olaya_Herrera/2012/801100.htm
- UNAL. (2012). Curso: Nuevos desarrollos tecnológicos en manejo poscosecha de productos agrícolas. *UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA*. Recuperado de http://www.ing.unal.edu.co/catedra/2012/index.php?option=com_content&view=article&id=46&Itemid=60

- United Nations. (2005). Crescentia kujete, Calabash, Toumo. *United Nations Conference on Trade and Development*. Recuperado de <http://www.biotrade.org/ResourcesPublications/biotradebrief-crescentiacujete.pdf>
- Universidad de Antioquia. (2012a). Pulpas de frutas tropicales. Recuperado de <http://huitoto.udea.edu.co>
- Universidad de Antioquia. (2012b). Totumo-Crescentia kujete L. Recuperado de <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/ova/?q=node/641>
- University of Connecticut. (2012). Ananas comosus. Recuperado de <http://florawww.eeb.uconn.edu/198500386.html>
- Vasco, O. . (2007). *Producción Biotecnológica de ácido fumárico*. Universidad Pontificia Bolivariana.
- Xu, Q., Li, S., Fu, Y., Tai, C., & Huang, H. (2010). Two-stage utilization of corn straw by *Rhizopus oryzae* for fumaric acid production. *Bioresource technology*, *101*(15), 6262–6264.
- Xu, Q., Li, S., Huang, H., & Wen, J. (2012). Key technologies for the industrial production of fumaric acid by fermentation. *Biotechnology Advances*.
- Zhang, Z., Jin, B., & Kelly, J. (2007). Production of lactic acid and byproducts from waste potato starch by *Rhizopus arrhizus*: role of nitrogen sources. *World Journal of Microbiological Biotechnology*, *23*, 229–236.
- Zhou, Y., Du, J., & Tsao, G. (2002). Comparison of fumaric acid production by *Rhizopus oryzae* using different neutralizing agents. *Bioprocess and Biosystematic Engineering*, *25*, 179–181.