

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



**UNS**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DEL SANTA

**“Efecto de la concentración de fosfato inorgánico y cáscara de *Solanum tuberosum* en la producción de ácido láctico por *Rhizopus oryzae* en cultivo batch”**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO  
EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORES:**

Bach. Blas Pardo, Evelyne Malena

Bach. Dulce Corales, Jackelyn Fiorella

**ASESOR:**

Dr. Castro Alvarado, Ángel Pablo

ORCID:0000-0002-5984-0587

**Nuevo Chimbote – Perú**

**2024**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



**UNS**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DEL SANTA

**“Efecto de la concentración de fosfato inorgánico y cáscara de *Solanum tuberosum* en la producción de ácido láctico por *Rhizopus oryzae* en cultivo batch”**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO  
EN BIOTECNOLOGÍA**

**Revisado y aprobado por el Asesor:**

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Ángel Pablo Castro Alvarado', written over a horizontal line.

Dr. Castro Alvarado, Ángel Pablo  
DNI: 06451148  
ORCID:0000-0002-5984-0587

**Nuevo Chimbote– Perú**  
**2024**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



**UNS**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DEL SANTA

**Revisado y aprobado por el jurado evaluador:**

M.sc. Lecca Zavaleta, Víctor Eduardo  
PRESIDENTE  
DNI:42636735  
ID ORCID: 0000-0002-3759-8128

Ms. Villanueva Carlos, José Manuel  
SECRETARIO  
DNI:32733772  
ID ORCID: 0000-0002-5056-0001

Dr. Castro Alvarado, Ángel Pablo  
INTEGRANTE  
DNI:06451148  
ID ORCID: 0000-0002-5984-0587

**Nuevo Chimbote- Perú**

**2024**

## ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el Auditorio de la Facultad de Ciencias, siendo las 17:00 horas del día 24 de mayo del 2024, dando cumplimiento a la Resolución N° 465-2023-UNS-CFC, se reunió el Jurado Evaluador presidido por el el Ms.C. Víctor Eduardo Lecca Zavaleta, teniendo como miembros al Ms.C. José Manuel Villanueva Carlos (Secretario) y al Dr. Ángel Pablo Castro Alvarado (Integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de **Licenciado en Biotecnología**, realizado por las tesis **Br. Evelyne Malena Blas Pardo** y **Br. Jackelyn Fiorella Dulce Corales**, quienes sustentaron la tesis intitulada: "**Efecto de la concentración de fosfato inorgánico y cáscara de *Solanum tuberosum* en la producción de ácido láctico por *Rhizopus oryzae* en cultivo Batch**".

Terminada la sustentación, la tesista respondió a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como **APROBADA**, asignándole un calificativo de **17 puntos**, según artículo 111° del Reglamento General de Grados y Títulos vigente (Resolución N° 580-2022-CU-R-UNS).


Siendo las 17:40 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad.



Ms.C. Víctor Eduardo Lecca Zavaleta  
Presidente



Ms.C. José Manuel Villanueva Carlos  
Secretario



Dr. Ángel Pablo Castro Alvarado  
Integrante



## Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por **Turnitin**. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Evelyn-jackelyn Blas-dulce  
Título del ejercicio: Quick Submit  
Título de la entrega: 1206024-Efecto de la concentración de fosfato inorgánico y c...  
Nombre del archivo: BLAS\_Y\_DULCE\_11-06-24.docx  
Tamaño del archivo: 4.34M  
Total páginas: 91  
Total de palabras: 14,653  
Total de caracteres: 78,512  
Fecha de entrega: 12-jun.-2024 07:22p. m. (UTC-0500)  
Identificador de la entre... 2401395019

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



"Efecto de la concentración de fosfato inorgánico y cáscara de *Solanum tuberosum* en la producción de ácido láctico por *Rhizopus oryzae* en cultivo batch"

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO  
EN BIOTECNOLOGÍA

**AUTORES:**

Bach. Blas Pardo, Evelyn Malena  
Bach. Dulce Corales, Jackelyn Fiorella

**ASESOR:**

Dr. Castro Alvarado, Ángel Pablo  
ORCID:0000-0002-5984-0587

Nuevo Chimbote – Perú  
2024

# 1206024-Efecto de la concentración de fosfato inorgánico y cáscara de Solanum tuberosum en la producción de ácido láctico por Rhizopus oryzae en cultivo batch

## INFORME DE ORIGINALIDAD

18%

INDICE DE SIMILITUD

17%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://repositorio.uvg.edu.gt">repositorio.uvg.edu.gt</a> Fuente de Internet	2%
2	<a href="http://repositorio.unbosque.edu.co">repositorio.unbosque.edu.co</a> Fuente de Internet	1%
3	<a href="http://revistas.unicordoba.edu.co">revistas.unicordoba.edu.co</a> Fuente de Internet	1%
4	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	1%
5	<a href="http://docplayer.es">docplayer.es</a> Fuente de Internet	1%
6	<a href="http://1library.co">1library.co</a> Fuente de Internet	1%
7	<a href="http://www.scielo.org.co">www.scielo.org.co</a> Fuente de Internet	1%
8	<a href="http://repositorio.ug.edu.ec">repositorio.ug.edu.ec</a> Fuente de Internet	1%

## **DEDICATORIA**

Esta investigación se encuentra dedicada primordialmente a Dios, en reconocimiento de su inspiración y apoyo constante, que nos ha brindado la fortaleza necesaria para perseverar en la búsqueda de uno de nuestros más grandes anhelos.

A nuestras familias, por su amor incondicional, apoyo constante y por ser nuestro refugio en los momentos difíciles.

A nuestros amigos, por su compañía, ánimo y por comprender nuestras ausencias durante este proceso. Su amistad nos ha dado fuerzas para seguir adelante.

A nuestros profesores y mentores de la carrera de Biotecnología, por su sabiduría, guía y paciencia, cada uno de ustedes ha dejado una huella imborrable en nuestra formación académica y personal.

## AGRADECIMIENTO

A nuestro asesor Ángel Castro Alvarado por guiarnos en el desarrollo de la tesis, a los técnicos de laboratorio de la Facultad de Ciencias y a los del Laboratorio del Instituto de Investigación Tecnológico Agroindustrial (IITA) en el Área de Bioprocesos Agroindustriales, en especial a la Ing. Corey e Ing. William.

También agradezco a todos los docentes que nos apoyaron, en especial al profesor Eterio Alva Muñoz, quien tuvo la paciencia de siempre resolver nuestras dudas.

Al Ing. Lenin de la Escuela de Agroindustrial por prestarnos su tiempo y conocimiento desinteresadamente.

Finalmente agradecer a todas las personas que sumaron y aportaron en este trabajo de investigación, gracias a todos ellos, hoy estamos cumpliendo un logro más en nuestra etapa profesional.

## ÍNDICE GENERAL

<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	<b>v</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiv</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	3
1.3. OBJETIVOS .....	3
1.3.1. Objetivo general.....	3
1.3.2. Objetivos específicos .....	4
1.4. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS .....	4
1.5. JUSTIFICACIÓN .....	4
1.6. IMPORTANCIA.....	5
<b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>7</b>
2.1. ANTECEDENTES .....	7
2.2. MARCO CONCEPTUAL .....	8
2.2.1. <i>Rhizopus oryzae</i> .....	8
2.2.2. Vía metabólica de los principales productos de <i>Rhizopus oryzae</i> .....	9
2.2.3. <i>Rhizopus oryzae</i> como productor de ácido láctico.....	11
2.2.4. Cáscara de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> ).....	11
2.2.5. Almidón de papa ( <i>Solanum tuberosum</i> ) .....	14
2.2.6. Fermentación sumergida.....	15

2.2.7. Ácido láctico.....	16
2.2.8. Factores que afectan la productividad del ácido láctico .....	20
2.2.9. Fosfato y su importancia.....	22
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
3.1. MÉTODO DE INVESTIGACIÓN.....	24
3.2. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	24
3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	24
3.4. MATERIAL DE ESTUDIO .....	26
3.4.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	26
3.5. PROCEDIMIENTO.....	26
3.5.1. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA .....	26
3.5.2. MICROORGANISMO Y MEDIO .....	27
3.5.3. CUANTIFICACIÓN DE LA BIOMASA FUNGICA POR PESO SECO.....	28
3.5.4. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO.....	29
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	30
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>31</b>
4.1. RESULTADOS .....	31
4.1.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO EN MINITAB .....	34
4.1.2. MODELO MATEMATICO EN WOLFRAM MATHEMATICA .....	37
4.2. DISCUSIÓN.....	40
<b>V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>48</b>
5.1. CONCLUSIONES .....	49
5.2. RECOMENDACIONES.....	49

<b>VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>
<b>VII. ANEXOS.....</b>	<b>60</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> <i>Vías metabólicas en la fermentación por <i>Rhizopus oryzae</i>.</i> .....	10
<b>Figura 2</b> <i>Alternativas para utilizar el almidón como materia prima para la producción de ácido láctico.</i> .....	15
<b>Figura 3</b> <i>Estructuras del ácido láctico en sus formas D (-) y L (+).</i> .....	17
<b>Figura 4</b> <i>Métodos de producción de ácido láctico.</i> .....	20
<b>Figura 5</b> <i>Estructura de la molécula de ATP.</i> .....	23
<b>Figura 6</b> <i>Gráfico promedio de la cinética de formación de biomasa en 120 horas.</i> .....	31
<b>Figura 7</b> <i>Gráfico promedio de la cinética de formación de producto en 120 horas.</i> .....	32
<b>Figura 8</b> <i>Gráfico promedio de la cinética de consumo de sustrato en 120 horas.</i> .....	32
<b>Figura 9</b> <i>Gráfico promedio de la cinética sustrato, biomasa y producto en 120 horas.</i> .....	33
<b>Figura 10</b> <i>Diagrama de Pareto de efecto estandarizado obtenido en MiniTab</i> .....	37
<b>Figura 11</b> <i>Modelo logístico para biomasa.</i> .....	37
<b>Figura 12</b> <i>Modelo de Luedeking-Piret modificado para sustrato.</i> .....	37
<b>Figura 13</b> <i>Gráfica del modelo logístico ajustado a los datos experimentales.</i> .....	39
<b>Figura 14</b> <i>Gráfica del modelo de Luedeking-Piret modificado ajustado a los datos experimentales.</i> .....	40
<b>Figura 15</b> <i>Curva de calibrado de almidón.</i> .....	63
<b>Figura 16</b> <i>Curva de calibrado de ácido láctico, para la determinación por el método de HPLC.</i> .....	65
<b>Figura 17</b> <i>Promedio del control de pH cada 12 h de los 4 tratamientos hasta las 120 h.</i> .....	67

<b>Figura 18</b> .....	69
<b>Figura 19</b> <i>Cáscara de papa pulverizada después de la molienda y tamizado, lista para la preparación de medio de fermentación.</i> .....	70
<b>Figura 20</b> <i>Cepa de Rhizopus oryzae 4A, donado por Inca Biotec.</i> .....	70
<b>Figura 21</b> <i>Rhizopus oryzae en medio agar PDA.</i> .....	71
<b>Figura 22</b> <i>Cuantificación de esporas en la cámara Neubauer</i> .....	71
<b>Figura 23</b> <i>Solución madre de almidón al 1%.</i> .....	72
<b>Figura 24</b> <i>Preparación de la solución de yodo a 0.1 M.</i> .....	72
<b>Figura 25</b> <i>Serie de soluciones para la curva de calibrado de almidón por el método de yodo.</i>	733
<b>Figura 26</b> <i>Esterilización de los medios de fermentación en autoclave.</i> .....	744
<b>Figura 27</b> <i>Adición de soluciones stock de sales al medio esterilizado.</i> .....	744
<b>Figura 28</b> <i>Inoculación de suspensión de esporas de Rhizopus oryzae a los medios de fermentación.</i> .....	755
<b>Figura 29</b> <i>Incubación de los medios de fermentación a 120 rpm a una temperatura de 30 °C.</i>	755
<b>Figura 30</b> <i>Shock térmico del medio para detener el crecimiento de la biomasa.</i> .....	766
<b>Figura 31</b> <i>Filtración al vacío de la biomasa fúngica con papel Whatman.</i> .....	766
<b>Figura 32</b> <i>Biomasa luego del proceso de lavado, lista para el secado.</i> .....	777
<b>Figura 33</b> <i>Secado de biomasa a temperatura de 105°C por 24 horas en estufa para obtención de peso seco.</i> .....	777
<b>Figura 34</b> <i>Serie de muestras filtradas y centrifugadas listas para los análisis.</i> .....	788

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> <i>Valor nutricional de Solanum tuberosum L.</i> .....	12
<b>Tabla 2</b> <i>Composición química de la cáscara de papa cruda, g 100 g/L.</i> .....	13
<b>Tabla 3</b> <i>Propiedades del ácido láctico.</i> .....	18
<b>Tabla 4</b> <i>Factores y niveles de investigación.</i> .....	25
<b>Tabla 5</b> <i>Matriz de diseño experimental.</i> .....	25
<b>Tabla 6</b> <i>Tabla promedio de parámetros cinéticos obtenidos de la réplica II y replica III.</i> .....	33
<b>Tabla 7</b> <i>Datos ingresados a MiniTab.</i> .....	34
<b>Tabla 8</b> <i>Coefficientes codificados determinadas por MiniTab.</i> .....	35
<b>Tabla 9</b> <i>Resumen del modelo obtenido en MiniTab.</i> .....	35
<b>Tabla 10</b> <i>Análisis de Varianza obtenido en MiniTab.</i> .....	36
<b>Tabla 11</b> <i>Modelo matemático para ácido láctico obtenido en MiniTab.</i> .....	36
<b>Tabla 12</b> <i>Ajustes y diagnósticos para observaciones poco común obtenido en MiniTab.</i> .....	366
<b>Tabla 13</b> <i>R<sup>2</sup> y umaxOpt del crecimiento microbiano en el modelamiento.</i> .....	38
<b>Tabla 14</b> <i>R<sup>2</sup>, αOpt y βOpt del consumo de sustrato en el modelamiento.</i> .....	38
<b>Tabla 15</b> <i>Resultados de la concentración de nitrógeno en cáscara de papa realizada en el Laboratorio “COLEBIC” S.A.C</i> .....	60
<b>Tabla 16</b> <i>Concentración de almidón en 0.1 g de Cáscara de papa.</i> .....	634
<b>Tabla 17</b> <i>Diseño de medio con cáscara de papa pulverizada para 1,6 g/L de Rhizopus oryzae.</i> 64	
<b>Tabla 18</b> <i>Tabla resumen de los resultados de otros ácidos orgánicos (ácido cítrico) en las tres replicas por 120 horas de fermentación por el método de HPLC.</i> .....	667
<b>Tabla 19</b> <i>Tabla resumen del promedio de control del pH de los 4 tratamientos en 120 horas en</i>	

*las tres réplicas. .... 67*

**Tabla 20** *Tabla resumen de resultados de concentración de biomasa, ácido láctico y almidón en la producción de las tres replicas y promedio de réplica dos y tres. .... 68*

## RESUMEN

El ineficiente uso de la cáscara de papa es el punto de partida de esta investigación, ya que este es un residuo orgánico, rico en nutrientes, lo cual puede ser usado como sustrato para la producción de ácido láctico, destacando la relevancia de buscar alternativas sostenibles y económicamente viables en la producción de compuestos químicos de interés industrial.

Por ello el objetivo principal de esta investigación es evaluar el efecto de almidón presente en la cáscara de "*Solanum tuberosum*" y de fosfato inorgánico en la producción de ácido láctico por *Rhizopus oryzae* en cultivo batch, utilizando como sustrato cáscara de papa proveniente de la distribuidora de papas peladas en Nuevo Chimbote. El sustrato fue suplementado con  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ , NaCl,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  y  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ . Durante la fermentación se usó la concentración de cáscara de papa pulverizada (CPP) al 0.34%, y 0.45% y la concentración de fosfato inorgánico (FI) al 0.006% y 0.1%, a 30°C durante 5 días de fermentación con evaluación cada 24 h con valores del pH entre 5.5 y 6. El diseño experimental fue de tipo factorial simétrico  $2^2$  con un diseño completamente aleatorio, en el que se consideró 4 tratamientos con 3 réplicas, obteniendo un total de 12 unidades experimentales. Se obtuvo  $Y_{x/s}$  de 0.0036 g/g,  $Y_{p/s}$  de 0.0016 g/g y un  $Q_p$  de 0.00028 g/h. L. En cuanto a los datos estadísticos podemos decir que no hay diferencias significativas que respalde que la combinación de 0.45% de cáscara de papa y 0.1% de fosfato inorgánico en el medio de fermentación con *Rhizopus oryzae* que resulte mayores concentraciones de ácido láctico en un cultivo en lote.

**Palabras clave:** Ácido láctico, cáscara de papa pulverizada, *Rhizopus oryzae*.

## ABSTRACT

The inefficient use of potato peel is the starting point of this research. It seeks to contribute to the study of its potential as a substrate for the production of lactic acid, highlighting the relevance of seeking sustainable and economically viable alternatives in the production of chemical compounds of industrial interest.

Therefore, the main objective of this research is to evaluate the effect of inorganic phosphate and starch present in the peel of "*Solanum tuberosum*" on the production of lactic acid by *Rhizopus oryzae* in batch culture, using as substrate potato peel from the distributor of peeled potatoes in Nuevo Chimbote. The substrate was supplemented with  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $NaCl$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  and  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ . During fermentation, the concentration of pulverized potato peel (CPP) at 0.34% and 0.45% and the concentration of inorganic phosphate (FI) at 0.006% and 0.1% were controlled at 30°C during 5 days of fermentation with evaluation every 24 h at pH 5.5-6. The experimental design was the  $2^2$  symmetrical factorial experiment in a completely randomized design in which 4 treatments were considered, with 3 replicates, obtaining a total of 12 experimental units. We were obtained  $Y_{x/s} = 0.0036$  g/g,  $Y_{p/s} = 0.0016$  g/g and a  $Q_p$  of 0.00028 g/h. L. Regarding the statistical data, we can say that there are no significant differences that support that the combination of 0.45% potato peel and 0.1% inorganic phosphate in the fermentation medium with *Rhizopus oryzae* of results higher concentrations of lactic acid in a culture in batch.

**Keywords:** Lactic acid, powdered potato peel, *Rhizopus oryzae*

# **I. INTRODUCCIÓN**

## **1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA**

En esta investigación abordaremos cuatro problemáticas importantes, primero la disponibilidad y costo de las materias primas, ya que, dependiendo del método utilizado para producir el ácido láctico, se genera costos elevados de materia prima sobre todo cuando son no renovables como es el caso de la producción industrial de ácido láctico químicamente, que adicionalmente genera contaminación al medio ambiente. Por lo que en esta investigación se ha optado por trabajar con el almidón de la cáscara de papa, que son sustratos fermentables, tales como azúcares y melazas, lo cual afecta significativamente en la viabilidad económica de la producción de ácido láctico, ya que esta tiene una alta demanda (Arias et al.,2009)

Segundo, se producen grandes cantidades de residuos orgánicos de papa, sólidos y líquidos (cáscara y piel), que muchas veces son arrojados indiscriminadamente a los rellenos sanitarios o incluso, fuentes de agua, generando posteriores problemas sanitarios por su descomposición. Los residuos del procesamiento de la papa no son aprovechados de la mejor forma por las industrias, originando desperdicios orgánicos y un mal aprovechamiento de la biomasa y sin ningún procesamiento o tratamiento posterior que le dé un valor agregado a este.

Hoy en día en el Perú se estima un rendimiento promedio de papa de 17.2 toneladas por hectárea, lo que ha generado 110 mil puestos de trabajo, a pesar de la emergencia sanitaria, lo que ha favorecido que el tubérculo esté a disposición de casi 33 millones de consumidores. Además, que es el primer productor de papa en América Latina.

En el año 2022, la exportación de subproductos a base de papa peruana llegó a 6.530 toneladas, con un valor de US\$ 8 millones. La papa peruana ha sido empleada de diferentes formas para el

consumo humano, a través de productos procesados como son los chips de pulpa de colores, papa trozada para pollerías y restaurantes, vodkas, alcohol medicinal, puré, productos de panificación, entre otros (Midagri, 2022).

La aplicación del uso de la papa (Prada, 2010) se destina un 70% al consumo humano. Las empresas procesadoras por su parte, demandan el 6.0% para producir alimentos de consumo humano, el 7.9% para semilla, el 1.9% para alimentación animal (sin procesar), y el 1,6% para el mercado externos.

Tercero, las investigaciones anteriores de la producción de ácido láctico, no abarcan el papel crucial que cumple el fosfato inorgánico en la producción de ácido láctico. Este es esencial para disponer gradientes químicos/bioquímicos en la síntesis de ATP durante la fosforilación a nivel de sustrato y tienen una función principal en el metabolismo celular (Barreto et al., 2012, Canadell et al., 2015). Además, el fosfato inorgánico es el primordial anión intracelular que participa en varias vías metabólicas como la glucólisis y la vía de ésteres (Ribeiro et al., 2021, Udeh y Kgatla, 2013).

Serna et al. (2016) trabajaron con fuente de fósforo con la siguiente combinación: Fósforo (P) -calcio (Ca) con 0.63g, fósforo(P) -aluminio (Al) con 0.67g y fósforo (P) -hierro (Fe) con 0.63g para producir ácidos orgánicos con 5 bacterias, esta investigación estableció que la fuente de fósforo utilizada induce significativamente en la producción de ácidos orgánicos, por lo que sugirieron la disponibilidad de fosforo en los medios.

Podemos concluir con la poca información recolectada que el fosfato es clave para el funcionamiento eficiente en los procesos fermentativos, ya que actúa en diferentes funciones bioquímicas que son primordiales como en la fosforilación de sustratos, la producción de ATP, la

regulación del pH y actúa como parte de coenzimas cruciales para reacciones metabólicas para conservar la actividad microbiana y la calidad del producto final.

Cuarta problemática, para producir ácido láctico por medio de la fermentación utilizando estos residuos orgánicos como fuente de carbono, se necesita escoger a un microorganismo que sea el más adaptable para este tipo de fermentaciones aeróbicas, en este caso se ha afirmado que los hongos de los géneros *Rhizopus*, *Mucor* y *Monilia* son productores de ácido láctico debido a sus características, la cual el hongo más estudiado es el género *Rhizopus*. *Rhizopus oryzae* tiene una resistencia osmótica alta a la acumulación de ácido láctico, resistencia hasta temperaturas de 44°C, tiene pocos requerimientos nutricionales, y necesita poco mantenimiento de pH en comparación con las bacterias ácido lácticas (Vuan ,2018).

Esta información expone los principales problemas como la necesidad de alternativas sostenibles para la fuente de carbono, la deficiencia en el manejo de los residuos de la papa, la falta de inclusión del fosfato inorgánico y el tipo de microorganismo apto para las condiciones en la producción de ácido láctico.

## **1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

¿Qué efecto tiene las concentraciones 0.006% y 0.1% de fosfato inorgánico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y las concentraciones del 0.34 % y 0.45% de cáscara de *Solanum tuberosum* en la producción de ácido láctico usando *Rhizopus oryzae* 4A en cultivo batch?

## **1.3. OBJETIVOS**

### **1.3.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto de la concentración de cáscara de *Solanum tuberosum* y de fosfato inorgánico en la producción de ácido láctico por *Rhizopus oryzae* en cultivo batch.

### 1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar la concentración de almidón con el método de yodo, nitrógeno y fosfato por el método analítico ASAUK 92-ASAPE gravimétrica y volumétrica para la caracterización de la cáscara de *Solanum tuberosum*.
- Determinar las concentraciones de láctico producido de cada una de las unidades experimentales y obtener los parámetros cinéticos  $Y_{x/s}$  (g/g),  $Y_{p/s}$  (g/g),  $Y_{p/x}$  (g/g),  $Q_p$  (g/h. L) y  $Q_x$  (g/h. L).
- Determinar estadísticamente si las variables de cáscara de “*Solanum tuberosum*” y de fosfato inorgánico influyen en la concentración de ácido láctico.
- Evaluar el ajuste de la data experimental por modelos matemáticos para la cinética de formación de biomasa y consumo de sustrato.

### 1.4. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS

La concentración 0.45% de cáscara de *Solanum tuberosum* y de 0.1% de fosfato inorgánico ( $KH_2PO_4$ ) y tiene un efecto de aumento en la concentración de ácido láctico sintetizado por *Rhizopus oryzae* 4A en cultivo batch.

### 1.5. JUSTIFICACION

Esta investigación se hace relevante su ejecución ya que busca dar solución a las cuatro problemáticas importantes previamente mencionadas en la descripción del problema, usando materias primas de bajo costo, sostenibles y viables en la producción de ácido láctico.

El ácido láctico es ampliamente investigado y se produce a nivel industrial; se sabe que uno de los sustratos más utilizados para la producción biotecnológica de ácido láctico es el almidón. Por esta razón se requiere ser selectivos en la selección de la materia prima rica en

almidón para no generar un desbalance en los productos alimenticios y asegurar una sostenibilidad.

Por ello este proyecto de investigación se basa en el uso de la cáscara de papa como materia prima para la producción de ácido láctico y aprovechar su contenido de almidón.

Nos proponemos dar a conocer el potencial de la cáscara de papa como fuente valiosa de carbono, teniéndolo como nuestro principal sustrato fermentable, siendo esta una solución sostenible y económicamente viable en la producción de compuestos químicos de interés industrial. La cáscara de papa, al ser un subproducto abundante y de bajo costo, representa un recurso potencialmente valioso que podría contribuir significativamente a la producción sostenible de ácido láctico.

Así también al dar uso de la cáscara de papa damos la segunda solución al problema de la falta de aprovechamiento adecuado de este residuo orgánico de muy alta producción.

Los productos procesados como papas fritas, chips, croquetas de papas, purés y alimentos congelados representan una generación de residuo causada por el pelado de la papa que oscila entre el 15% y el 40% del peso fresco original, dependiendo del proceso de pelado. Además, las industrias de almidón de papa, harina y conservas también son responsables de la producción de grandes cantidades de residuos de cáscaras cuya eliminación plantea grandes preocupaciones medioambientales. Anualmente, estas industrias producen entre 70 y 140 mil toneladas de cáscaras de papa (PP) en todo el mundo (Sampaio et al., 2020).

## **1.6. IMPORTANCIA**

La importancia para la investigación científica en biotecnología es contribuir al conocimiento del valor agregado que tiene la cáscara de papa al contener almidón que puede ser

usado como fuente de carbono en bioprocesos.

Además, vamos a enriquecer y aportar a las investigaciones respecto al medio fermentativo de la producción de ácido láctico al ingresar como variable dependiente al fosfato inorgánico, exponiendo así sus funciones frecuentemente ignoradas en un medio de fermentación y a nivel celular.

En este contexto, la presente investigación se propone explorar y comprender a fondo el potencial de la cáscara de papa y fosfato inorgánico en el medio fermentativo para la producción de ácido láctico, aportando así a la literatura científica y proporcionando una base sólida para futuras aplicaciones biotecnológicas.

Finalmente se afirma la importancia y el gran valor de esta investigación que nace de darle un valor agregado a este desecho de cáscara de papa que es una gran cantidad de desecho, generada en nuestra ciudad y en todo el país, dando un producto que cubre la necesidad en la industria alimentaria, medica e industrial que son donde más se utiliza el ácido láctico.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. ANTECEDENTES

Ozer y Uyar (2023) utilizaron a *Rhizopus oryzae* (ATCC 9363), para la fermentación con cáscara de papa con concentraciones de 2% y 8% y tamaños de partículas (0–4 mm), con el objetivo principal de producir ácido láctico y etanol, en una fermentación por lotes, con una temperatura de 35°C y con una agitación y 120 rpm, lo cual se obtuvo 3.14 g/L de ácido láctico y 18.83 g/L de etanol.

Así también, Liang et al. (2015) utilizaron como materia prima residuos de cáscara de papa para la producción de ácido láctico, mediante una fermentación anaeróbica en lotes, inoculados con un cultivo mixto indefinido derivado de una planta de aguas residuales municipales, con tiempo de retención de sólidos de 2 a 4 días para optimizar el rendimiento y la productividad. Donde obtuvieron el rendimiento máximo de producción de ácido láctico de 0.25g g/L.

Asimismo, Iníñez y Castillo (2011) produjeron ácido láctico, utilizando 300g de almidón de papa, como materia prima realizando 9 tratamientos en matraces de 500 mL, y agregando 400 mL de la dilución de la bacteria *Lactobacillus Delbrueckii Bulgaricus* (ATCC®7830) a una temperatura de 19°C. Pasado el tiempo de fermentación, se realizó la separación de ácido láctico del inóculo fermentado por medio de la destilación, los cuales se obtuvo como resultado 0.365% de ácido láctico libre.

De igual modo, Zhang et al. (2006) se enfocaron en identificar el papel de las fuentes de nitrógeno y su impacto en la formación de ácido láctico utilizando como sustrato almidón de papa y el hongo *Rhizopus arrhizus*, se suplemento y se evaluó el medio de fermentación con

sulfato de amonio, nitrato de amonio, urea, extracto de levadura y peptona junto con diversas proporciones de carbono a nitrógeno (C:N), los resultados afirmaron que una alta concentración de nitrato de amonio mejora la productividad del ácido láctico. Obteniendo una concentración máxima de ácido láctico de 36.4 g/L.

Por último, Serna et al. (2016) mencionan que la disponibilidad de fósforo en los medios de cultivo, se asocia favorablemente con la producción de ácidos orgánicos como (D-málico, D-láctico, L-málico, L-láctico, acético, cítrico y glucónico) en cada una de las fuentes usadas Fósforo (P) -calcio (Ca) con 0.63g, fósforo(P) -aluminio (Al) con 0.67g y fósforo (P) -hierro (Fe) con 0.63g, los cuales se investigaron en cinco bacterias B1 a B5 y hongos H1 a H5. Las fermentaciones se realizaron durante 7 días. Finalmente, esta investigación estableció que la fuente de fósforo utilizada, induce significativamente en el siguiente orden: P-Ca>P-Al>P-Fe, sobre las variables del crecimiento poblacional de los microorganismos evaluados y la producción de ácidos orgánicos.

## **2.2. MARCO CONCEPTUAL**

### **2.2.1. *Rhizopus oryzae***

*Rhizopus oryzae* es un hongo filamentoso que se clasifica en el orden de *Mucorales* en el filo *Zygomycota*. Puede crecer como forma filamentosa extendida, esferas miceliales, gránulos o grumos; los gránulos son masas esféricas o elipsoidales de hifas que van desde hifas poco compactas hasta cuerpos compactos. El hongo es apto para crecer en un intervalo de temperatura (hasta 40 °C) y en un pH (de 4 a 9), lo que favorece para un comportamiento robusto y la capacidad de diferentes aplicaciones. En el ámbito de aislamiento del hongo, también es favorable ya que está presente en la naturaleza y se encuentra en material orgánico en

descomposición. Además, es capaz de crecer en una amplia gama de fuentes de carbono, por ejemplo, glicerol, etanol, ácido láctico, glucosa, manosa, fructosa, sacarosa, xilosa, celobiosa, ácidos grasos y aceites (Meussen et al., 2020).

El género *Rhizopus* es conocido por la formación de productos de fermentación como etanol, L - (+) - ácido láctico, fumárico y en menor medida, L - (+)-ácido málico. La capacidad de producir ácido fumárico es lo que distingue a este género de *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. También las cepas de *Rhizopus oryzae* se usan normalmente en Asia para la fermentación de alimentos, en especial para fabricar bebidas alcohólicas, como el ragi o tempeh, por lo cual se considera a las cepas generalmente seguras. Sin embargo, *Rhizopus oryzae* también se conoce como un patógeno humano oportunista y tiene una alta prevalencia en infecciones por mucormicosis. La mayoría de los casos de mucormicosis tienen una enfermedad subyacente, como un nivel elevado de hierro sérico, traumatismo o un sistema inmune debilitado (Meussen et al.,2012)

### **2.2.2. Vía metabólica de los principales productos de *Rhizopus oryzae***

*Rhizopus oryzae* es, entre otros, conocido por su capacidad de sintetizar como producto metabólico de forma sostenible a L - (+) - ácido láctico, ácido fumárico y etanol. En el proceso de la glucólisis, las diferentes fuentes de carbono fermentables se metabolizan a piruvato y posteriormente se reparten por las vías que conducen a la formación de estos productos.

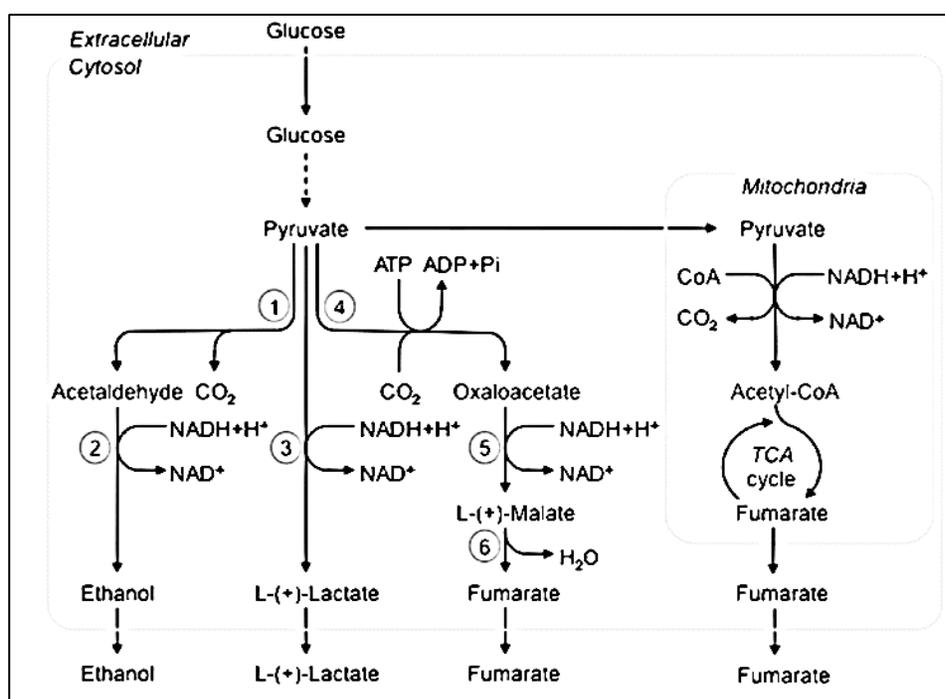
De acuerdo a la fuente de carbono, microorganismo y tipo de fermentación, los rendimientos que se obtienen son superiores al 85% del rendimiento teórico para L - (+) - ácido láctico y etanol y más del 65% para el ácido fumárico.

En *Rhizopus oryzae*, los principales productos de fermentación están vinculadas por la

disponibilidad de piruvato. El piruvato se canaliza posteriormente a una serie de vías, incluidas las vías responsables de la formación de productos finales de fermentación. Esta unión se denomina punto de ramificación de piruvato (Fig. 1). El oxígeno disuelto en el medio influye en el flujo de piruvato desde el punto de ramificación. En condiciones (micro) anaerobias, el flujo de carbono se dirige hacia la formación de etanol, mientras que, en condiciones aeróbicas, con exceso de sustrato de carbono, el flujo se dirige hacia la producción de ácido orgánico (Meussen et al., 2012).

**Figura 1**

*Vías metabólicas en la fermentación por Rhizopus oryzae.*



**Nota.** Las enzimas clave en esta identificadas por números: 1, piruvato descarboxilasa (PDC); 2, alcohol deshidrogenasa (ADH); 3, lactato deshidrogenasa (LDH); 4, piruvato carboxilasa (PYC); 5, malato deshidrogenasa (MDH); 6, fumarasa (FUM) (Skory & Ibrahim,2007).

### **2.2.3. *Rhizopus oryzae* como productor de ácido láctico**

*Rhizopus oryzae*, ha sido ampliamente estudiado como productor comercial de ácido láctico L (+), ya que las características del hongo favorecen y tienen las ventajas como sintetizar solo L (+) - ácido láctico, no requiere altas concentraciones de nitrógeno y nutrientes específicos, y necesita poco mantenimiento del pH, pero a su vez el pH es otro factor clave, ya que influye en la síntesis de ácido láctico en competencia con el etanol y, por lo tanto, requiere un control.

Las diferentes formas morfológicas tendrían un efecto significativo en la reología de la fermentación, en el suministro de oxígeno y en el nivel de producción de ácido láctico. Además, la masa fúngica se puede separar fácilmente del caldo de cultivo al comienzo de la recuperación del proceso, lo que lleva a un proceso de elaboración más barato y fácil.

Varios investigadores intentaron utilizar técnicas de inmovilización para la producción de L (+) - ácido láctico con *Rhizopus oryzae*, con el objetivo que el crecimiento fúngico se de en pequeños gránulos conocidos como pellets, esta morfología favorece el proceso de fermentación industrial porque mejora la reología y la transferencia de masa en el caldo de cultivo en comparación con el crecimiento micelial extendido o grandes grupos. Esos pequeños pellets se pueden utilizar para operaciones continuas utilizando lotes repetidos (Thanapoom et al.,2009).

### **2.2.4. Cáscara de papa (*Solanum tuberosum*)**

*Solanum tuberosum*, es una planta herbácea anual que alcanza un metro de altura y produce el tubérculo, este es un alimento básico que se considera componente de una dieta equilibrada por sus cualidades sensoriales, su sabor y su tono neutro. Por lo cual es el cuarto alimento más consumido en el mundo, por detrás del maíz, el trigo y el arroz (Cruz, 2012).

El tubérculo papa se divide en tres partes principales: la piel, la cáscara y la zona

medular, esta última constituida predominantemente por tejido parenquimatoso, fuente última de almidón y, en consecuencia, de energía. Después de su cosecha los tubérculos contienen en promedio 80% de agua y 20% de materia seca (60% de esta corresponde a almidón). Estas características nutricionales de la papa se muestran en la Tabla 1.

Según la FAO, en promedio 100 gramos de papa contiene:

**Tabla 1**

*Valor nutricional de Solanum tuberosum L.*

Componente	FAO (%)
Calorías (Kcal)	87
Agua	77
Proteína	1.9
Carbohidratos	20.1
Lípidos	0.10
Vitamina C	13
Hierro	0.31
Calcio	5
Fosforo	44

Nota. Tomado de Cruz et al., (2012)

Arapoglou et al. (2009) mencionaron que la cáscara de papa tiene un alto contenido de almidón (52 g por cada 100 g/L de peso seco) lo que hace que sea una buena base para la fermentación. Asimismo, la piel de la papa también contiene una serie de sustancias beneficiosas en la dieta humana, como fenoles, fibras alimentarias, ácidos grasos insaturados, amidas, etc (Schieber & Saldaña, 2009; Wu et al., 2012).

Igor & Ruta (2015) determinaron la composición química de la cáscara de papa en base al peso fresco es decir incluyendo su alto contenido de agua (aproximadamente 84.2%) afirmando que tienen mucha humedad y contenido de carbohidratos, pero en proteínas y lípidos los contenidos son generalmente bajos como se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2**

*Composición química de la cáscara de papa cruda, g 100 g/L.*

<b>Composición</b>	<b>Mínimo y máximo</b>	<b>Contenido Promedio</b>
Agua	83.3-85.1	84.2
Proteína	1.2-2.3	1.8
Total, de lípidos	0.1-0.4	0.3
Total, de carbohidratos	8.7-12.4	10.6
Almidón		7.8
Total, de fibra dietética		2.5
Cenizas	0.9-1.6	1.3

Nota. Tomado de Igor & Ruta (2015)

Los residuos de cáscara de papa generados por las instalaciones de procesamiento tienen un importante valor añadido al poder convertirse en subproductos como el bioetanol para su uso en biocombustibles, esto justifica que contengan suficientes azúcares de almidón, celulosa y hemicelulosa como materia prima para la producción de etanol (Arapoglou et al., 2010).

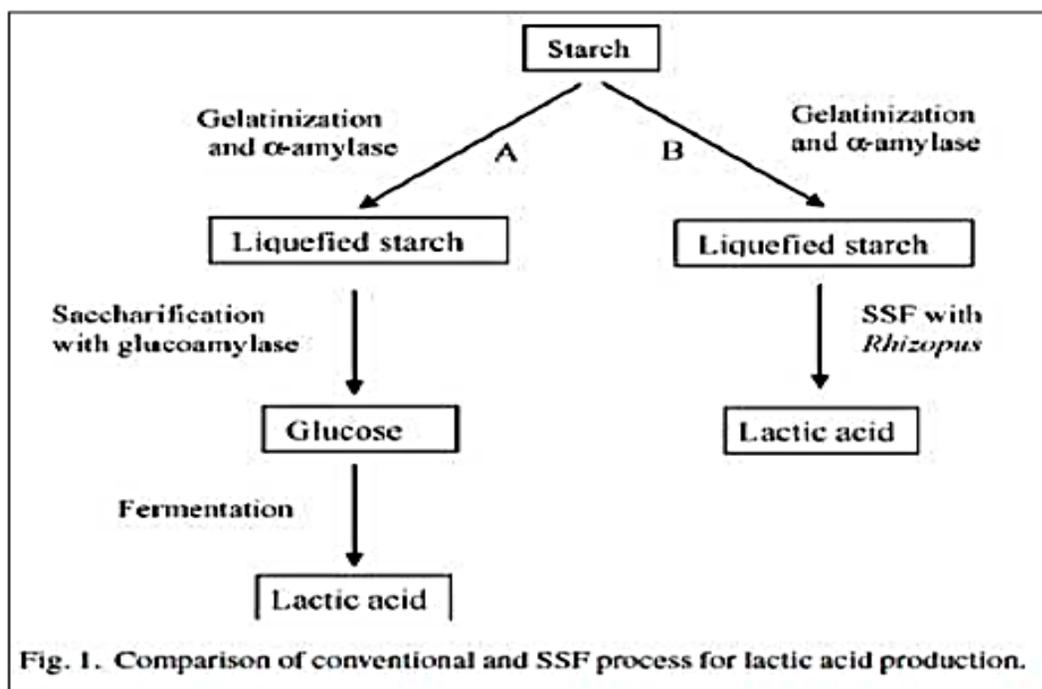
### **2.2.5. Almidón de papa (*Solanum tuberosum*)**

El almidón de papa, posee aplicaciones multifacéticas, primero, mencionar que el almidón de papa se extrae de los tubérculos de *Solanum tuberosum*. Según Ratnayake & Jackson (2003) exponen en su libro que se cultivó por primera vez alrededor del 200 d.C. en Perú. Además, mencionan que el almidón de papa se produce principalmente en Europa. El almidón normalmente se obtiene de papas descartadas, excedentes de papas y flujos de desechos del procesamiento de papas. Sin embargo, existen cultivares especiales desarrollados para la fabricación de almidón. Los tubérculos generalmente contienen entre un 65% y un 80% de almidón (p/p).

Esta información fue punto clave para la elección de nuestra fuente de carbono que es el almidón de papa, que está presente en la cáscara de papa, este sustrato será nuestra fuente principal de carbohidrato para nuestra fermentación. Así también gracias a la investigación de Aguilar (2016), indica que el almidón de papa está compuesto por 20 % de amilosa y 80 % de amilopectina, compuesto fácilmente digeridos por los microorganismos.

Figura 2

Alternativas para utilizar el almidón como materia prima para la producción de ácido láctico.



Nota. Tomado de FODECYT 003-2008

### 2.2.6. Fermentación sumergida

Se denomina así porque es un proceso controlado que involucra el crecimiento de microorganismos en un medio de cultivo totalmente líquido (orgánico o sintético). Este tipo de fermentación es más eficiente debido a una serie de factores, como mantener un medio de crecimiento más estable, cuya homogeneidad beneficia a las fases posteriores de procesamiento, controlando más fácilmente y de manera eficiente los parámetros ambientales como la temperatura, la aireación y el pH, en el microorganismo ya que se puede desarrollar de forma normal, dando lugar a las cuatro fases distintas: latencia, crecimiento (fase logarítmica), fase estacionaria y fase de muerte. Teniendo como consecuencia permitir estandarizar y optimizar la

producción de biomasa y metabolitos de interés (Jackson, 1997; Tavorsky, 1992).

En comparación del cultivo tradicional y de la FES (Fermentación en Estado Sólido), en la fermentación sumergida se pueden separar los metabolitos de interés, tanto de la biomasa como del medio consumido (Bello et al., 2021), obteniendo tiempos cortos de producción, en un espacio más reducido, con un mínimo riesgo de contaminación.

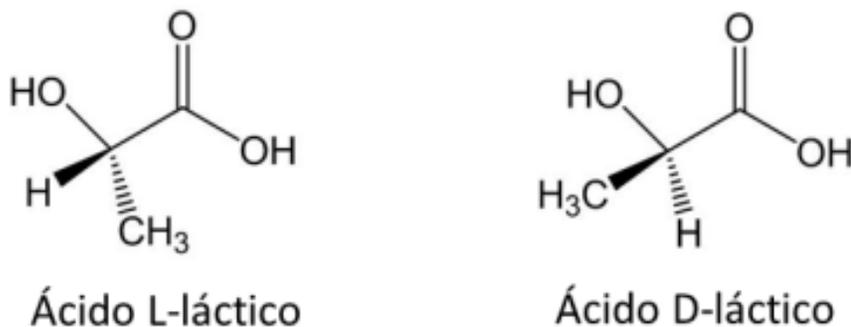
Por ello una de las formas más beneficiosas de producir el ácido láctico es a través de este tipo de fermentaciones sumergidas, utilizando en este caso un *Rhizopus oryzae*, debido a todos los beneficios ya mencionados. En este tipo de fermentación sumergida, cuando hay agitación, los hongos miceliales se comporta en su crecimiento de dos maneras, formando esferas miceliales conocidas como "pellets"; o de lo contrario, se pueden desarrollan en la superficie en forma de filamentos lineales de hifas libremente dispersos. Por ende, se debe tener en cuenta la agitación debido a la forma de crecimiento del hongo, teniendo como objetivo en que puede afectar a la productividad del ácido láctico. Según la entrada y la salida del sustrato y del producto, respectivamente, la fermentación sumergida puede clasificarse a su vez en continua, discontinua o por lote y alimentada (Couto & Sanromán,2006; Fazenda et al.,2008).

### **2.2.7. Ácido láctico**

El ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanoico), es una composición incolora de la fórmula  $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ , moléculas visualmente activas más pequeñas de la naturaleza y se presentan bajo dos formas: la dextrógira D (-) y levógira L (+), normalmente denominadas ácido D láctico y ácido L-láctico (Figura 3) (Sodergard & Stolt, 2002).

**Figura 3**

*Estructuras del ácido láctico en sus formas D (-) y L (+).*



Nota. Tomado de (Sodergard & Stolt ,2022).

En los distintos estudios en los que se evalúan las propiedades de los polímeros del ácido láctico se ha manifestado que tiene la capacidad para diferentes aplicaciones, debido a la probabilidad de modificar las propiedades que se muestran en la tabla N.º 3, dentro de un rango amplio. Estas propiedades hacen que estos polímeros sean prometedores, sobre todo en usos médicos, junto con su demostrada biodegradabilidad y biocompatibilidad (Sodergard & Stolt, 2002).

**Tabla 3***Propiedades del ácido láctico.*

PROPIEDAD	CONCENTRACIÓN	TEMPERATURA	VALOR	UNIT
		PRESIÓN	CUALIDAD	
Estado físico			Aceitoso	
Color			Incoloro	
Olor			inodoro	
Valor pH	A 10 g/L H <sub>2</sub> O	(20°C)	2.8	
Viscosidad Dinámica		(20°C)	20-40	mPa*s
Punto de Fusión			18	°C
Punto de ebullición		(20 hPa)	122	°C
Temperatura de ignición			No combustible	
Punto de inflamación			No inflamable	
Presión de vapor		(20°C)	0.1	hPa
Densidad		(25°C)	1.21	g/cm <sup>3</sup>
Solubilidad en agua		(20°C)	Fácilmente soluble	

Nota. Tomado de (Merck S.A., 2006).

En las diversas aplicaciones del ácido láctico esta es empleada para síntesis orgánica, disolvente de sales cálcicas, laxante en forma de lactato cálcico o lactato magnésico, en el curtido de pieles, en la creación de plásticos biodegradables y agroquímicos, entre otros usos, sobre todo en la industria alimentaria, médica, farmacéutica y cosmética (Gil et al., 2008).

Debido a su amplia gama de aplicaciones en diversas industrias, el ácido láctico es uno de los compuestos químicos con mayor demanda a nivel mundial con una producción de 130 a 150 mil TM toneladas por año (Núñez et al., 2009).

En consecuencia, el interés por la producción biotecnológica de ácido láctico ha aumentado significativamente como resultado de las nuevas tendencias ecológicas.

Dado que se produce a partir de recursos renovables y puede utilizarse como materia prima para crear polímeros biodegradables, ofreciendo una solución a la contaminación provocada por las empresas químicas, por lo que es un proceso rentable si se utilizan materiales de bajo costo y las condiciones de fermentación son óptimas (Araya et al., 2010). Además, los plásticos biodegradables (PLA), tienen una demanda mundial de entre el 14 y el 19% (Gopal et al., 2008).

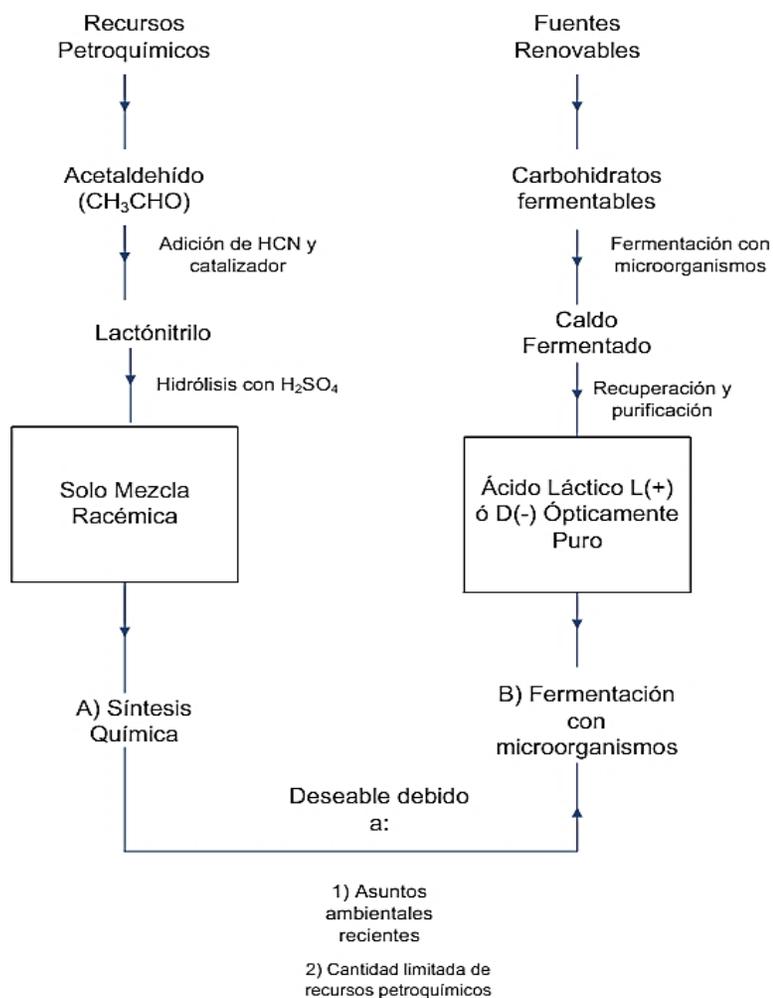
Otro punto a tomar en cuenta del proceso biotecnológico de producción del ácido láctico, es el tipo de carbohidrato a utilizar, ya que parte del proceso necesitará de una etapa que transforme primero las materias primas renovables a sustratos fermentables, etapa que pueden ser por degradación enzimática, química o microbiológica. De los tres se opta por usar un microorganismo para la biotransformación por la adaptación metabólica del microorganismo que sería la mejor elección.

El mejor método de fermentación es el fúngico porque produce ácido láctico con la ventaja de utilizar un medio sencillo, pero también tiene requisitos de aireación elevados, lo que no es un problema para la fermentación a gran escala (Huang et al., 2005).

**Figura 4**

Métodos de  
de ácido

producción  
láctico.



Nota. (a) Síntesis química, (b) fermentación microbiana. (SSF) Sacarificación y fermentación simultánea. Tomado de (Wee et al., 2006).

## 2.2.8. Factores que afectan la productividad del ácido láctico

### 2.2.8.1. Agitación y Aireación

Uno de los factores que afecta en la productividad de ácido láctico, es la agitación y

aireación debido a que gracias a esto el crecimiento morfológico de *Rhizopus oryzae* puede crecer de dos formas, tanto en pellets y crecimiento micelial, ya antes mencionada en este caso el tamaño de los micelios que crece en el medio de fermentación puede incrementar la viscosidad del medio de fermentación, lo que se traduce en una elevada demanda de oxígeno y una resistencia a la transferencia de masa en el desarrollo fermentativo, a la misma vez que aumenta el tiempo de fermentación, también aumenta la producción de subproductos, como consecuencia la formación de otros ácidos orgánicos como el etanol, y disminuye los rendimientos de conversión (Dong et al., 2003), por lo que es importante tener un control en la aireación y agitación que se da al medio.

#### **2.2.8.2. Tipo de sustrato escogido como materia prima**

Otro factor es la deficiencia de concentración de nutrientes presentes en el medio, al no escoger un sustrato o materia prima enriquecida, presenta ciertos problemas, como el mecanismo de transformación del ácido láctico se va afectado negativamente por la relación entre las fuentes de carbono y nitrógeno (relación C/N). Para solucionar este problema la mayoría de las veces, se le añade fuentes de nitrógeno complejas, como extracto de levadura, peptona y extracto de carne, para lograr una relación C/N adecuada, convirtiéndole en un medio definido (Wang et al., 2014).

#### **2.2.8.3. Temperatura y pH**

También en la temperatura y el pH se debe tomar en cuenta un control, ya que el metabolismo del piruvato, que además de producir ácido láctico a través de la enzima piruvato formiato liasa, genera formiato y acetil CoA, cuando se utiliza glucosa como fuente de carbono, al aumentar el pH, la temperatura en el medio se fermentan otros azúcares distintos de la glucosa se da lugar a la fermentación homoláctica dando como resultado la combinación de ácidos

orgánicos (Hofvendahl & Hhan, 2000).

Por último, la alta afinidad del ácido por el agua y a su baja volatilidad, hace que sea difícil la separación, purificación y preconcentración del ácido láctico obtenido de los medios de fermentación. Comúnmente el ácido láctico es recuperado bajo la forma de lactato de calcio. Lo cual la pureza va a depender de cuanto de porcentaje de pureza desean, se definirá los tratamientos a utilizar (Castro et al.,2017).

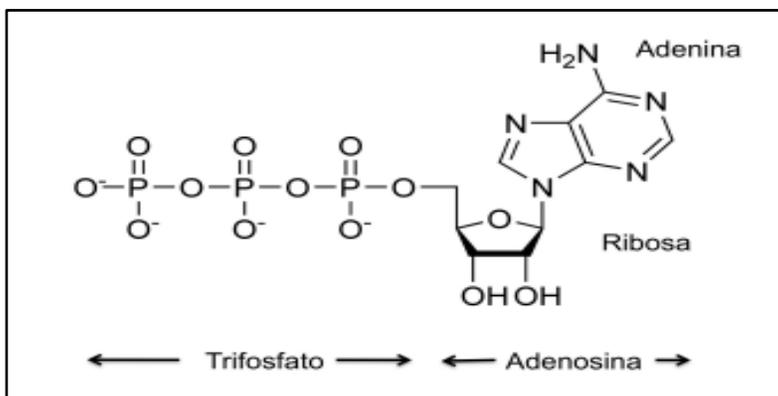
### **2.2.9. Fosfato y su importancia**

Uno de los roles del fosfato en la fermentación es su participación en la síntesis de ATP durante la fosforilación a nivel de sustrato, es importante mencionar que el ATP proporciona energía a las células microbianas durante la fermentación (Hammes & Hertel 2009).

Podemos afirmar que el trifosfato de adenosina (ATP) es necesario para el funcionamiento de todos los seres vivos. Desempeña un papel crucial como mediador fisiológico y realiza diversas tareas en el metabolismo celular como unidad de los ácidos nucleicos (ADN y ARN). También sirve como mensajero intra y extracelular. El papel del ATP en el metabolismo energético de las células, donde se utiliza en reacciones como agente de fosforilación, transporte activo, plegamiento de proteínas, mantenimiento de gradientes iónicos, bioluminiscencia y transducción mecánica a través de cambios conformacionales en las proteínas, destaca como la característica más crucial de la molécula. También sirve como donante de fosfato para la síntesis de otros nucleótidos, es lo que hace que el ATP sea tan importante (Rosas et al.,2010).

**Figura 5**

*Estructura de la molécula de ATP.*



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. MÉTODO DE INVESTIGACIÓN**

La presente investigación es de tipo aplicada, nuestra investigación científica busca generar conocimientos que sean directamente aplicables en la producción de ácido láctico dando una solución y una alternativa como sustrato renovable a la cáscara de papa, ya que está generando un impacto negativo de contaminación. Así también nuestra investigación está clasificada como experimental ya que se tiene que probar la hipótesis formulada y generar evidencia científica sólida sobre las relaciones causa-efecto entre variables, la experimentación se llevó a cabo en condiciones controladas esta detallada para que otros investigadores puedan validar y confirmar los resultados. También entra dentro de los tipos cuantitativo y explicativos ya que se realiza recopilación y análisis de datos, así como busca proporcionar una comprensión profunda de las relaciones entre las variables en un contexto específico.

#### **3.2. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO**

Nuestro trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio del Instituto de Investigación Tecnológico Agroindustrial (IITA) en el Área de Bioprocesos Agroindustriales, en el laboratorio de Investigación de la escuela de Biotecnología y el Laboratorio de Bioquímica y Microbiología de la Facultad de Ciencias en la Universidad Nacional del Santa, en conjunto con el laboratorio de Tecnologías Limpias y/o emergentes de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional de Trujillo.

#### **3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Para esta investigación se realizó diseño de experimento factorial simétrico en un diseño completamente al azar en donde la varianza de respuesta es el ácido láctico y los factores

son: la cáscara de papa pulverizada (CPP) y fosfato inorgánico (FI) cada uno con tres niveles respectivos.

**Tabla 4**

*Factores y niveles de investigación.*

<b>FACTOR</b>	<b>NIVELES</b>	
Cáscara de papa pulverizada (CPP)	0.34%	0.45%
Fosfato inorgánico (FI)	0.006%	0.1%

Nota. Esta tabla muestra los factores y niveles correspondientes para la cáscara de papa pulverizada (CPP) y el fosfato inorgánico (FI).

En la aplicación del experimento factorial simétrico en un diseño completamente al azar se consideró 4 tratamientos, con 3 réplicas, obteniendo un total de 12 unidades experimentales.

**Tabla 5**

*Matriz de diseño experimental.*

Tratamientos	RI		RII		RIII	
	FI	CPP	FI	CPP	FI	CPP
T1	0.006	0.34	0.006	0.34	0.006	0.34
T2	0.006	0.45	0.006	0.45	0.006	0.45
T3	0.1	0.34	0.1	0.34	0.1	0.34
T4	0.1	0.45	0.1	0.45	0.1	0.45

Nota. Donde R (replica) y CPP (cáscara de papa pulverizada) y FI (fosfato inorgánico), T (tratamiento).

### **Factor de respuesta**

Como factor de respuesta se obtuvo el porcentaje de ácido láctico obtenido después de realizar el análisis de las muestras del inóculo sometido al tratamiento de fermentación.

## **3.4. MATERIAL DE ESTUDIO**

### **3.4.1. MATERIAL BIOLÓGICO**

- Cáscara de *Solanum tuberosum*
- Inóculo de *Rhizopus oryzae*

## **3.5. PROCEDIMIENTO**

### **3.5.1. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA**

#### **3.5.1.1. Secado de la materia prima**

La cáscara fue obtenida de la distribuidora “MAX” de papas peladas, ubicada en el distrito de Nuevo Chimbote- Perú, que brindan servicio a las pollerías y restaurantes. La cáscara de papa se desinfectó con hipoclorito de sodio a 100 ppm y se enjuago con agua destilada. Luego se secó durante 9 horas a 80°C con un previo oreado y posteriormente se pulverizó en un molino (Isique & Sing ,2017). Luego de haber sido tamizada, se tomó el peso seco de la muestra y se almacenó en vasos esterilizados con tapa rosca, para posteriormente determinar la concentración de almidón, fosfato, nitrógeno y otros nutrientes presentes.

#### **3.5.1.2. Determinación de almidón con método con yodo**

Para la determinación del porcentaje de almidón en cáscara de papa pulverizada, se usó la metodología de Ixchel al. (2015), primero se estableció una curva de calibración utilizando almidón como estándar, realizando concentraciones conocidas para su lectura en el espectrofotómetro, descrita en el **ANEXO 2**.

Para obtener la concentración de almidón, se pesó 100 mg de materia seca en microtubos de 2 mL en una balanza analítica, agregando 1 mL de agua destilada a la materia seca, mezclando en un Vortex a 6 500 rpm durante un min. Luego la mezcla se hirvió a 100 °C en una cocina eléctrica por un tiempo de 10 min para que se forme la gelatinización del almidón; enseguida fueron centrifugadas a 2 500 rpm durante dos minutos para eliminar los restos de tejido. Del sobrenadante se tomaron 300 µL con una micropipeta, se colocó en un microtubo y se agregaron 900 µL de etanol puro para precipitar el almidón; luego, se centrifugó el microtubo a 10 000 rpm por un tiempo de 5 min y el sobrenadante se eliminó.

Finalmente, el almidón precipitado se resuspendió en 1 mL de agua destilada con agitación vigorosa por 3 min en vortex. A los microtubos se les adicionó 50 µL de solución de yodo y el contenido se colocó en celdillas especiales para leer en espectrofotometría. Estas se introdujeron en el espectrofotómetro y se dio la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 610 nm.

La concentración de almidón en la muestra se calculó usando la lectura de absorbancia de la muestra y el modelo de la curva de calibración de almidón anteriormente descrita.

### **3.5.1.3. Determinación de fosfato, nitrógeno y otros nutrientes**

La determinación de fósforo, potasio, azufre, hierro, magnesio, calcio, sodio, zinc, magnesio, cobre y molibdeno de la materia prima (cáscara de papa pulverizada) se realizó por el Laboratorio de Análisis Químico, ubicado en Jr. Garcilazo de la Vega N°782 en la Ciudad de Chimbote, en base método analítico ASAK 92-ASAPE (gravimetría y volumétrico).

### **3.5.2. MICROORGANISMO Y MEDIO**

La cepa del hongo *Rhizopus oryzae* 4A que fue donado por INCA BIOTEC, se cultivó en

agar PDA en tubos inclinados, y se mantuvo en incubación a 35 °C por cinco días para la formación de esporas.

### **3.5.2.1. Preparación de la suspensión de esporas**

Se usó el método de suspensión con Tween según Toledo (2018) y Cañedo & Ames (2004), primero se preparó la solución 0,01 mL de Tween 80 y se aforó hasta 10 mL con agua destilada y se llevó a esterilizar a 120 °C por 15 min. Pasado los seis días de incubación, las esporas se lavaron del agar con la solución de Tween 80 al 0.01% anteriormente preparado y se recogió como una suspensión de esporas, luego se realizó el conteo de esporas con la cámara de Neubauer en microscopio usando el objetivo 10X, se registró el número de esporas, se obtuvo una suspensión de  $2 \times 10^6$  esporas / mL (Thanapoom et al., 2009) y se mantuvo a 4°C para su mantenimiento.

### **3.5.2.2. Preparación del medio de fermentación**

En matraces de 500 mL se preparó 100 mL de medio de fermentación para los cuatro tratamientos con las variaciones de la concentración de la cáscara de papa pulverizada (0.3472% y 0.45%) y con las variaciones de fosfato inorgánico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) al (al 0.006% y 0.1%). Suplementada con 0.068 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.0035 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0.0003 g/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0003 g/L de NaCl, 0.0002 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.0001 g/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0001 g/L de 0.00005 de  $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.00004 g/L de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y 0.00001 g/L de  $\text{MoO}_3$  para una biomasa de 1,6 g/L, luego los medios se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 min (Saeed et al., 2002).

### **3.5.3. CUANTIFICACIÓN DE LA BIOMASA FUNGICA POR PESO SECO**

La concentración de biomasa se determinó midiendo su peso seco. De cada tratamiento.

Se colocó 5 matraces a fermentar y se evaluó un matraz por día, se pasó a filtrar mediante el equipo de filtración a vacío, a través de un papel Whatman de 0.45 µm previamente pesado. La torta formada se enjuagó 3 veces con agua destilada. Luego, el papel Whatman con la torta de biomasa se secó a una temperatura de 105 °C durante 24 horas. La diferencia de peso con el peso de la membrana seca se obtuvo del peso seco de la biomasa final (Beltrán et al., 2008).

$$P_{sb}=(P_0-P_f) -P_w$$

Donde:

- $P_{sb}$ : Peso Seco de la Biomasa.
- $P_0$ : Peso Inicial.
- $P_f$ : Peso Final.
- $P_w$ : Peso del papel Whatman.

### 3.5.4. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

La suspensión de  $2 \times 10^6$  esporas / mL obtenidos se inoculó en matraces de 500 mL que contienen 100 mL de medio de fermentación. Todos los cultivos se incubaron en un agitador rotatorio a una velocidad de 120 rpm, a 30°C durante 5 días.

Cada 12 horas, el pH se reguló a 5.85 por adición de NaOH al 1 M. La producción del ácido láctico se analizó cada 24 horas (Saeed et al., 2002), modificado.

#### 3.5.4.1. Determinación y cuantificación de ácido láctico por el método de HPLC

Las muestras obtenidas, fueron analizadas en el “**laboratorio de tecnologías limpias y /o emergentes**” de la Facultad de Ingeniería Ambiental en la Universidad Nacional de Trujillo, lo cual se mandó de los 4 tratamientos 1 mL de muestra por cada día de los 5 días de fermentación.

### **3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

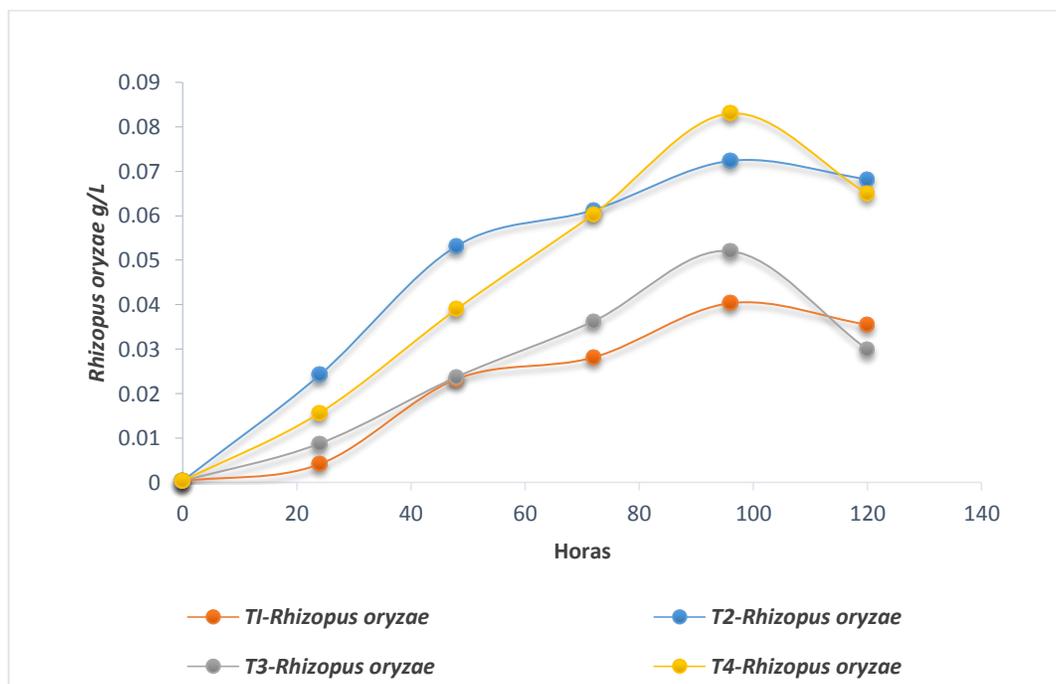
Para los análisis estadísticos la data obtenida se analizó con el programa estadístico MINITAB permitiéndonos realizar pruebas de hipótesis y análisis de varianza logrando comparar medias y evaluar diferencias estadísticas entre grupos, así también nos facilitó el análisis de regresión para modelar y entender las relaciones entre variables. También proporcionó los coeficientes de correlación y diagrama de Pareto.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. RESULTADOS

**Figura 6**

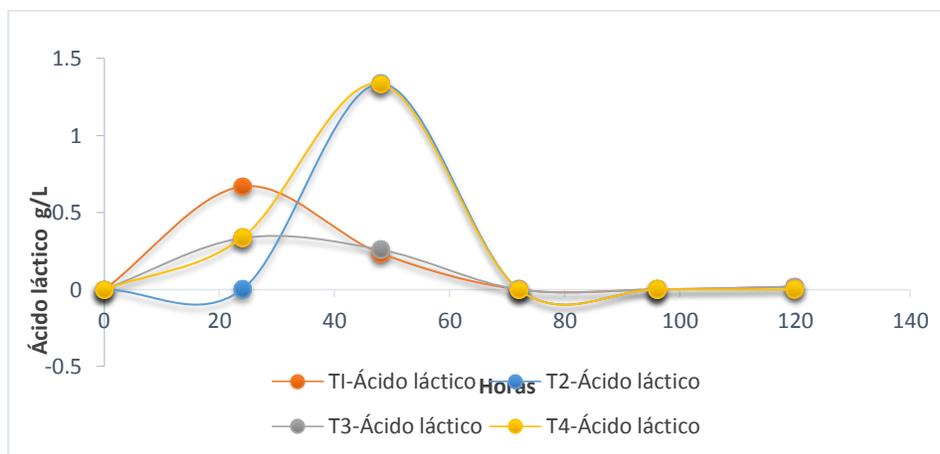
*Gráfico promedio de la cinética de formación de biomasa en 120 horas.*



*Nota.* Esta gráfica muestra el crecimiento promedio de *Rhizopus oryzae* como biomasa en los diferentes tratamientos (**T1** = CPP:0.34%, Fi: 0.006%, **T2** = CPP:0.45%, Fi: 0.006%, **T3** = CPP:0.34%, Fi: 0.1%, **T4** = CPP:0.45%, Fi: 0.1%)

**Figura 7**

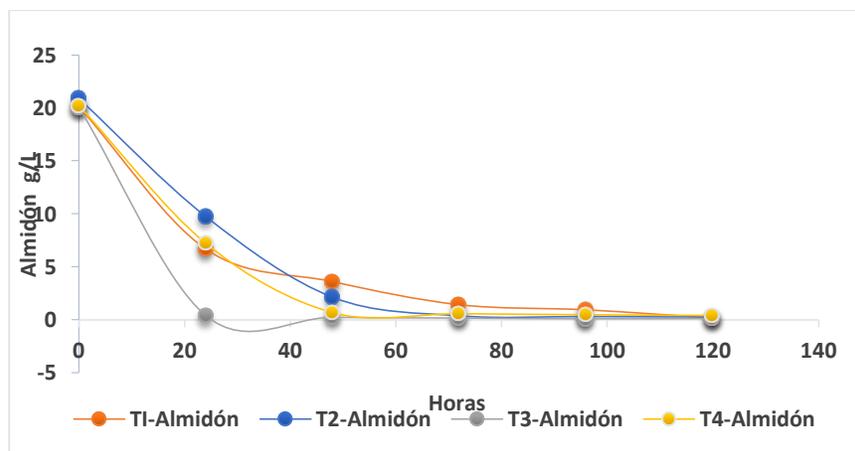
Gráfico promedio de la cinética de formación de producto en 120 horas.



Nota. Esta grafica muestra la producción promedio del ácido láctico como producto en los diferentes tratamientos (**T1** = CPP:0.34%, Fi: 0.006%, **T2** = CPP:0.45%, Fi: 0.006%, **T3**= CPP:0.34%, Fi: 0.1%, **T4** = CPP:0.45%, Fi: 0.1%)

**Figura 8**

Gráfico promedio de la cinética de consumo de sustrato en 120 horas.

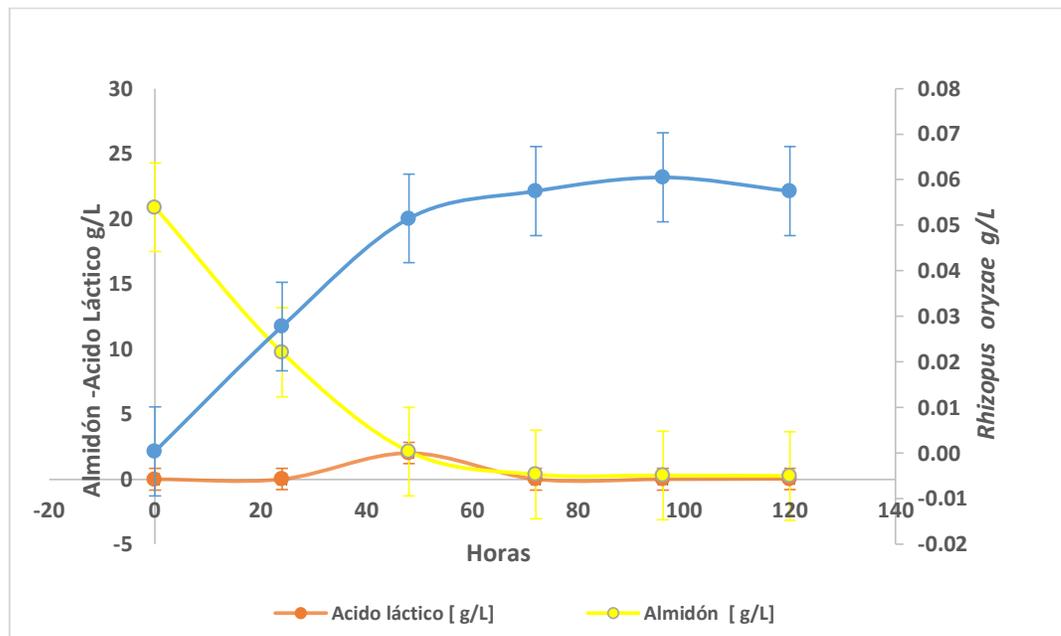


Nota. Esta gráfica promedio de réplica II y replica III muestra la cinética del consumo de almidón presente en la cáscara de papa como sustrato en los diferentes tratamientos (**T1** = CPP:0.34%, Fi: 0.006%, **T2** = CPP:0.45%, Fi: 0.006%, **T3**= CPP:0.34%, Fi: 0.1%, **T4** =

CPP:0.45%, Fi: 0.1%)

**Figura 9**

Gráfico promedio de la cinética sustrato, biomasa y producto en 120 horas.



Nota. Esta grafica muestra la comparación entre la cinética de producción de biomasa (*Rhizopus oryzae*), el consumo de sustrato (almidón de cáscara de papa) y la formación del producto (ácido láctico) del promedio de la réplica II y III en el tratamiento 2 (T2 = CPP:0.45%, Fi: 0.006%).

**Tabla 6**

Tabla promedio de parámetros cinéticos obtenidos de la réplica II y replica III.

RENDIMIENTOS PROMEDIO RII Y RIII					
	Fórmulas	T1	T2	T3	T4
Y x/s (g/g)	$X_f - X_0 / S_0 - S_f$	0.00081	0.00277	0.00159	0.00367
Y p/s (g/g)	$P_f - P_0 / S_0 - S_f$	0.00150	0.00160	0.00139	0.00005
Y p/x(g/g)	$P_f - P_0 / X_f - X_0$	1.85119	0.57897	0.87672	0.01409
Qx (g/h. L)	$X_f - X_0 / T_f - T_0$	0.00013	0.00048	0.00026	0.00061
Qp (g/h. L)	$P_f - P_0 / T_f - T_0$	0.00025	0.00028	0.00023	0.00001

*Nota. (Xf: biomasa final, X0: biomasa inicial, Pf: producto final, P0: producto inicial, Sf: sustrato final, S0: sustrato inicial, Tf: tiempo final y T0: tiempo inicial)*

#### 4.1.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO EN MINITAB

**Tabla 7**

*Datos ingresados a MiniTab.*

<b>Orden</b>	<b>Orden</b>	<b>Punto</b>	<b>Bloques</b>	<b>CCP</b>	<b>FI</b>	<b>Ácido</b>
<b>Est</b>	<b>Corrida</b>	<b>Central</b>				<b>Láctico</b>
1	1	1	1	0.34	0.006	0
2	2	1	1	0.45	0.006	30.3
3	3	1	1	0.34	0.1	0
4	4	1	1	0.45	0.1	0
5	5	1	2	0.34	0.006	2
6	6	1	2	0.45	0.006	4
7	7	1	2	0.34	0.1	1
8	8	1	2	0.45	0.1	4
9	9	1	3	0.34	0.006	0.0079
10	10	1	3	0.45	0.006	0.01
11	11	1	3	0.34	0.1	0.05
12	12	1	3	0.45	0.1	0.01

**Tabla 8***Coefficientes codificados determinadas por MiniTab.*

<b>Término</b>	<b>Efecto</b>	<b>Coef</b>	<b>EE del coef.</b>	<b>Valor T</b>	<b>Valor p</b>	<b>FIV</b>
Constante		3.45	2.47	1.40	0.212	
Bloques						
1		4.13	3.49	1.18	0.282	1.33
2		-0.70	3.49	-0.20	0.848	1.33
CCP	5.88	2.94	2.47	1.19	0.279	1.00
FI	-5.21	-2.60	2.47	-1.06	0.332	1.00
CCP*FI	-4.89	-2.45	2.47	-0.99	0.360	1.00

**Tabla 9***Resumen del modelo obtenido en MiniTab.*

<b>S</b>	<b>R-cuadrado</b>	<b>R-cuadrado(ajustado)</b>	<b>R-cuadrado (pred)</b>
8.54920	46.02%	1.04%	0.00%

**Tabla 10***Análisis de Varianza obtenido en MiniTab.*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Modelo	5	373.88	74.78	1.02	0.479
Bloques	2	117.10	58.55	0.80	0.492
Lineal	2	185.04	92.52	1.27	0.348
CCP	1	103.62	103.62	1.42	0.279
FI	1	81.42	81.42	1.11	0.332
Interacciones de 2 términos	1	71.75	71.75	0.98	0.360
CCP*FI	1	71.75	71.75	0.98	0.360
Error	6	438.53	73.09		
Total	11	812.42			

**Tabla 11***Modelo matemático para ácido láctico obtenido en MiniTab.*

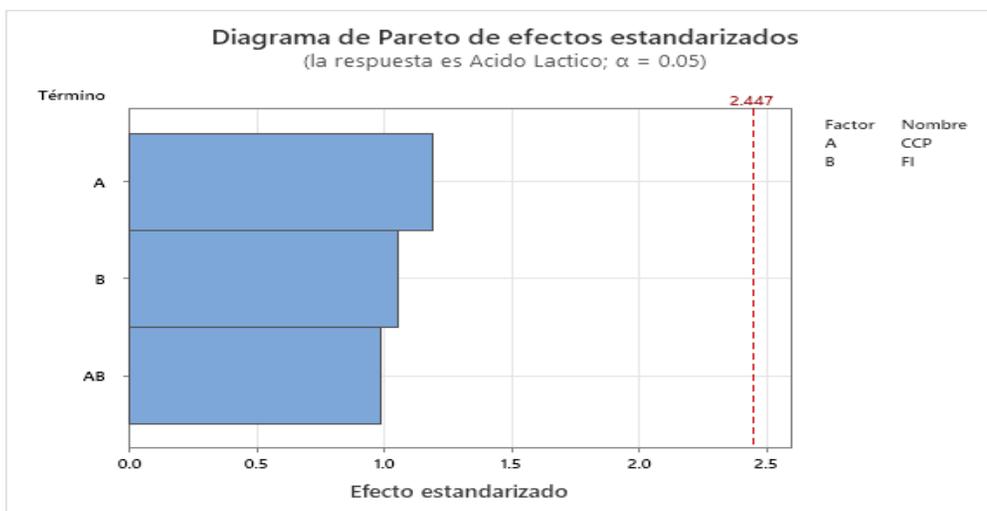
$$\text{Ácido láctico} = -34.5 + 103.6 \text{ CCP} + 318 \text{ FI} - 946 \text{ CCP*FI}$$

**Tabla 12***Ajustes y diagnósticos para observaciones poco común obtenido en MiniTab.*

<b>Obs</b>	<b>Ácido</b>	<b>Ajuste</b>	<b>Resid</b>	<b>Resid est.</b>	
<b>Láctico</b>					
2	30.30	15.56	14.74	2.44	R

**Figura 10**

Diagrama de Pareto de efecto estandarizado obtenido en MiniTab



#### 4.1.2. MODELO MATEMATICO EN WOLFRAM MATHEMATICA

**Figura 11**

Modelo logístico para biomasa

$$X(t) = \frac{X_0 e^{\mu_{\max} t}}{1 - (X_0/X_{\max})(1 - e^{\mu_{\max} t})}$$

Nota. Los valores de  $\mu_{\max}$  y  $X_{\max}$  representan la tasa de crecimiento inicial y la máxima concentración de biomasa, respectivamente. La ecuación integrada, partiendo de una condición inicial  $X_0 = X(t=0)$ , produce una curva en forma de "S" que refleja tanto la fase de crecimiento exponencial como la estacionaria de manera empírica.

**Figura12**

Modelo de Luedekin g-Piret modificado para sustrato.

$$\begin{aligned}
 \text{A)} \quad P(t) &= P_0 + mX_0 \left( \frac{e^{\mu_{\max} t}}{1 - (X_0/X_{\max})(1 - e^{\mu_{\max} t})} - 1 \right) + n \frac{X_{\max}}{\mu_{\max}} \ln[1 - (X_0/X_{\max})(1 - e^{\mu_{\max} t})]. \\
 \text{B)} \quad S(t) &= S_0 - \alpha \left( \frac{X_0 e^{\mu_{\max} t}}{1 - (X_0/X_{\max})(1 - e^{\mu_{\max} t})} - X_0 \right) - \beta \left( \frac{X_{\max}}{\mu_{\max}} \right) \ln[1 - (X_0/X_{\max})(1 - e^{\mu_{\max} t})]
 \end{aligned}$$

*Nota. Donde A) es el modelo de Luedekin g-Piret original y B) es el modelo de Luedekin g-Piret modificado para sustrato. En cuanto  $\mu_{max}$  y  $X_{max}$  representan la tasa de crecimiento inicial y la máxima concentración de biomasa,  $t$  representa al tiempo,  $X_0$  biomasa inicial,  $S_0$  es el sustrato inicial,  $\alpha$  constante asociada al crecimiento celular y  $\beta$  constante no asociada al crecimiento celular.*

**Tabla 13**

*R<sup>2</sup> y  $u_{maxOpt}$  del crecimiento microbiano en el modelamiento.*

Tratamientos	R <sup>2</sup>	$u_{maxOpt} h^{-1}$
T1	0.84	0.05
T2	0.99	0.09
T3	0.98	0.06
T4	0.97	0.05

*Nota. Tabla comparativa del R<sup>2</sup> y  $u_{maxOpt}$  del crecimiento microbiano obtenido el modelamiento en el software Wolfram Mathematica. Donde R<sup>2</sup> es el Coeficiente de determinación y  $u_{maxOpt}$  es la velocidad de crecimiento máximo optimo del crecimiento microbiano.*

**Tabla 14**

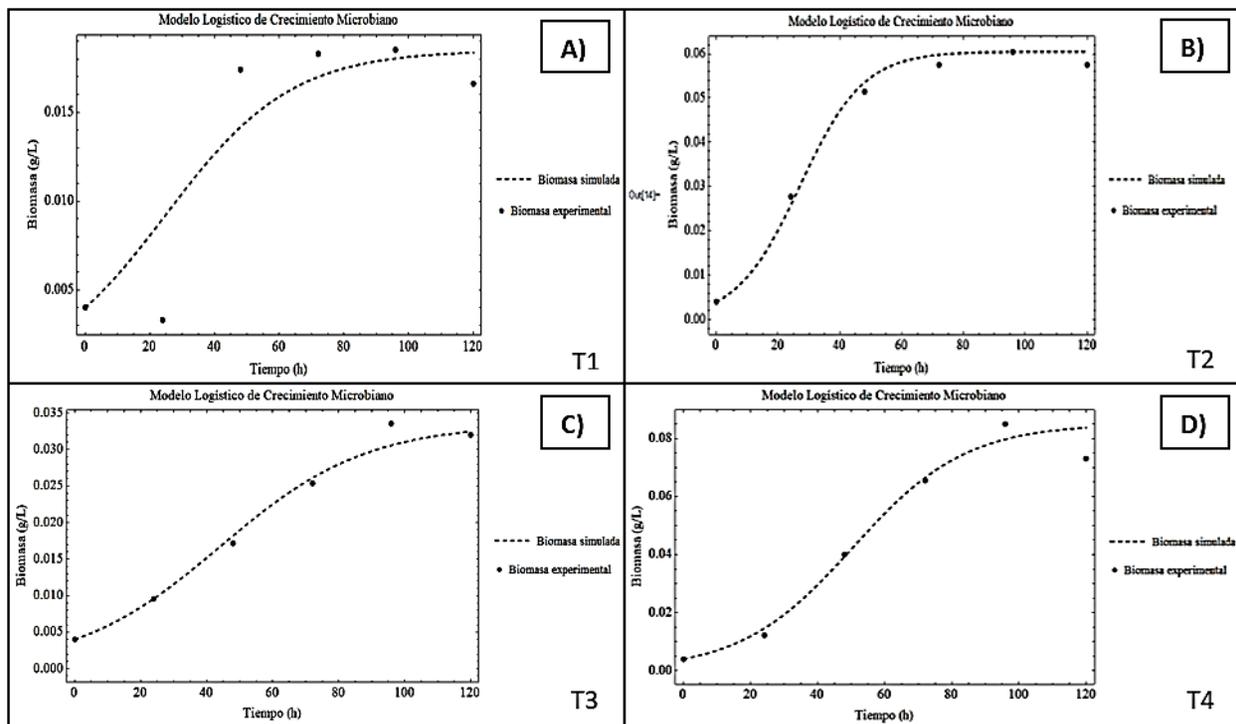
*R<sup>2</sup>,  $\alpha_{Opt}$  y  $\beta_{Opt}$  del consumo de sustrato en el modelamiento.*

Tratamientos	R <sup>2</sup>	$\alpha_{Opt}$ (g . S/g .X)	$\beta_{Opt}$ (g . S/g .X) h
T1	0.97	156.25	83.03
T2	0.99	118.31	28.48
T3	0.99	71.52	123.48
T4	0.99	142.94	57.81

*Nota. Tabla comparativa del R<sup>2</sup>,  $\alpha_{Opt}$  y  $\beta_{Opt}$  del consumo de sustrato obtenido el modelamiento en el software Wolfram Mathematica . Donde R<sup>2</sup> es el Coeficiente de determinación,  $\alpha_{Opt}$  constante asociada al crecimiento celular potimo y  $\beta_{Opt}$  constante no asociada al crecimiento optimo.*

**Figura 13**

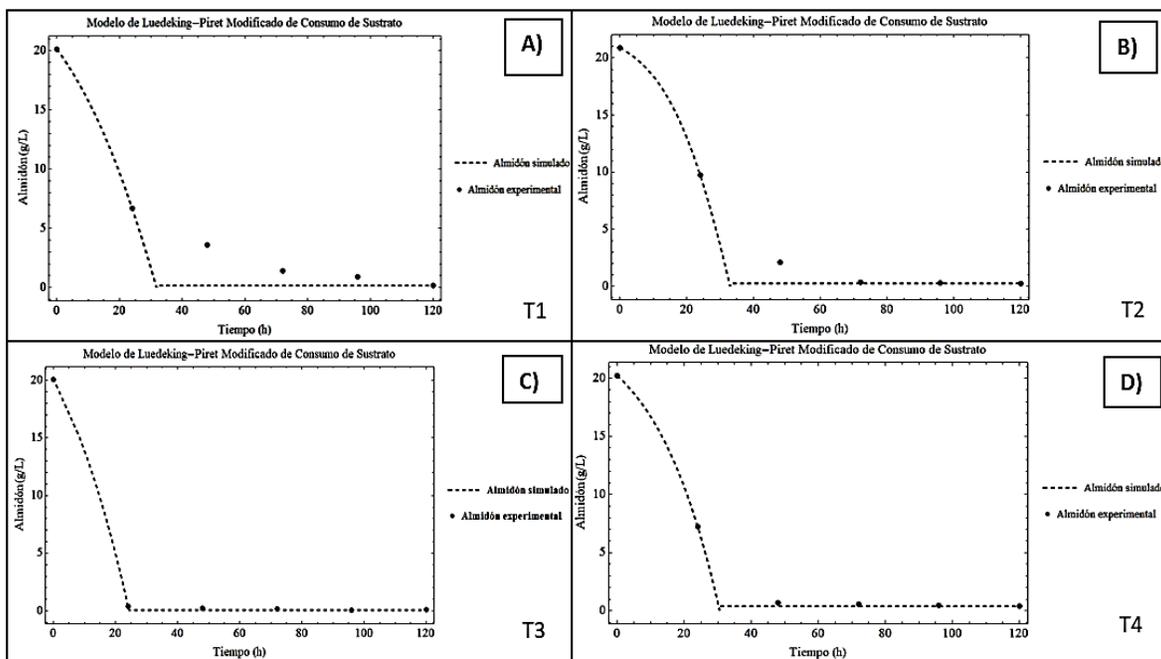
Gráfica del modelo logístico ajustado a los datos experimentales.



**Nota.** Gráfica de la biomasa simulada (--) comparada con la biomasa experimental (.) con el modelo logístico en el software Wolfram Mathematica 10.4 en los 4 tratamientos. Figura A) Biomasa simulada vs. Biomasa experimental del tratamiento 1. Figura B) Biomasa simulada vs. Biomasa experimental del tratamiento 2. Figura C) Biomasa simulada vs. Biomasa experimental del tratamiento 3. Figura D) Biomasa simulada vs. Biomasa experimental del tratamiento 4.

**Figura 14**

Gráfica del modelo de Luedeking-Piret modificado ajustado a los datos experimentales.



Nota. Gráfica del sustrato simulado (--) comparado con el sustrato experimental (.) con el modelo de Luedeking-Piret modificado en el software Wolfram Mathematica 10.4 en los 4 tratamientos. Figura A) Sustrato simulado vs. sustrato experimental del tratamiento 1. Figura B) Sustrato simulado vs. sustrato experimental del tratamiento 2. Figura C) Sustrato simulado vs. sustrato experimental del tratamiento 3. Figura D) Sustrato simulado vs. sustrato experimental del tratamiento 4.

## 4.2. DISCUSIÓN

- Se determinó 37 g de almidón en 100 g de cáscara de papa pulverizada, tal como se observa en la tabla 17. En un estudio similar lograron obtener 46 g en 100 g y menciona que la composición de los residuos de papa puede variar, dependiendo de factores como la variedad de papa, el proceso y las condiciones de almacenamiento (duración, temperatura, humedad, etc.) antes del secado y/o uso (Smerilli et al., 2016). Como

segundo resultado logramos determinar 1.64 mg/L de nitrógeno en 100 g de cáscara pulverizada como se muestra en la tabla 15, dichos resultados no tienen mucha variación con el estudio de Osman, et al. (2019) que lograron determinar 1.61 mg/L de nitrógeno en cáscara de papa. Como último componente a determinar según nuestros objetivos fue el fosfato, logrando determinar 1.77 % como se muestra en la tabla 16 que igualmente no tiene mucha variación con resultados en otros estudios como por ejemplo en el estudio realizado por Jekayinfaet et al. (2015), determinaron 1.8 % de fosfato en cáscara de papa.

- Para el cálculo de nuestros parámetros cinéticos optamos por utilizar solo la réplica dos y réplica tres, teniendo en cuenta que se ingresaron las tres replicas a MiniTab y en los ajustes diagnóstico para observaciones poco común (Tabla 12) nos muestra un valor atípico (outlier) de 30 g/L de ácido láctico y un ajuste de 15.56 g/L de ácido láctico. Según la interpretación de MiniTab la presencia de valores atípicos pueden influir en los resultados del análisis, a menudo se requiere una investigación adicional para comprender por qué se producen y si deben incluirse o excluirse en el análisis estadístico, así también se realizó un balance de materia teórico dicho balance fue planteado teniendo en cuenta las afirmaciones según Mass et al. (2008) que el hongo *Rhizopus oryzae*, convierte el sustrato en condiciones aeróbicas en ácido láctico con subproductos como etanol, dióxido de carbono y biomasa fúngica y muestra una vía metabólica en el que el piruvato formado funciona como sustrato y se desplaza a 3 ramificaciones una al crecimiento fúngico, otra a la fermentación (ácido láctico, etanol + CO<sub>2</sub>) y tercero a la respiración (CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O). Se dio el balance mostrado en el (Anexo 9), con el cual se obtuvo un rendimiento teórico de 0.7 g de ácido láctico por gramo de sustrato consumido y en el rendimiento de la

- réplica 1 del tratamiento 2 fue 233.49 g de ácido láctico producido por gramo de sustrato consumido. Por ende, se comprueba que el rendimiento de la réplica 1 del tratamiento 2 es un valor atípico, ya que este último debe ser menor y/o cercano al rendimiento teórico, por ello se optó por tomar la sugerencia brindada por MiniTab y excluimos la réplica 1.
- Basados en los datos promedio (Tabla 21) se determinó 2 g/L de ácido láctico a las 48 h como mejor concentración producida, resultado mostrado en la Figura 7, se respaldan estos resultados con la investigación de Ozer y Uyar (2023) en la que obtuvieron resultados cercanos a nuestro trabajo de investigación que fue de 2.1 g/L de ácido láctico a partir de cáscara de papa con una tasa de carga de 8 % a las 48 horas de fermentación, con *Rhizopus oryzae* en condiciones similares de fermentación.
  - Como dato adicional se produjo un aspecto relevante en las lecturas de los resultados ya que el hongo *Rhizopus oryzae* produjo ácido cítrico esto se evidencia en la tabla 19, Pagana (2012) reafirma este hecho en su investigación mencionando que algunos hongos filamentosos como *Rhizopus oryzae*, producen ácidos orgánicos como ácido fumárico, ácido láctico, ácido cítrico y en menor medida ácido málico. Papagianni y col (2007) añaden que la producción de ácido cítrico se da en exceso de fuente de carbono, oxígeno disuelto, iones de hidrógeno, elevada concentración de metales traza y de fosfato. Si observamos dichos componentes en la tabla 16 donde se observa la caracterización de la cáscara de papa, contiene los siguientes metales traza: magnesio, zinc, cobre y molibdeno y una concentración de fosfato de 1.77%, estos componentes de gran influencia según se observa ya están presentes en la cáscara; sin embargo en la preparación del medio se adiciono las cantidades mostradas en la tabla 18, este hecho

- pudo influir y considerarse un factor determinante para la producción de ácido cítrico en los resultados.
- Para el modelamiento de nuestros datos experimentales usamos el software Wolfram Mathematic 10.4, donde para la elección de los modelos matemáticos tomamos como referencia los modelos utilizados por An et al. (2017) como el Modelo Logístico para biomasa y el Modelo de Luedeking-Piret modificado para sustrato los cuales se muestran en la Figura 11 y la Figura 12 ya que son los que más se ajustan a nuestros datos experimentales. Se aprecia en la tabla 13 que el tratamientos 2,3 y 4 tienen un buen ajuste en especial el tratamiento 2 que es el que tiene mayor y excelente ajuste con el modelo logístico con coeficiente de determinación de 0.99 relacionado con una velocidad de crecimiento máximo óptimo de  $0.09 \text{ h}^{-1}$ , resultado que está en el rango que obtuvo Groff et al. (2024) con 0.008 a  $0.002 \text{ h}^{-1}$  de velocidad de crecimiento máximo y en coeficiente de determinación de 0.96, los cuales nuestros resultados son aceptables según parámetros establecidos.
  - En cuanto al Modelo de Luedeking-Piret modificado para el consumo sustrato se observa en la tabla 14 que los tratamientos 2, 3 y 4 existe un excelente ajuste mientras que el tratamiento 1 solo tiene un ajuste adecuado según sus coeficientes de determinación, también se observa que en el tratamiento 3 se obtiene el mayor valor de  $\beta_{\text{Opt}}$  de 123.48 (g. S/g .X) h y menor valor de  $\alpha_{\text{Opt}}$  de 71.52 (g. S/g .X) es decir que el consumo de sustrato está más asociado al mantenimiento celular que al crecimiento microbiano. Por el contrario, Ajala et al. (2021) obtiene mayor valor  $\alpha$  que de  $\beta$ , teniendo así que el consumo de sustrato este asociado al crecimiento que al mantenimiento celular. Los gráficos de los

modelos matemáticos ajustados a los datos experimentales se observan en Figura 13 y Figura 14.

- Los resultados de los parámetros cinéticos, son mostrados en Tabla 6 se obtuvo el rendimiento del ácido láctico en relación al sustrato de 0.0016 g/g, lo cual está por debajo de otras investigaciones como Ozer y Uyar (2023) que obtuvieron como resultado un rendimiento de ácido láctico de 0,039 g/g a partir de cáscara de papa con una tasa de carga de 2% y 8% en un medio de fermentación con *Rhizopus oryzae* (ATCC 9363).
- En el rendimiento del producto en relación a la biomasa se obtuvo 1.85 g/g, lo cual ésta fue mayor a las investigaciones de Zhang et al. 2005; Nagarjun et al. 2005; Altaf et al. 2007; Rojan et al. 2009 que en promedio tuvieron como resultado del rendimiento del producto en relación a la biomasa de 0.85 a 0.92 g g/L, a partir de *Rhizopus arrhizus* 36017 y *Rhizopus oryzae* 2062 con una fuente de sustrato de almidón de papa y maíz.
- En la productividad del ácido láctico Zhang et al. 2005 tiene como resultado 13,5 g/ L.h que en comparación con la productividad que obtuvimos de 0.00027 g/L.h de ácido láctico, es demasiado baja.
- Nuestros parámetros cinéticos mostraron bajos resultados en comparación con las demás investigaciones de la producción del ácido láctico. Teniendo en cuenta todos los estudios mencionados en este informe y nuestros resultados obtenidos podemos decir que los rendimientos y productividad se ven directamente influenciados por varios factores como se describe en el marco conceptual, sin embargo consideraremos tres factores en los cuales hemos tenido deficiencias en la parte práctica que influyeron en nuestros resultados tales como la concentración de sustrato , la concentración de oxígeno disuelto

- en el medio y la morfología del hongo.
- En el primer factor detectado que es la concentración de sustrato, se evidencia en Tabla 21 a partir de las 48 h en adelante que la concentración de ácido láctico disminuye y luego tiene ligeros aumentos, Ozer y Uyar (2023) nos ayuda a entender este fenómeno al mencionar que los hongos como *Rhizopus oryzae* consumen los metabolitos producidos por ellos mismos ya que tienen un patrón diferente al utilizar el sustrato brindado, debido a que produjeron DP4+, glucosa, ácido láctico y etanol a partir de cáscara de papa. *Rhizopus* consumió los metabolitos durante la fermentación, primero fue glucosa y DP4+, luego ácido láctico y etanol en su investigación. Durante la fase de crecimiento logarítmico, se producen metabolitos primarios y enzimas, como la amilasa, concentraciones máximas de DP4+ (sacáridos con cuatro o más glucosas) y glucosa, seguidas de la producción de ácido láctico y etanol. La mayoría de las concentraciones de estos productos llegaron a su concentración máxima en las primeras etapas de la fermentación después disminuyeron de manera constante, por ello sugirieron que las concentraciones de ácido láctico y etanol deben controlarse como parámetros del bioproceso y este debe parar cuando sus concentraciones alcanzan su punto máximo.
  - Así también se observa en la Figura 9, la relación directa entre la concentración de sustrato y la producción de ácido láctico ya que a las 48 h el sustrato es consumido en su mayoría. *Rhizopus oryzae* inicia su fase estacionaria y muestra su último pico alto de concentración de ácido láctico esto explica la naturaleza del ácido láctico como metabolito primario es decir que se forma durante la fase exponencial de *Rhizopus oryzae*, por ende, el microorganismo consume la mayoría del sustrato en su fase

exponencial es ahí donde produce la mayor concentración de ácido láctico, por ello se debe considerar la fermentación hasta las 48 h.

- Otro dato a tomar en cuenta en la concentración de almidón es que en nuestra investigación hemos considerado 0.16 g de almidón teórico en 0.45 g/L de cáscara de papa con una suspensión de  $2 \times 10^6$  esporas / mL mientras que Huang et al. (2005) obtuvieron una biomasa de 1,5 a 3,5 g/L, en un medio de cultivo con una concentración de almidón de papa de 20 g/L. Otros investigadores como Naranong & Duangduan (2001) utilizaron un inóculo de menor concentración de esporas, de  $1 \times 10^5$  esporas / mL de *Rhizopus oryzae* con una concentración de almidón de 120 g/L, Esto da a notar dos puntos específicos; demasiada concentración de esporas y baja concentración de almidón utilizada en el medio de cultivo por lo cual podría justificar la bajos rendimientos y productividad obtenida, como se muestra en la Tabla 6.
- Como segundo factor de influencia se tiene la morfología del hongo, esta es una característica de interés en la producción del ácido porque puede influir positivamente como negativamente; los hongos pueden crecer en forma de micelio individual, granular, flóculos y pellets esféricos, por lo que Marták et al. (2003) afirmo que cuando la morfología de *R. arrhizus* cambió de filamentosa a pellets, después de 152 h, decreció la productividad del ácido láctico de 75,3% a 62,6%.  
  
Park et al. (1998); Yu et al. (2007) también afirman que en un cultivo de *R. oryzae* la producción de ácido láctico fue mejorada al ser inducido a la forma micelial. De igual manera, Dong et al. (2003) estudiaron los factores que afectan la morfología y productividad de *R. oryzae* R1021 y determinaron que la forma de pellet exhibe un mayor

- rendimiento de ácido láctico que la forma flocular. En nuestro caso el hongo creció en forma de micelio como se ve en la Figura 29 y figura 32. Concluyendo según Liu, Y. (2005) que el rendimiento y la productividad de los ácidos orgánicos están considerablemente influenciados por la morfología de hongos y que el control de la morfología se convierte en un parámetro crítico en el proceso de fermentación.
- Como tercer factor de influencia se tiene al oxígeno disuelto en el medio ya explicado su importancia en nuestras bases teóricas (2.2.8 Factores que afectan la productividad de ácido láctico: 2.28.1 Agitación y aireación), que hubo deficiencias en nuestro medio de fermentación motivado por revoluciones bajas de 120 rpm y por el micelio algodonoso de *Rizopus oryzae* que limitó la transferencia de masa de oxígeno y nutrientes al microorganismo y la liberación de otros ácidos orgánicos producidos. Esto lo menciona y explica Liu, Y. (2005) donde determina como revolución óptima 170 rpm. Estos factores mencionados no fueron establecidos de manera correcta en la parte práctica por múltiples instancias, conduciendo así a bajos rendimientos y productividades de ácido láctico en la fermentación con *Rhizopus oryzae*.
  - Por último, para determinar el efecto de las variables en la concentración de ácido láctico nos basamos en las interpretaciones estadísticas, según los resultados del análisis de varianza obtenido en MiniTab mostrados en la Tabla 10, ninguno de los factores o interacciones evaluadas muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Sin embargo, en comparación con el estudio de Liu Yan (2005) encontró que la concentración del sustrato (papa), la temperatura de fermentación y la velocidad de agitación eran los factores más significativos que afectaban tanto el rendimiento como la

- concentración de lactato.
- Además de Tanyıldızı, et al., (2012) también muestra importancia con el sustrato (glucosa) en la producción de ácido láctico, podemos decir que la fuente de carbono si tiene una relación directa con la producción de ácido láctico, pero en nuestro caso se puede decir que las concentraciones de nuestras variables de concentración de sustrato son muy bajas y con muy poca diferencia entre ellas por lo que no muestran significancia. En cuanto la concentración de fosfato se puede decir que la no significancia está acorde con la literatura encontrada de Ghaly & Kamal (2004), y Rathi et al., (2002), quienes encontraron de que no hay una respuesta significativa entre los ácidos estimados y el fósforo soluble.
  - Finalmente, evaluamos nuestra hipótesis donde la concentración de 0.1% de fosfato inorgánico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y 0.45% de cáscara de *Solanum tuberosum* (Tratamiento 4) tiene un efecto en la concentración de ácido láctico sintetizado por *Rhizopus oryzae* 4A en cultivo batch, donde se obtuvo 2 g/L al igual que el tratamiento 2 ambos tienen en común la concentración de 0.45 % de cáscara de papa, resultados similares que obtuvieron Ozer y Uyar (2023) con 2.1 g/L de ácido láctico a las 48 horas de fermentación, con *Rhizopus oryzae*. Sin embargo, en base a los análisis estadísticos expuestos podemos decir que no se observaron diferencias significativas en la producción de ácido láctico entre las concentraciones de fosfato inorgánico y cáscara de *Solanum tuberosum* en el cultivo batch con *Rhizopus oryzae* 4A.

## V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. CONCLUSIONES

- Se evaluó el efecto de la concentración de cáscara de “*Solanum tuberosum*” y de fosfato inorgánico en la producción de ácido láctico por *Rhizopus oryzae* en cultivo batch.
- Se obtuvo 37 g de almidón, 0.00164g/L de nitrógeno y 1.77 g de fosfato en 100g de cáscara de *Solanum tuberosum*.
- Se obtuvo 2 g/L de ácido láctico producido por *Rhizopus oryzae*.
- Se obtuvo Y x/s de 0.0036 g/g, Y p/s de 0.0016 g/g y un Qp de 0.00028 g/h. L. Podemos concluir que no hay evidencia estadísticamente significativa para respaldar la afirmación de que la concentración de 0.34% y 0.45% de cáscara de papa y 0.006% y 0.1% de fosfato inorgánico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) en el medio de fermentación con *Rhizopus oryzae* resulta en mejores concentraciones de ácido láctico en un cultivo en lote (batch) en comparación con otras condiciones de medio.

### 5.2. RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar la fermentación en un tiempo máximo de 48 horas, debido a que la producción de ácidos por *Rhizopus oryzae* se da dentro de estas 24 horas.
- El pre- tratamiento de la cáscara de papa es necesario para aprovechar el mayor rendimiento de almidón en la cáscara de papa y la producción de ácido láctico.
- Se recomienda utilizar el número de tamiz 0.5 mm en el tamizado de la cáscara de papa después del proceso de molienda, con el objetivo de obtener un medio homogéneo y poder separar sin dificultad la biomasa del medio.
- Se debe utilizar matraces de 1000 mL con un medio de fermentación de 100 mL para

- facilitar la aireación y el aumento del oxígeno disuelto en el medio generado por los rpm.
- Para el control del pH es necesario usar micropipetas, tips esterilizados y también tiras de pH para disminuir cualquier riesgo de contaminación al medio de fermentación y preparar el hidróxido de sodio cada dos días, el cual se usa para regular el pH.
  - Evidenciando que en este trabajo de investigación se obtuvo ácido láctico, se recomienda poner en consideración para siguientes investigaciones del ácido láctico, igualmente de otros ácidos orgánicos que también fueron cuantificados.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar García, D. (2016). Análisis químico del almidón de papa para la obtención de papel higiénico. *Revista de Ingeniería*, 1(2).
- Ajala, E. O., Ajala, M. A., Onoriemu, O. O., Akinpelu, S. G., & Bamidele, S. H. (2021). Lactic acid production: Utilization of yam peel hydrolysate as a substrate using *Rhizopus oryzae* in kinetic studies. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining : Biofpr*, 15(4), 1031–1045. <https://doi.org/10.1002/bbb.2213>
- Amrane, A. (2000) Effect of inorganic phosphate on lactate production by *Lactobacillus helveticus* grown on supplemented whey permeate. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2 (5). <https://doi.org/10.1002/>
- An, C., Ma, S. J., Chang, F., & Xue, W. J. (2017). Efficient production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* grown on mixtures of potato starch hydrolysate and sucrose. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(1), 180-185. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.11.001
- Arapoglou, D., Varzakas, T., Vlyssides, A., & Israilides, C. (2010) La producción de etanol a partir de piel de patata de residuos. *Gestión de residuos* 30, 1898-1902.
- Arias, M., Henao, L., & Castrillón, Y. (2009). *Producción de ácido láctico por fermentación de mucílago de café con Lactobacillus bulgaricus NRRL-B548*. Dyna. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/2457>
- Barrera, R. (2011). Producción de ácido láctico mediante el uso de *Lactobacillus rhamnosus* a partir de melaza. (Tesis para título Profesional de Ingeniería en Alimentos). Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.
- Bello, J. (2021). Optimización de las condiciones de fermentación líquida en biorreactor para la

- producción de *Lentinula edodes* (Tesis de postgrado). Universidad Nacional de Colombia. Bogota D.C.
- Castro, E. (2017). de Biomasa y productos (Ácido láctico y Ácido lactobionico) por microfiltración. (Tesis de postgrado). Universidad de Oviedo
- Chen, Y., & Nielsen, J. (2016). Biobased organic acids production by metabolically engineered microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*,37:165–172.
- Consejo Nacional De Ciencia y Tecnologia- Concyt-Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnologia-Senacyt-Fondo Nacional de ciencia y tecnologia-fonacyt-universidad del valle de guatemala-uvg- obtencion de acido lactico de la caña de azucar proyecto fodecyt No.003-2008 Carlos Edmundo Rolz Asturias
- Dong-Mei Bai, Min-Ze Jia, Xue-Ming Zhao,Rui Ban, Fei Shen, Xin-Gang Li, Shi-MinXu. 2003. L (+) lactic acid production García - Ácido láctico por vía biotecnológica 20 by pellet-form *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermentor. *Chemical Engineering Science* 58 (3-6): 785-791
- Efremenko, E., Spiricheva, O., Varfolomeyev, S. & Lozinsky,V.(2006). *Rhizopus oryzae* fungus cells producing L (+)-lactic acid: kinetic and metabolic parameters of free and PVA-cryogel-entrapped mycelium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 480–485.10.1007/s00253-005-0297-y
- García, C., & Villalba, M. (2013). Producción de ácido láctico de lactosuero suplementado utilizando *Lactobacillus casei*. *Biotecnología En el Sector Agropecuario y Agroindustrial*.<https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/267/> 468-

- Garcia, C., Arrázola, G., Durango, A. (2010). Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. *Temas agrarios 15* (2). <https://doi.org/10.21897/rta.v15i2.676>
- Gerena, F. (2013) *Obtención de jarabes azucarados a partir de la hidrólisis química de residuos de cáscaras de naranja (Citrus sinensis varvalencia) y papa (Solanum Tuberosum) variedad diacolcapiro (r-12) para ser empleados como edulcorantes en la industria de alimentos* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Abierta y a Distancia “UNAD” Duitama.
- Ghaly, A., & Kamal, M. (2004). Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Res*, 38(3), 631-644.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2003.10.019>
- Gil, R., Domínguez, R., & Pacho, J. (2008). Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja: Procesos de separación y purificación. *Tecnología, Ciencia, Educación*. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48223207>
- Groff, M. C., Noriega, S. E., Gil, R. M., Pantano, N., & Scaglia, G. (2024). Dynamic optimization of lactic acid production from grape stalk solid-state fermentation with *Rhizopus oryzae* applying a variable temperature profile. *Fermentation*, 10(2), 101.  
<https://doi.org/10.3390/fermentation10020101>
- Guo, Y., Yan, Q., Jiang, Z., Teng, C., & Wang, X. (2010). Efficient production of lactic acid from sucrose and corncob hydrolysate by a newly isolated *Rhizopus oryzae* GY18. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37:1137–1143. doi: 10.1007/s10295-010-0761-2.
- Hammes, W. P., & Hertel, C. (2009). Los géneros *Lactobacillus* y *Carnobacterium*. En *Ecología de las bacterias lácticas del tracto gastrointestinal* (Vol. 1, pp. 160-262). Springer.

- Herryman Munilla, M., & Blanco Carracedo, G. (2005). Ácido láctico y poliláctico: Situación actual y tendencias. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, XXXIX (1), 49-59.
- Huang, L., Jin, B., Lant, P., & Zhou, J. (2005). Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*, *Biochemical Engineering Journal*, Volume 23, Issue 3, pages 265-276, ISSN 1369-703X, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.01.009>.
- Igor, S., & Ruta, G. (2015) Industrial potato peel waste application in food production: a review. *Food Sciences*.
- Iniñez, A., & Castillo, A. (2011). *Obtención de ácido láctico a partir de almidón de papa (Solanum Tuberosum)* (Tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana, Sede Cuenca.
- Isique, M. & Sing, J. (2017). *Influencia de la hidrólisis química en las características fisicoquímicas y funcionales de los residuos industriales de papa, camote y yuca* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional del Santa, Nuevo Chimbote-Perú.  
<https://repositorio.uns.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14278/3053/47038.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Liang, S., McDonald, A., Coats, E. (2015). Lactic acid production from potato peel waste by anaerobic sequencing batch fermentation using undefined mixed culture. *Waste Manag*, 45:51-6. doi: 10.1016/j.wasman.2015.02.004. Epub 2015 Feb 21. PMID: 25708409
- Liaud, N., Rosso, MN., & Fabre, N. (2015). L-lactic acid production by *Aspergillus brasiliensis* overexpressing the heterologous *ldha* gene from *Rhizopus oryzae*. *Microb Cell Fact* **14**,

- 66.<https://doi.org/10.1186/s12934-015-0249-x>
- Liu, Y. (2005). Co-production of lactic acid and chitin using a pelletized filamentous *Rhizopus oryzae* culture from cull potatoes. Universidad Estatal De Washington
- Maneeboon, Thanapoom, Vanichsriratana, W., Pomchaitaward, C., & Kitpreechavanich, V. (2009). Optimization of Lactic Acid Production by Pellet-Form *Rhizopus oryzae* in 3-L Airlift Bioreactor Using Response Surface Methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161(1-8):137-146.<https://doi.org/10.1007/s12010-009-8860-0>
- Marcial, J. (2013). Obtención de diferentes productos alimenticios (hamburguesa y embutidos) a partir de residuos orgánicos (cáscaras de papa) (Tesis de pregrado). Universidad de Guayaquil. Guayaquil.
- Maas, R., Springer, J., Eggink, G., & Weusthuis, R. (2008). Xylose metabolism in the fungus *Rhizopus oryzae*: effect of growth and respiration on l (+)-lactic acid production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(6), 569–578.  
<https://doi.org/10.1007/s10295-008-0318-9>
- Meussen, B., Graaff, L., Sanders, J., & Weusthuis, R. (2012). Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae* for the production of platform chemicals. *Appl Microbiol Biotechnol*, 94(4):875–86. [10.1007/s00253-012-4033-0](https://doi.org/10.1007/s00253-012-4033-0)
- Meussen, B., De Graaff, L., Sanders, J., Weusthuis, R. A. Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae* for the production of platform chemicals. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012 May;94(4):875-86. doi: [10.1007/s00253-012-4033-0](https://doi.org/10.1007/s00253-012-4033-0). Epub 2012 Apr 13. PMID: 22526790; PMCID: PMC3339055.

- Ministerio de desarrollo agrario y riego. (2023, mayo). El Perú es el primer productor de papa en América Latina y el sustento de más de 700 mil familias. <https://www.gob.pe/institucion/midagri/noticias/769389-el-peru-es-el-primer-productor-de-papa-en-america-latina-y-el-sustento-de-mas-de-700-mil-familias>
- Núñez, A., Michelena, G., Carrera, E., & Álvarez, X. (2009). Estudios sobre la recuperación y purificación de ácido láctico para la producción de plásticos biodegradables. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120662004>
- Ospina, R. (2010) Alternativa de aprovechamiento eficiente de residuos biodegradables: el caso del almidón residual derivado de la industrialización de la papa. *Revista Escuela de Administración de Negocios*, (72), 182–192. <https://journal.universidadean.edu.co/index.php/Revista/article/view/575>
- Ozer, G., & Uyar, B. Potato (2023). Peel waste fermentation by *Rhizopus oryzae* to produce lactic acid and ethanol. *Food Sci Nutr* ;11(10):5908-5917. doi: 10.1002/fsn3.3670. PMID: 37823114; PMCID: PMC10563687.
- Pagana, I. (2012). Lactic Acid Production Using Sweet Potato Processing Waste (Tesis de maestría). Universidad de Arkansas. Recuperado de <https://scholarworks.uark.edu/etd/439>
- Palacios, A., Cruz, Y., Bell, A., Carrera, E., & Michelena, G. (2009). Síntesis y caracterización del lactato ferroso para la fortificación de alimentos infantiles. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120657007>
- Park, E., Kosakai, Y. y Okabe, M. 1998. Efficient production of L(+)-lactic acid

using mycelial cotton-like flocs of *Rhizopus oryzae* in an air-lift bioreactor.

Biotechnology Progress 14(5): 699-704

Pertuz, S. (2012). La papa (*Solanum Tuberosum L*), Composición química y valor nutricional del tubérculo. *Instituto de Estudios Ambientales IDEA*, 1-5.

Rathi, P., Goswami, V., Sahai, V., & Gupta, R. (2002). Statistical medium optimization and production of a hyperthermostable lipase from *Burkholderia cepacia* in a bioreactor. *J Appl Microbiol*, 93(6), 930-936.

Ratnayake, W. S., & Jackson, D. S. (2003). *Almidón: Fuentes y Procesamiento. Enciclopedia de Ciencias de los Alimentos y Nutrición* (2da ed., 5567-5572). Academic Press.

Reza, M. (2022). What are the consequences of outliers in data analysis? Retrieved from:

[https://www.researchgate.net/post/What\\_are\\_the\\_consequences\\_of\\_outliers\\_in\\_data\\_analysis/623e2e243625990dfb1fc377/citation/download](https://www.researchgate.net/post/What_are_the_consequences_of_outliers_in_data_analysis/623e2e243625990dfb1fc377/citation/download).

Ribeiro, N., Linforth, R., Bora, N., Powell, C., & Fisk, I. (2022). The role of inorganic-phosphate, potassium and magnesium in yeast-flavour formation, *Food Research International*,

Volume 162, Part A, 112044, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112044>.

Rojas, A., Montaña, L., & Bastidas, M. (2015). Producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. *Energías Alternativas y Biomasa*, 44 (3), 5-10.

<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v44n3.55604>

Rojas, C., & Escobar, L. (2008). Producción de *Lactobacillus casei* y determinación de ácido láctico a partir de suero de leche de ganado de vacuno (Tesis para obtener el título de

- Químico). Universidad del Quindío - Armenia.
- Rosas, M., Vázquez, E., Torres, P., & Pérez, G. (2005). De la bioenergética a la bioquímica del ATP. *StudyLib*. <https://studylib.es/doc/5626600/de-la-bioenerg%C3%A9tica-a-la-bioqu%C3%ADmica-del-atp---uam-i>
- Saavedra, S. (2017). *Producción de ácido láctico a partir de Lactobacillus sp aislado de frutos de la Región Loreto* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima -Perú.
- Sampaio SL, Petropoulos SA, Alexopoulos A., Heleno SA, Santos-Buelga C., Barros L., Ferreira ICFR (2020) Tendencias en ciencia y tecnología de los alimentos, 103, págs. 118-129.
- Serna, E., Sánchez, M., Cisneros, C. (2016). Producción de ácidos orgánicos por microorganismos rizosféricos aislados de un Typic Melanudands y sus efectos en la solubilización de fosfatos inorgánicos. *Acta Agronomica*, vol. 66, no. 2, pp. 241-247, 2017. <https://doi.org/10.15446/acag.v66n2.56148>
- Smerilli, M., Neureiter, M., Haas, C., Frühauf, S., & Fuchs, W. (2016). Valorization of Potato-processing Residues for the Production of Lactic Acid. University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, 3430 Tulln, Austria. doi: 10.15255/CABEQ.2015.2332
- Skory, C., & Ibrahim, A. (2007) Native and modified lactate dehydrogenase expression in a fumaric acid producing isolate *Rhizopus oryzae* 99-880. *Curr Genet*, 52:23–33. [10.1007/s00294-007-0135-0](https://doi.org/10.1007/s00294-007-0135-0)
- Tanyıldızı, M. Ş., Bulut, Ş., Selen, V., & Özer, D. (2012). Optimization of lactic acid production with immobilized *Rhizopus oryzae*. *African Journal of Biotechnology*, 11(34), 8546-8552. Retrieved from <http://www.academicjournals.org/AJB>

- Tejeda, R. (2015). Obtención de ácido láctico por fermentación de almidón de ñame espino mediante *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* Y *L. Streptococcus thermophilus* para su uso en la producción de ácido poliláctico (Tesis para título de magíster en ciencia y tecnología de alimentos). Convenio Universidad de Cartagena – Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.
- Vuan (2018). Tendencias de producción de ácido láctico a partir de recursos renovables. Tesis para el título de licenciada en Biotecnología. Universidad ORT Uruguay
- Yin, F., Sun, X., Zheng, W., Yin, L., Luo, X., Zhang, Y., Wang, Y., & Fu, Y. (2023). Development of a Strategy for L-Lactic Acid Production by *Rhizopus oryzae* Using *Zizania latifolia* Waste and Cane Molasses as Carbon Sources. *Molecules*;28(17):6234. <https://doi.org/10.3390/molecules28176234>
- Yu MC, Wang RC, Wang CY, Duan KJ, Sheu DC. 2007. Enhanced production of L(+)-lactic acid by flocc-form culture of *Rhizopus oryzae*. *J. Chinese Inst. Chem. Eng.* 38: 223-228.
- Zhang, Z., Jin, B. & Kelly, J. (2006). Producción de ácido láctico y subproductos a partir de residuos de almidón de patata por *Rhizopus arrhizus*: papel de las fuentes de nitrógeno. *Mundo J Microbiol Biotechnol* 23, 229–236. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9218-1>

## VII. ANEXOS

## ANEXO 1

## RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

## Figura

Resultados de la concentración de nitrógeno total en cáscara de papa realizada en el Laboratorio

“COLEBIC” S.A.C



CORPORACIÓN DE LABORATORIOS DE ENSAYOS  
CLÍNICOS, BIOLÓGICOS E INDUSTRIALES

“COLEBIC” S.A.C.

REGISTRADO EN LA DIRECCIÓN GENERAL DE POLÍTICAS Y DESARROLLO PESQUERO - PRODUCE

INFORME DE ENSAYO N° 20180605-004

Pág 1 de 1

SOLICITADO POR : DULCE CORALES JACKELYN FIORELLA.  
DIRECCION : 2 de Mayo Mz. I Lote 3 Santa Rosa Nuevo Chimbote.  
PRODUCTO DECLARADO : CÁSCARA DE PAPA MOLIDA PULVERIZADA.  
CANTIDAD DE MUESTRA : 01 muestra.  
PRESENTACIÓN DE LA MUESTRA : En bolsa de polietileno cerrada.  
FECHA DE RECEPCIÓN : 2018-06-05  
FECHA DE INICIO DEL ENSAYO : 2018-06-05  
FECHA DE TÉRMINO DEL ENSAYO : 2018-06-05  
CONDICIÓN DE LA MUESTRA : En buen estado.  
ENSAYOS REALIZADOS EN : Laboratorio Físico Químico.  
CODIGO COLEBIC : SS 180605-4

**RESULTADOS**

ENSAYOS	MUESTRA
Nitrógeno (mg/L)	S/N 1,64

**METODOLOGIA EMPLEADA**

Nitrógeno: UNE-EN ISO 5983-2 Parte 2 Dic. 2006.

**NOTA:**

- Muestra recepcionada en Laboratorios COLEBIC S.A.C.
- Informe de ensayo emitido en base a resultados realizados por COLEBIC S.A.C.
- Los resultados presentados corresponden sólo a la muestra ensayada.
- Estos resultados de ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce.

Fecha de Emisión: Nuevo Chimbote, Junio 06 del 2018.

GVR/ms

A. Gustavo Vargas Ramos  
Gerente de Laboratorios  
C.B.P. 326  
COLEBIC S.A.C.

LC-MP-HRIE  
Rev. 04  
Fecha 2015-11-30

PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL DE ESTE INFORME  
SIN LA AUTORIZACIÓN ESCRITA DE COLEBIC S.A.C.

Urb. Buenos Aires Mz. A - Lt. 7 - 1 Etapa - Nuevo Chimbote - Telefax: 043-310752  
Nextel: 839\*2893 - RPM # 902995 - Apartado 127  
e-mail: colecibi@speedy.com.pe/ medioambiente\_colecibi@speedy.com.pe  
Web: www.colecibi.com

**Tabla 15**

*Resultados de las concentraciones de todos los nutrientes que se encuentran en la cáscara de papa con el método analítico ASAUK 92-ASAPE.*

<b>MUESTRA</b>	<b>ANÁLISIS</b>	<b>RESULTADOS</b>
Humedad	H <sub>2</sub> O	5.8 %
Potencial de Hidrogeno	PH	6.2
Fosfato	P	1.77%
Potasio	K	1.08%
Magnesio	Mg	1.11%
Azufre	S	1.02%
Hierro	Fe	0.015%
Calcio	Ca	0.75%
Sodio	Na	0.077%
Zinc	Zn	0.47%
Manganeso	Mn	0.03%
Cobre	Cu	0.024%
Molibdeno	Mo	0.124%

## ANEXO 2

### CURVA PATRÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ALMIDÓN

- A. Solución de Almidón:** Se agrego (1.0g) de almidón en 50 cm<sup>3</sup> de agua a 70°C, seguidamente se mezcló y se aforo con 100 cm<sup>3</sup>de agua destilada.
- B. solución de yodo:** Para la solución de yodo a 0.1M, se midió 3,0 g de yoduro de potasio (KI) en un vaso de precipitado de 100 mL. Se humedeció el yoduro de potasio con unas gotas de agua. Luego se pesó 2.54 g de yodo y se agregó al yoduro de potasio humedecido. Por último, se adiciono un poco de agua, mezclando bien, se pasó a una fiola y se aforó a 100 cm<sup>3</sup>. Luego se pasó a continuar los siguientes pasos:
1. Se usó una pipeta graduada para medir 0.5 cm<sup>3</sup>, 1 cm<sup>3</sup>, 2 cm<sup>3</sup>,3 cm<sup>3</sup>,5 cm<sup>3</sup>,7 cm<sup>3</sup> y 10 cm<sup>3</sup> de la solución de almidón al 1% en una serie de tubos de ensayo.
  2. Se agregó a cada tubo con pipeta limpia, agua destilada hasta completar los 10 cm<sup>3</sup>.
  3. Se colocó 10 cm<sup>3</sup> de agua en un tubo de ensayo para el blanco.
  4. Agregó una gota de solución de yodo a cada tubo y se mezcló bien.
  5. Luego se hizo una lectura de absorbancia a 610nm.

## ANEXO 3

## DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ALMIDÓN EN CÁSCARA DE PAPA

Figura 15

*Curva de calibrado de almidón.*

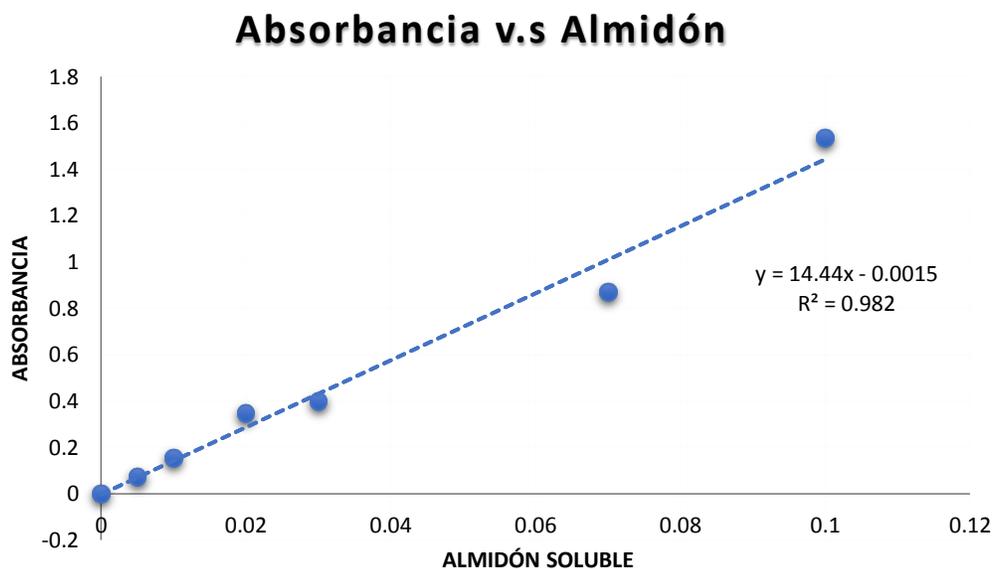


Tabla 16

*Concentración de almidón en 0.1 g de Cáscara de papa.*

<b>CUANTIFICACIÓN DE ALMIDÓN EN CÁSCARA DE PAPA</b>	
CPP (cáscara de papa)	0.1 g
Absorbancia	0.295
[ ] Almidón	0.03722g

## ANEXO 4

## DISEÑO DE MEDIO

Tabla 17

*Diseño de medio con cáscara de papa pulverizada para 1,6 g/L de Rhizopus oryzae.*

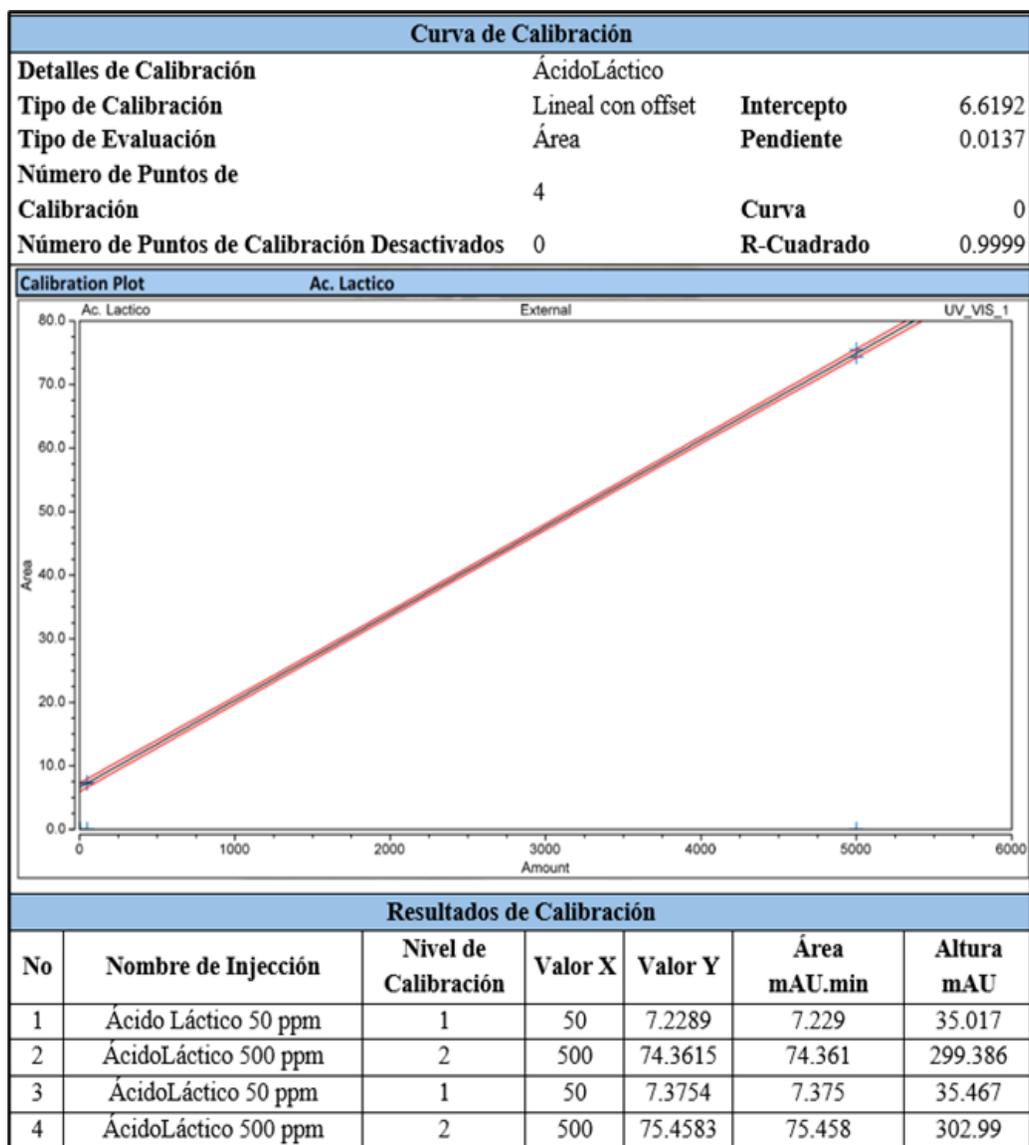
Elemento Ei	Nutriente	100mL S0(g/mL)
C	$C_6H_{10}O_5$	0.347
N	$(NH_4)_2SO_4$	0.069
P	$KH_2PO_4$	0.006
S	$(NH_4)_2SO_4$	0.0014
K	$kH_2PO_4$	0.0012
Na	NaCl	0.0018
Ca	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.0003
Mg	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0036
Fe	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0002
Zn	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0003
Mn	$MnCl_2 \cdot 6H_2O$	5.00E-05
Co	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	4.00E-05
Mo	$MoO_3$	1.00E-05

## ANEXO 5

## CURVA DE CALIBRADO DEL ÁCIDO LÁCTICO

Figura 16

Curva de calibrado de ácido láctico, para la determinación por el método de HPLC.



## ANEXO 6

## OTROS ÁCIDOS ORGÁNICOS PRODUCIDO

Tabla 18

Tabla resumen de los resultados de otros ácidos orgánicos (ácido cítrico) en las tres replicas por 120 horas de fermentación por el método de HPLC.

PRODUCCIÓN DE OTROS ACIDOS ORGANICOS : ACIDO CITRICO g/L				
TRATAMIENTO	HORAS	RI	RII	RIII
T1	0	0	0	0
	24	0	<b>0.79</b>	0
	48	0	<b>0.37</b>	0
	72	0	0	0
	96	0	0	0
	120	0	0	0
T2	0	0	0	0
	24	0	0	0
	48	0	<b>0.31</b>	0
	72	0	0	0
	96	0	0	0
	120	0	0	0
T3	0	0	0	0
	24	0	<b>0.28</b>	0
	48	0	<b>0.11</b>	0
	72	0	0	0
	96	0	0	0
	120	0	0	0
T4	0	0	0	0
	24	0	<b>0.27</b>	0
	48	0	0	0
	72	0	0	0
	96	0	0	0
	120	<b>0.12</b>	0	0

## ANEXO 7

## PROMEDIO DE CONTROL DEL PH DE LOS 4 TRATAMIENTOS

Figura 17

Promedio del control de pH cada 12 h de los 4 tratamientos hasta las 120 h.

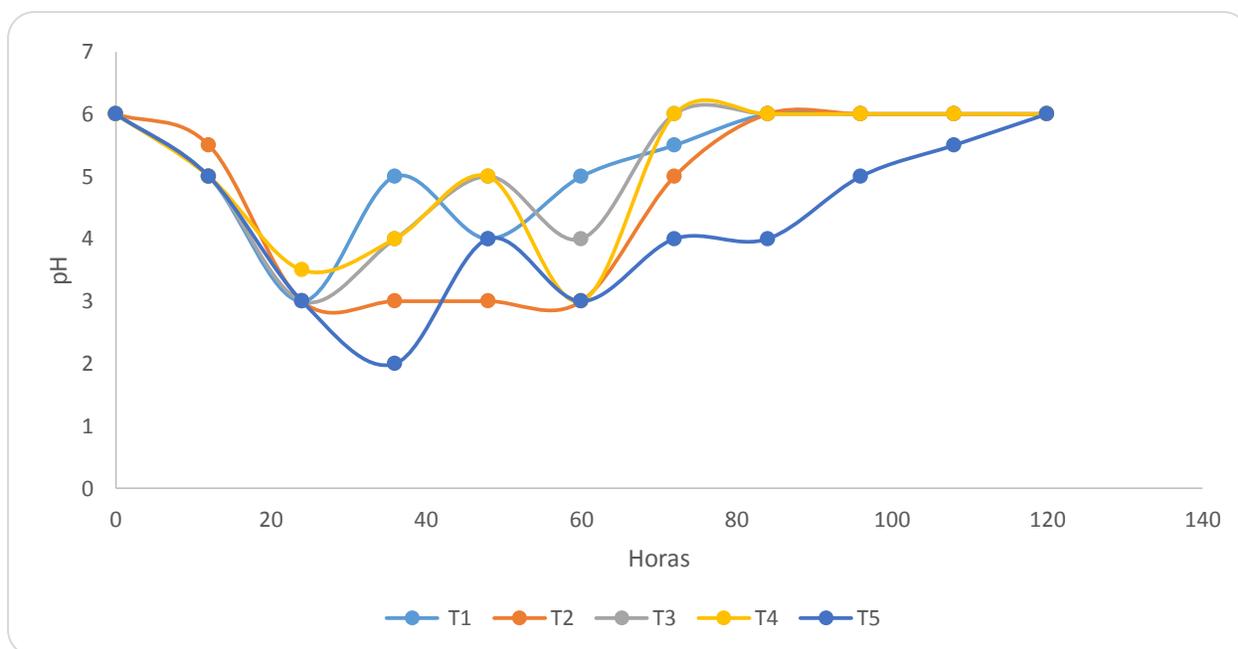


Tabla 19

Tabla resumen del promedio de control del pH de los 4 tratamientos en 120 horas en las tres réplicas.

TRATAMIENTOS	RI	RII	RIII
T1	5.14	5.22	5
T2	4.68	4.72	4.77
T3	5.12	5.18	5.18
T4	5.17	5.14	5.13

## ANEXO 8

## RESULTADOS DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LACTICO

Tabla 20

Tabla resumen de resultados de concentración de biomasa , ácido láctico y almidón en la producción de las tres replicas y promedio de réplica dos y tres.

TRATAMIENTOS	HORAS	REPLICA I			REPLICA II			REPLICA III			PROMEDIO RII Y RIII		
		X [ g/L]	P [ g/L]	S [ g/L]	X [ g/L]	P [ g/L]	S [ g/L]	X [ g/L]	P [ g/L]	S [ g/L]	X [ g/L]	P [ g/L]	S [ g/L]
T1	0	0.0004	0	0.0708	0.0004	0	20.533	0.00038	0	19.7	<b>0.0004</b>	<b>0</b>	<b>20.118</b>
	24	0.0059	0	0.3051	0.0034	2	7.0291	0.0032	0.008	6.337	<b>0.0033</b>	<b>1.004</b>	<b>6.6828</b>
	48	0.0352	0	0.0359	0.0175	0.7012	3.982	0.0172	0.006	3.22	<b>0.0174</b>	<b>0.354</b>	<b>3.6011</b>
	72	0.0479	0	0.0322	0.0184	0	1.5582	0.0182	0.0003	1.281	<b>0.0183</b>	<b>1E-04</b>	<b>1.4197</b>
	96	0.0841	0	-0.002	0.019	0	1.0042	0.018	0.0036	0.866	<b>0.0185</b>	<b>0.002</b>	<b>0.9349</b>
	120	0.0735	0	-0.008	0.0161	0	0.1731	0.017	0.0598	0.17	<b>0.0166</b>	<b>0.03</b>	<b>0.1714</b>
T2	0	0.0004	0	0.1299	0.0004	0	20.88	0.0004	0	20.88	<b>0.0004</b>	<b>0</b>	<b>20.88</b>
	24	0.017	0	0.299	0.0256	0	19.494	0.03	0.0053	0.005	<b>0.0278</b>	<b>0.003</b>	<b>9.7499</b>
	48	0.0566	0	0.1711	0.053	4	4.259	0.05	0.0106	0.011	<b>0.0515</b>	<b>2.005</b>	<b>2.1348</b>
	72	0.0689	0	0.0824	0.057	0	0.7271	0.058	0.0035	0.003	<b>0.0575</b>	<b>0.002</b>	<b>0.3653</b>
	96	0.0961	0	0.0602	0.061	0	0.5886	0.06	0.0032	0.003	<b>0.0605</b>	<b>0.002</b>	<b>0.2959</b>
	120	0.0897	30.33	0.0517	0.059	0.0009	0.4501	0.056	0.0652	0.065	<b>0.0575</b>	<b>0.033</b>	<b>0.2577</b>
T3	0	0.0004	0	0.1255	0.0004	0	20.533	0.00035	0	19.56	<b>0.0004</b>	<b>0</b>	<b>20.048</b>
	24	0.0072	0	0.2136	0.0098	1	0.7964	0.0094	0.0033	0.003	<b>0.0096</b>	<b>0.502</b>	<b>0.3999</b>
	48	0.0369	0	0.0379	0.0172	0.7714	0.4501	0.0172	0.0053	0.005	<b>0.0172</b>	<b>0.388</b>	<b>0.2277</b>
	72	0.0581	0	0.0169	0.0256	0	0.3116	0.0252	0.0035	0.004	<b>0.0254</b>	<b>0.002</b>	<b>0.1576</b>
	96	0.0892	0	-0.005	0.0335	0	0.1731	0.0335	0.0003	3E-04	<b>0.0335</b>	<b>2E-04</b>	<b>0.0867</b>
	120	0.0259	0	-0.014	0.03	0.0023	0.1662	0.034	0.0532	0.053	<b>0.032</b>	<b>0.028</b>	<b>0.1097</b>
T4	0	0.0004	0	0.1474	0.0004	0	20.88	0.0004	0	19.56	<b>0.0004</b>	<b>0</b>	<b>20.222</b>
	24	0.0227	0	0.3862	0.0123	1	14.439	0.012	0.0126	0.013	<b>0.0122</b>	<b>0.506</b>	<b>7.2258</b>
	48	0.0369	0	0.1141	0.0401	4	1.3504	0.04	0.0047	0.005	<b>0.0401</b>	<b>2.002</b>	<b>0.6775</b>
	72	0.05	0	0.0182	0.0661	0	1.1427	0.065	0.0005	5E-04	<b>0.0656</b>	<b>2E-04</b>	<b>0.5716</b>
	96	0.0788	0	0.0164	0.086	0	0.9349	0.08431	0.0033	0.003	<b>0.0851</b>	<b>0.002</b>	<b>0.4691</b>
	120	0.0489	0	0.0013	0.0736	0	0.7964	0.0725	0.002	0.002	<b>0.0731</b>	<b>0.001</b>	<b>0.3992</b>

**ANEXO 9****ECUACIÓN ESTEQUIOMÉTRICA MICROBIANA****ECUACIÓN ESTEQUIOMÉTRICA**

Nota. Elaboración propia.

**ANEXO 11****PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA****Figura 18**

*Secado por bandeja de la cáscara de papa a 80°C por 9 hora*



**Figura 19**

Cáscara de papa pulverizada después de la molienda y tamizado, lista para la preparación de medio de fermentación.

**ANEXO 12****MATERIAL BIOLÓGICO: HONGO *Rhizopus oryzae*****Figura 20**

Cepa de *Rhizopus oryzae* 4A, donado por Inca Biotec.

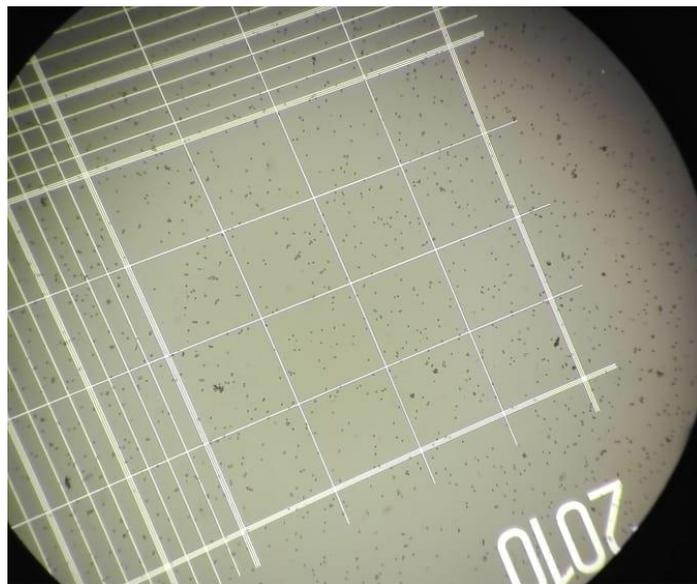


**Figura 21**

*Rhizopus oryzae* en medio agar PDA.

**Figura 22**

Cuantificación de esporas en la cámara Neubauer en microscopio en el objetivo 10X.



**ANEXO 13****DETERMINACIÓN DEL ALMIDÓN POR EL MÉTODO DE YODO****Figura 23**

*Solución madre de almidón al 1%.*

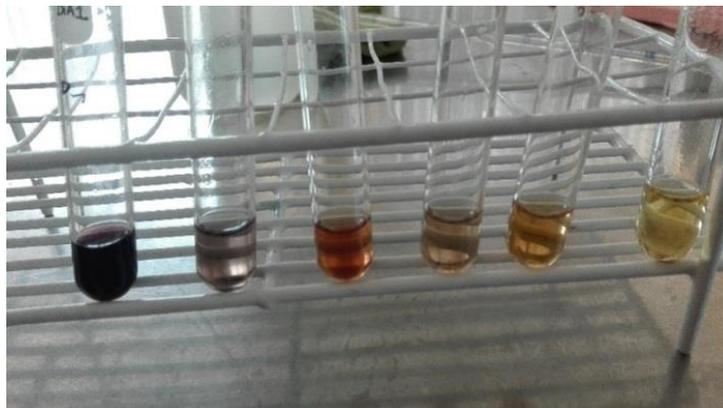
**Figura 24**

*Preparación de la solución de yodo a 0.1 M.*



**Figura 25**

*Serie de soluciones para la curva de calibrado de almidón por el método de yodo.*



**ANEXO 14****PREPARACIÓN DEL MEDIO DE FERMENTACIÓN****Figura 26**

*Esterilización de los medios de fermentación en autoclave.*

**Figura 27**

*Adición de soluciones stock de sales al medio esterilizado.*



## ANEXO 15

INOCULACIÓN DE *Rhizopus oryzae* A LOS MEDIOS DE FERMENTACIÓN

Figura 28

*Inoculación de suspensión de esporas de Rhizopus oryzae a los medios de fermentación.*



Figura 29

*Incubación de los medios de fermentación a 120 rpm a una temperatura de 30 °C.*



**ANEXO 16****DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA FÚNGICA POR PESO SECO****Figura 30**

*Shock térmico del medio para detener el crecimiento de la biomasa.*

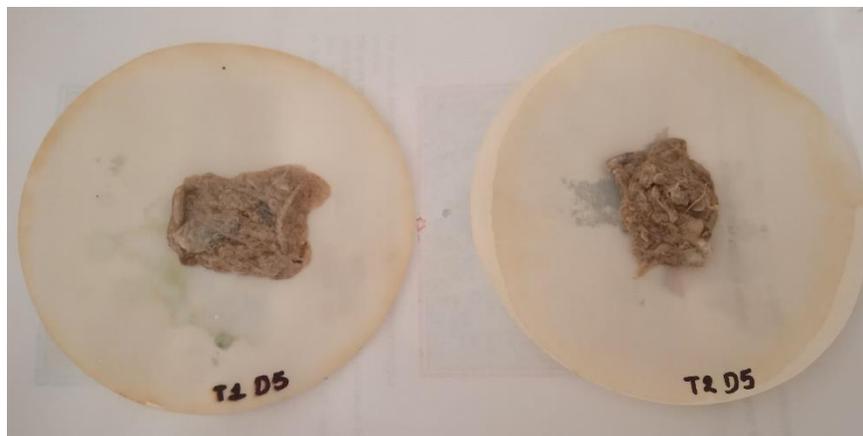
**Figura 31**

*Filtración al vacío de la biomasa fúngica con papel Whatman.*



**Figura 32**

*Biomasa luego del proceso de lavado, lista para el secado.*

**Figura 33**

*Secado de biomasa a temperatura de 105°C por 24 horas en estufa para obtención de peso seco.*



**ANEXO 17****MUESTRAS OBTENIDAS DE LA FERMENTACIÓN****Figura 34**

*Serie de muestras filtradas y centrifugadas listas para los análisis.*

