

PRODUCCION BIOTECNOLOGICA Y EXTRACCION DE ACIDO FUMARICO

FERNANDO ZAUSCHER V.

Químico, Universidad Nacional
Ph.D Universidad de California
Profesor asociado UIS.

CRISOSTOMO BARAJAS FERREIRA

Ing. Químico UIS
Ms.C Universidad Industrial de Santander
Profesor Asistente UIS.

CLAUDIA INES DUARTE DUARTE

Ing. Químico UIS.

CIRO ALFONSO ESTUPIÑAN ROA

Ing. Químico UIS.

RESUMEN

En el presente estudio se presenta la utilización de subproductos agrícolas como la yuca no apta para el consumo humano y la cáscara de piña, para la obtención de un ácido orgánico de gran importancia como es el Acido Fumárico, por vía biotecnológica.

La selección de este método se realizó por la motivación que presenta la utilización de una nueva tecnología que constituye una alternativa y que cobra cada día mayor importancia, como es la biotecnología.

Actualmente el ácido fumárico se está produciendo en el país por isomerización del Acido Maléico, el cual se importa. Si se obtiene a partir de materias primas nacionales, representa para el país un ahorro de divisas y una nueva fuente de generación de empleos.

La materia prima seleccionada para este estudio fue el almidón de yuca hidrolizado, el cual proporciona la fuente de carbohidratos necesaria para la producción de Acido Fumárico con *Rhizopus nigricans* como biocatalizador. Su selección se debió a la rápida adaptación que tuvo el hongo a este medio durante las pruebas preliminares, al contrario de lo ocurrido con el jugo de la cáscara de piña, en donde el hongo no logró un crecimiento satisfactorio debido a su alto grado de acidez.

INTRODUCCION

El objetivo de este estudio consiste en la producción de Acido Fumárico a partir de subproductos agrícolas apropiados, mediante experimentación previa relacionada con la adaptación del microorganismo. Determinar experimentalmente los parámetros cinéticos característicos del proceso, posteriormente seleccionar un método para la extracción y recuperación del producto principal.

Para cada una de estas etapas se hace una selección de las variables óptimas de operación y se lleva a cabo un estudio de las características cinéticas con el fin de mantener siempre el proceso bajo control y obtener el mayor rendimiento posible.

MATERIALES Y METODOS

El sustrato es una solución de glucosa la cual se obtiene por medio de la hidrólisis enzimática del almidón de yuca. La extracción del almidón se lleva a cabo en varias etapas como son el lavado, pelado, rallado, lixiviado, sedimentación y secado.

La hidrólisis enzimática ha sido bastante estudiada y se han establecido ya los siguientes parámetros óptimos de trabajo: Concentración de almidón 70 g/l; concentración de malta 20 g/l; pH 5-5.5; Temperatura 70 °C y un tiempo de 60 minutos.

El proceso de hidrólisis se realiza de la siguiente manera: se toma la mitad del agua a 50 °C y se agrega el almidón diluyendo con agitación continua; luego se eleva la temperatura a 55 °C, se agrega el 10% de la malta y se deja por 15 minutos a esta temperatura, a un pH de 5. Posteriormente se eleva la temperatura a 75 °C durante 30 minutos para modificar la solubilidad, finalmente se eleva a 96 °C durante otros 30 minutos para lograr la gelatinización.

Terminada la etapa de cocción del almidón se agrega el resto de la malta disuelta en la otra mitad del agua, a una temperatura de 40 °C, para lograr de esta manera la temperatura de la hidrólisis. Se mantiene a esta temperatura durante 60 minutos controlando el pH y con agitación continua.

El Acido Fumárico se utiliza como acidificante en la industria de alimentos. Grandes cantidades se usan en la preparación de jugos de frutas, gelatinas, postres, rellenos de tortas, masas y vinos. Por no ser higroscópico y más económico, esta reemplazando rápidamente al Acido

Cítrico en la industria alimentaria.

Otra industria que requiere grandes cantidades de Acido Fumárico es la industria de los polímeros.

Los Alkil ester del Acido Fumárico se copolimerizan con polivinil acetato para formar emulsiones internamente plastificada, que se utilizan como adhesivos permanentes. Las resinas elaboradas con Fumarato de Glicol polimerizado con estireno monómero, se usan con fibra de vidrio y otros materiales de refuerzo para producir moldes rígidos como: cuerpos de automóviles, paneles, estructuras de edificios, moldeados de botes, tanques de almacenamiento de productos químicos, tuberías, tinas de baño y otros.

La característica esencial de un proceso biotecnológico es la presencia de un biocatalizador. En el caso de la fermentación fumárica, el biocatalizador utilizado es un hongo filamentososo del orden de los mucorales: Rhizopus Nigricans cuya característica distintiva es la formación tanto de rhizoides como de estolones. El micelio es blanco al principio y más tarde se oscurece por la presencia de esporangios, que contienen las esporas, las cuales son generalmente negras o marrones.

Existen varios parámetros que afectan considerablemente el rendimiento del proceso como son la composición del medio (debe contener de 6 a 10% de azúcar, sales nutrientes, y un agente neutralizante), la temperatura, el pH que debe estar entre 5,5 y 6,5; la agitación y la aireación del medio.

Una vez obtenida la solución de almidón hidrolizado, se analizó el contenido de azúcar, se ajustó a las condiciones deseadas y se esterilizó en un autoclave a 10 psi por 10 minutos. Posteriormente se inoculó con esporas.

El fermentador utilizado, permitía la entrada y salida de aire y tomar muestras. Para controlar la temperatura del medio se introdujo el fermentador en un baño termostataado y se agitó el caldo de cultivo por medios magnéticos.

Diariamente se tomaron muestras y se analizó su contenido de Acido Fumárico por el método de la Polarografía. Después del séptimo día se suspendió la fermentación.

La necesidad de un agente neutralizante hace de la etapa de recuperación sea la más costosa del proceso de producción de Acido Fumárico. Para liberar el ácido se requiere de un ácido mineral, ya que el ácido fumárico se encuentra como fumarato de calcio y al adicionarle ácido clorhídrico, reacciona formando el cloruro de calcio y dejando libre el ácido fumárico. Como tiene una solubilidad muy baja, cristaliza fácilmente cuando se acidifica una solución

concentrada de sales de sodio, calcio o potasio. El ácido libre es fácil de recristalizar en agua caliente.

RESULTADOS Y DISCUSION

Para obtener los parámetros óptimos en la fermentación fumárica, se realizó un diseño factorial de experimentos del tipo 2^2 ; dos factores con dos niveles. estos son:

Factores	Niveles	
	-	+
Concentración de Azúcar	6%	10%
pH	5,5	6,5

Con estos resultados se realizó la matriz de diseño, utilizando todas las combinaciones posibles y con dos experimentos de control con los datos intermedios (8% de azúcar y pH de 6). La matriz de diseño y su representación esquemática se muestran en la Tabla 1 y Figura 1, respectivamente.

TABLA 1. Matriz de diseño.

Experimento	Codificadas		Variables	
	Az	pH	Valor Real Az (g/l)	pH
1	-	-	60	5,5
2	+	-	100	5,5
3	-	+	60	6,5
4	+	+	100	6,5
5	0	0	80	6,0
6	0	0	80	6,0

Cada experimento tuvo una duración siete (7) días y cada 24 horas se tomaron muestras. A cada muestra se le determinó la concentración de azúcar y el contenido de Acido Fumárico.

Los resultados se muestran en la Tabla 2. y Tabla 3, respectivamente.

TABLA 2. Consumo de Azúcar (g Azúcar consumido/100 ml sln).

Tiempo (h)	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24	1,05	0,35	1,60	0,20	0,71	0,79
48	1,55	1,90	2,12	1,25	2,02	2,22
72	4,72	5,71	4,60	5,30	4,63	4,77
96	5,00	7,20	5,20	7,51	6,20	5,79
120	5,20	7,22	5,34	5,54	6,28	5,85
144	5,34	7,41	5,40	7,62	6,34	5,97
168	5,65	7,75	5,58	7,70	6,45	6,12

TABLA 3. Producción de Acido Fumárico (g ácido/100 ml sln).

Tiempo (h)	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
24	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
48	0,015	0,307	0,017	0,281	0,194	0,297
72	1,065	1,062	1,025	0,983	1,493	1,430
96	2,130	2,063	2,050	1,942	2,180	2,220
120	2,131	2,500	2,052	2,340	2,182	2,205
144	2,133	2,502	2,053	2,343	2,183	2,206
168	2,133	2,502	2,053	2,343	2,183	2,206

Con los resultados obtenidos en cada caso, se halló el rendimiento de cada experimento, de acuerdo con el día en que se obtuvieron los mejores resultados. Los rendimientos respecto al azúcar consumido y azúcar inicial, se muestran en la Tabla 4 y en la Figura 2.

TABLA 4. Rendimiento del Proceso.

Experimento	(A.F/AC)*100 %	(A.F/AI)*100 %	(A.F/Aft)*100 %
1	42,60	35,50	55,09
2	34,63	25,00	38,79
3	39,42	34,16	53,03
4	31,03	23,04	36,31
5	35,16	27,25	42,29
6	37,90	27,50	42,68

donde:

AF : Acido Fumárico producido

AC : Azúcar consumido

AI : Azúcar inicial

Aft : Acido Fumárico teórico.

De la anterior tabla podemos deducir que el mejor experimento es el primero, luego los mejores parámetros son: 6% de azúcar y un pH de 5,5.

Utilizando el Algoritmo de Yates se encontró que las variables significativas son el pH y la concentración de azúcar.

La ecuación que modela el proceso es:

$$\text{Rendimiento} = 36,92 - 9,18X_1 - 3,39X_2$$

$$X_1 : ([\text{Az}] - 80)/20$$

$$X_2 : (\text{pH} - 6)/0,5$$

CINETICA DE LA FERMENTACION FUMARICA

La cinética de los procesos de fermentación ha sido el tema de estudio de varios investigadores. Existen variadas teorías y formas de hallar la cinética de estos procesos, pero la mayoría solo logra clasificar cualitativamente los procesos de fermentación.

La teoría cinética usada en el presente trabajo es la presentada por los bioquímicos Japoneses Kono y Asai, quienes propusieron un modelo matemático para cada de las

fases de crecimiento del microorganismo. (39,40,41)

En la Tabla 5, se muestran los valores de velocidad de formación de producto y concentración de producto para cada una de las fases; y se muestran en forma gráfica en la Figura 3 y Figura 4.

TABLA 5. Velocidad de crecimiento micelial y velocidad de formación de Acido Fumárico.

Tiempo	Cs (g/l)	Cx (g/l)	Cp (g/l)	Vcx (g/l.h)	Vcp (g/l.h)	Ccx (g/l)
0	60,0	0,000	0,00	0,0000	0,00	----
12	57,3	0,100	0,00	0,0000	0,00	----
24	51,5	0,223	0,00	0,0102	0,00	0,16
36	36,7	4,400	0,00	0,3481	0,00	2,31
40	32,7	7,431	0,25	0,7578	0,00	5,92
48	26,5	12,163	1,50	0,5914	0,125	9,79
60	18,0	12,250	4,50	0,0075	0,25	12,21
63	16,7	12,287	5,25	0,0122	0,25	12,27
67	14,9	12,440	7,05	0,0384	0,45	12,36
70	14,8	12,483	8,25	0,0143	0,40	12,46
72	14,8	12,483	10,65	0,0000	----	12,48
84	11,0	12,483	17,50	0,0000	0,57	12,48
96	10,0	12,483	21,30	0,0000	0,32	12,48
108	10,0	12,483	21,31	0,0000	6E-4	12,48

Cp : Concentración de producto
 Cx : Concentración celular
 Cs : Concentración del substrato

Subíndices:

c : Punto crítico. Límite entre la fase de crecimiento exponencial y la declinante.

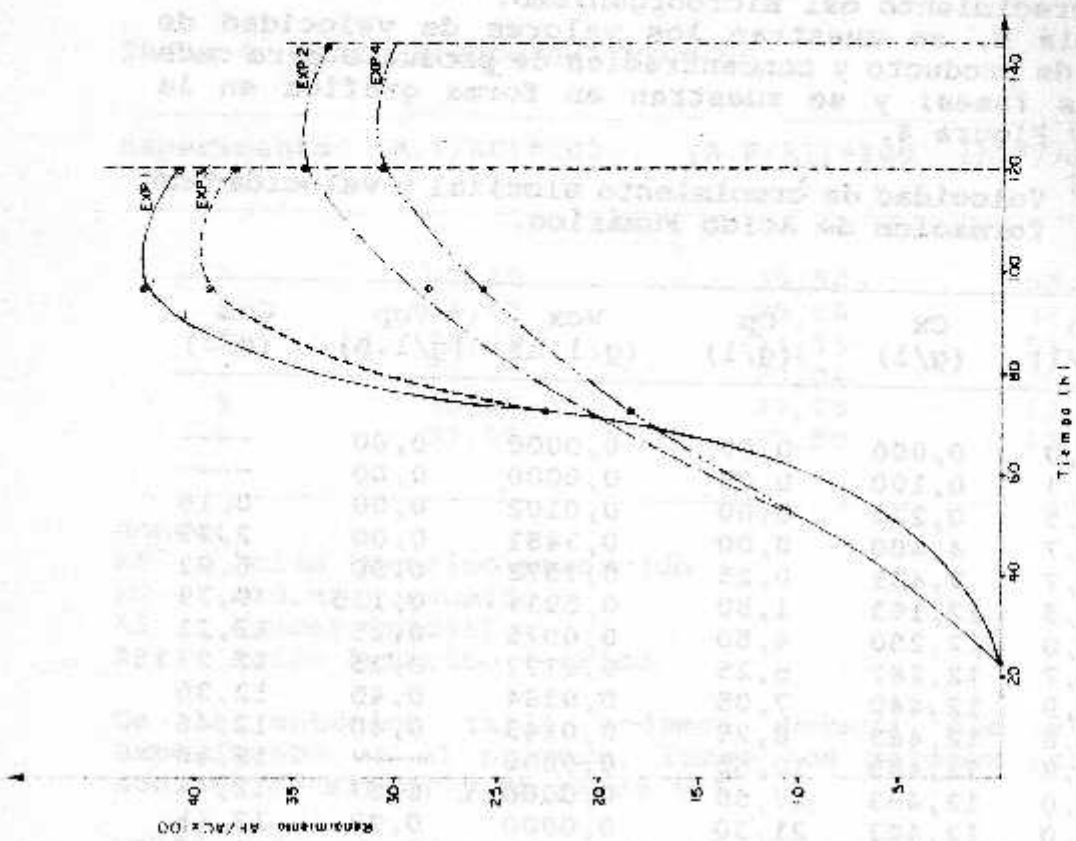


FIGURA 2. Rendimiento de los experimentos realizados. (Con base en el azúcar consumido)

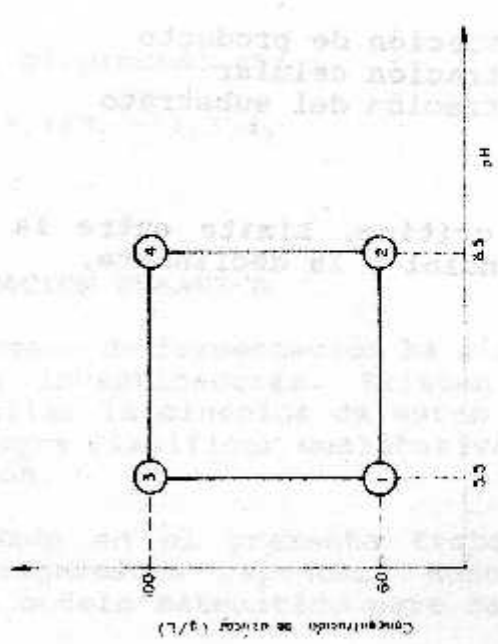


FIGURA 1. Representación esquemática de la matriz de diseño.

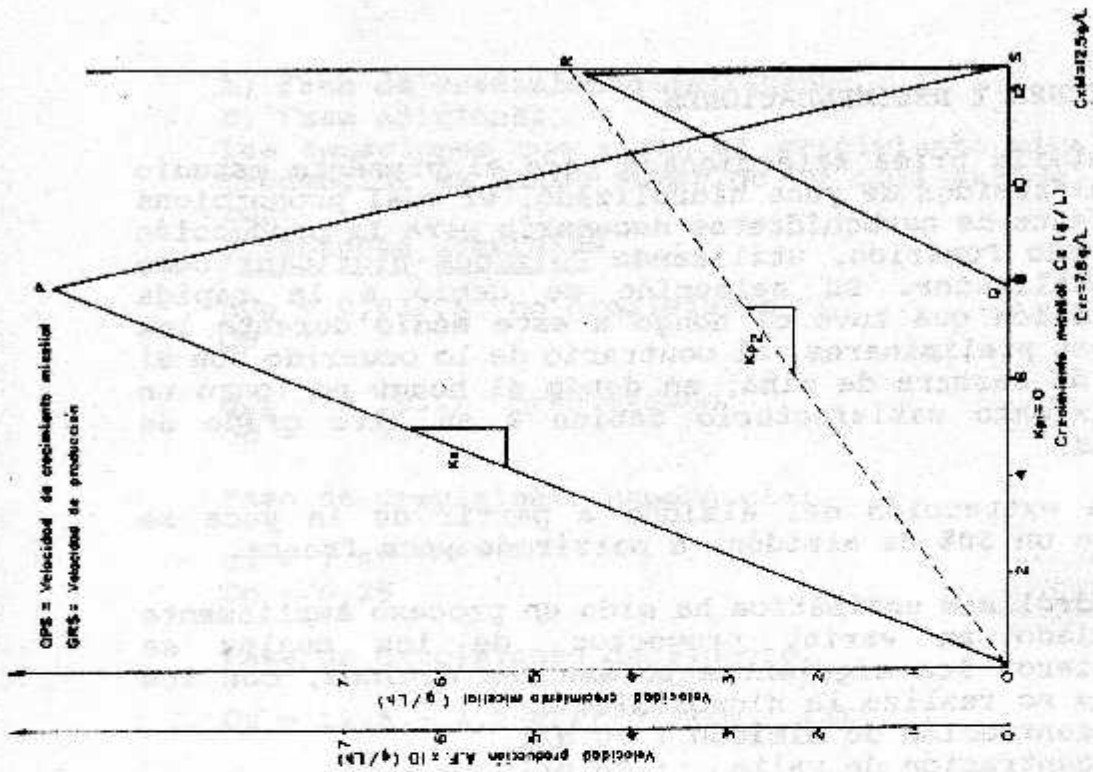


FIGURA 4. Velocidad de producción de A.F. y de crecimiento del microorganismo.

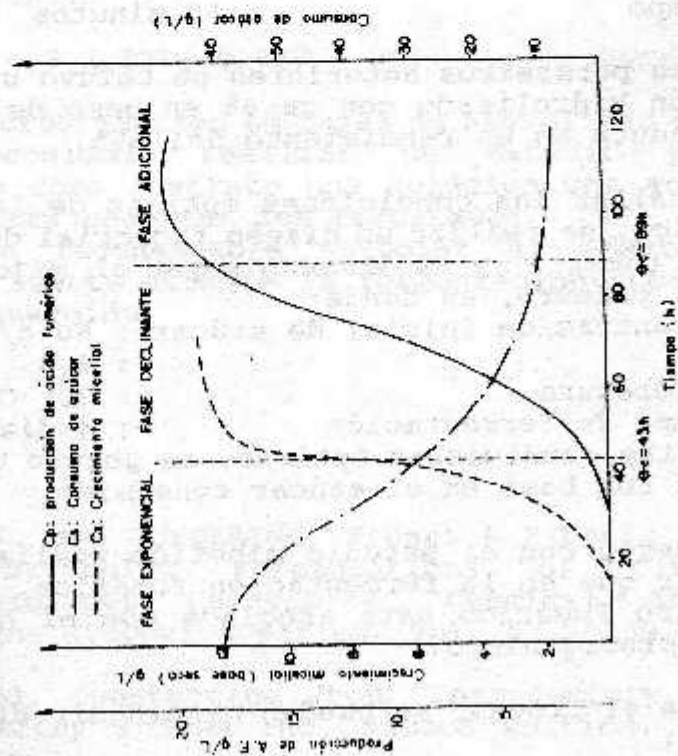


FIGURA 3. Producción A.F., crecimiento del microorganismo y consumo de sustrato con el tiempo.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. La materia prima seleccionada para el presente estudio fue el almidón de yuca hidrolizado, el cual proporciona la fuente de carbohidratos necesaria para la producción de Acido Fumárico, utilizando Rhizopus nigricans como Biocatalizador. Su selección se debió a la rápida adaptación que tuvo el hongo a este medio durante las pruebas preliminares, al contrario de lo ocurrido con el jugo de cáscara de piña, en donde el hongo no logró un crecimiento satisfactorio debido a su alto grado de acidez.
2. En la extracción del almidón a partir de la yuca se obtuvo un 30% de almidón, a partir de yuca fresca.
3. La hidrólisis enzimática ha sido un proceso ampliamente estudiado en varios proyectos, de los cuales se obtuvieron los siguientes parámetros óptimos, con los cuales se realizó la hidrólisis:

Concentración de almidón	: 70 g/l
Concentración de malta	: 20 g/l
pH	: 5 - 5,5
Temperatura	: 70 °C
Tiempo	: 60 minutos
4. Con los parámetros anteriores se obtuvo una solución de almidón hidrolizado con un 6% en peso de glucosa. Esto se traduce en un rendimiento del 85%.
5. Para hallar las condiciones óptimas de la fermentación Fumárica, se realizó un diseño factorial de experimentos de la forma 2^2 y se encontró que el mejor experimento fue el primero, en donde:

Concentración inicial de azúcar	: 60 g/l
pH	: 5,5
Temperatura	: 30 °C
Tiempo de fermentación	: 4 días

Con estas condiciones óptimas, se obtuvo un rendimiento de 42% con base en el azúcar consumido.
6. De acuerdo con el estudio cinético realizado, se puede deducir que en la fermentación fumárica, la producción de Acido Fumárico está asociada con el no crecimiento del microorganismo.

Durante el proceso se pueden distinguir claramente tres etapas:

- a) Fase de crecimiento exponencial

b) Fase de crecimiento declinante

c) Fase adicional

Las ecuaciones que rigen el crecimiento micelial y la producción de Acido Fumárico en cada una de las fases son:

Ecuaciones generales

$$\frac{dC_p}{d\theta} = 0,037C_x \quad \text{no crecimiento}$$

$$\frac{dC_x}{d\theta} = 0,133C_x \quad \text{crecimiento}$$

Fase de crecimiento exponencial

$$C_x = 7,8^{(0,133(\theta - 43))}$$

$$C_p = 0,25$$

Fase de crecimiento declinante

$$C_x = 12,5 - 4,7 \text{ EXP}(-0,22(\theta - 43))$$

$$C_p = 2,095 \text{ EXP}(-0,22(\theta - 43)) + 0,4625(\theta - 43) - 1,845$$

Fase Adicional

$$C_p = 21,3 - 3,1 \text{ EXP}(-0,4(\theta - 39))$$

7. Como el microorganismo es capaz de hidrolizar el almidón, se recomienda realizar un estudio posterior, utilizando como sustrato una solución de almidón, para comparar los resultados. También es recomendable estudiar el efecto de una agitación fuerte durante la fermentación fumárica para cultivo sumergido.

BIBLIOGRAFIA

1. AIYAR, A.S. and JUEDEKING, Robert. A Kinetic Study of the Alcoholic Fermentations of Glucosa by *Saccharomyces Cerevisiae*. Chemical Engineering Progress Symposium Series. Vol. 42 No 69, 1966.
2. ALEXOPOULOS, Constantine Jhon. Introductory Micology. Jhon Wiley & Sons Inc. Second Edition, New York, USA, 1962.

3. AMAYA G, Nelson y HOYOS de SALAS, Elvira. Estudio de un Modelo Matemático que describa el proceso de Hidrólisis enzimática del Almidón de Yuca. Proyecto de Grado, Universidad Francisco de Paula Santander, Cúcuta, 1988.
4. ATKINSON, B. Chemical Reactors. Ed. Pion Limited. First Edition, London, 1974.
5. BALASUBRAMANIAN, K. A. and SRIVASTAVA, D.N. Relationship to Germination and Pathogenicity of spores of Rhizopus Stolonifer. Indian Journal of experimental Biology. Vol. 10, Nov 1972. pp 445-447.
6. BANYOPADHYAY, A.K., MAJUNDER, D.K. and ROY, D.K. Fermentative Production of Limit Dextrinase by Aspergillus Orizae. Indian Journal of Experimental Biology. Vol. 10 No 3, May 1976. pp. 373-374.
7. BECK, Chistine, STIEFEL, Howard and STINNETT, Thomas. Cell-Culture Bioreactors. Chemical Engineering, February 16, 1987. pp. 121-129.
8. BENGTTSSON, L. and SAMUELSON, Olof. Separation of Dicarboxylic and Tricarboxylic Acids by Anion-Exchange Chromatography in Magnesium Acetate. *Chimica Acta*. Vol. 44, 1969. pp. 211-216.
9. BENNETT, Richard C. Matching Crystallizer to Material. Chemical Engineering, May 23, 1983. pp. 118-127.
10. BJURSTROM, Edward E. Biotechnology, Fermentation and Downstream Processing. Chemical Engineering, February 18, 1985. pp. 126-158.
11. BJURSTROM, Edward E. and SMELSER, Bonnie J. Commercializing Biotechnology Processes. Chemical engineering, January 18, 1988.
12. BRATLECHT, Charles Andrew. Starch: Its Sources, production and uses. Reinhold Publishing Co. New York, 1983. pp. 209-226.
13. BROOK, A.J.W. The separation of Maleic and fumaric acids by Gel filtration on Sephadex G 10. *Journal of Chromatography*, No 39, 1969. pp. 328-333.
14. BRUCHAMAN, Ernest E. *Biología Química*. Editorial Acribia. Primera edición, Zaragoza, España, 1980.

15. CARPENTER, Phillip L. Microbiología. Editorial Interamericana S.A. Cuarta edición, México, 1979.
16. CASTELLANOS H. Jorge E. DUARTE L., Carlos G. Estudio Experimental para obtener Acido Acético por fermentación continua a partir de yuca. Proyecto de Grado, Universidad Industrial de santander, 1988.
17. CERVINKA, Otakar, FABRIOVA, Anna and SIMON, Jan. Fumaric Acid, Czech C.S. April, 1982. (Chemical Abstrac pl 2706K. Vol. 97, 1982).
18. CHRISTENSEN, Clyde M. Los Hongos y el Hombre. Editorial Interamericana S.A. Segunda Edición, México, 1964.
19. COCK, J.H. and WHOLEY, D. Sistema Rápido de Propagación de Yuca. Centro Internacional de Agricultura tropical. Boletín Informativo.
20. COBB, T.T., TACHAUER, E. and SHAH, Y.T. Hidrólisis of starch by a Mixture of Enzymes in a membrane reactor. Biochemical and Bioengineering. Vol. 16, 1974.
21. DAVIES, C., HARTLEY, R. D. and LAWSON, G.H. Chromatographic Behaviour of Organic Acids on DOWEX 1 X 10. Journal of Chromatography. Vol. 18, 1965. pp. 47-52.
22. DAYAL, H.M., UNIYAL, B.P. and NIGAMA, S.S. Viability of Fungal Spore Suspension. Indian Journal of Experimental Biology. Vol 10, May 1972.
23. DE RAFOLS, Wilfredo. Aprovechamiento Industrial de Los Productos Agrícolas. Salvat Editores, Primera edición. Barcelona, España, 1964. pp. 129-194.
24. DOMINGUEZ, Carlos E. Yuca: Investigación, Producción y Utilización. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, 1986.
25. DOSCHER, C.K. KANE, J.H. and STAEBNER, W.H. Industrial Applications of Fumaric Acid. Industrial and Engineering Chemistry. Vol. 33 No 3, March, 1941.
26. FREEMAN, G.C. The Secuence of elution of Plant

- Organic Acids from silica Gel Chromatographic Columns. Journal of Chromatography. Vol 28, 1967, pp. 338.
27. FRIEDLAND, Waldo C., PETERSON, Merlin and SYLVESTER, Jhon. Fermentador Desing for Small scale Sumerged fermentation. Industrial and Engineering Chemistry. Vol. 48 No 12, December, 1956.
 28. GODCHO, Sydney J. Chemicals by Fermentations. Noyes data Co. New York, USA, 1973.
 29. GUERRERO COLOBON, Carlos E. Optimización del proceso para obtener n-Butanol por Fermentación Discontinua. Proyecto de Grado, Universidad Industrial de santander, Bucaramanga, 1986.
 30. GUTIERREZ M. Elba. De la Cebada a la cerveza que usted toma. revista Bavariogramas No. 110, 1970.
 31. HERRERA, Pablo A. Estudio cinético del proceso de Obtención de glicerina por fermentación Aerobia a partir de Almidón de Yuca. Proyecto de Grado, Universidad Industrial de santander, Bucaramanga, 1986.
 32. INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO ICA. Boletín Informativo. Vol 11 No 2.
 33. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES TECNOLOGICAS. El Cultivo e Industrialización de la Yuca. Santa Fé de Bogotá. revista IIT. Vol. 8 No 44, 1966. pp. 40-51.
 34. JORGENSEN, Alfred. Microorganisms and fermentations. Charles Griffin and company Limited. London, 1984.
 35. JWO, Jing, Chen, Yih and HSIUNG, Chang. Isomerización of maleic Acid to Fumaric acid catalized by Cerium an n-Bromo Compounds. Journal Chinesse Chem Soc. Taipei, 1983.
 36. KIRK OTHMER. Enciclopedia of Chemical Technology. Second Edition. Vol. 12, 1967.
 37. KONO, T. and ASSAI, T. Kinetic of fermentation Processes. Biotechnology and Bioengineering. Vol. IX, 1969. pp. 293-321.
 38. -----. Kinetics of Continuous Cultivations.

Biotechnology and Bioengineering. Vol. XI, 1969.

39. ----- . Kinetics of Microbial Cell Growth. Biotechnology and Bioengineering. Vol. X, 1968. pp. 105-131.
40. KROLL, C.L., FORMANIKER, Stanley and COVERT, S.A. Equipment to Small Scale Fermentations. Industrial and Engineering Chemistry. Vol. 48 No 12, December, 1956.
41. LEVENSPIEL, Octave. Ingeniería de las Reacciones Químicas. Editorial Reverté S.A. Segunda Edición, Barcelona, España, 1981.
42. LLAGUN, Concepción y GARRIDO, José. Aspectos Bioquímicos de la Producción de Acido fumárico por Fermentación. Revista de Ciencia Aplicada. Juan de la cierva. Madrid, España, Sep-Oct, 1960.
43. ----- . Producción de Acido fumárico por Fermentación: Estudio de la Aireación y Agitación en el medio de cultivo. Revista de Ciencia Aplicada. Juan de la Cierva, Madrid, España, Nov-dic, 1961.
44. McNAUGHTON, J. and MATLEY, Jay. Current Cost of Process Equipment. Chemical Engineering, July 22, 1985.
45. MILLER, Randy and HELICK, Michael. Modeling Bioreactors. Chemical Engineering, February 16, 1987. pp. 111-120.
46. MOIR, Douglas N. Sedimentation Centrifuges. Chemical Engineering, March 28, 1988. pp. 42-51.
47. MONTALVO, Alvaro. Yuca, Cultivo de Raíces, Tubérculos Tropicales. Instituto de Agronomía, Universidad de Venezuela, Maracay, Venezuela, 1971.
48. MULDON, Jhon. Screens and Screening. Chemical Engineering, February 6, 1984.
49. MUÑOZ P., María P. y MUÑOZ P., Yaneth. Producción de Acido Glutámico por Fermentación. Proyecto de Grado, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, 1987.

50. NARANJO, A.L. Evaluación de Rallanderías de Extracción de Almidón de Yuca a nivel pequeño Productor. Proyecto de Grado, Universidad Industrial de los Andes e Instituto Colombiano Agropecuario, 1973. pp. 23, 55-58.
51. NEWSPAPER CHEMICAL MARKETING REPORTER. Chemical Price. pp. 30-38.
52. ORTEGA, G. y GALVIS, G. Manual de Microbiología. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias de la Salud, 1984.
53. PINTO, Reinaldo. Elaboración y Usos del Almidón de Yuca. ICA. División de Ingeniería Agrícola. Boletín Técnico No 66, Diciembre 1980.
54. PRESCOTT, Samuel. Industrial Microbiology. The Fumaric Acid Fermentations. Second Edition. Chap 33. McGraw-Hill. New York, 1949.
55. QUINTERO RAMIREZ, rodolfo. Ingeniería Bioquímica. Teoría y Aplicación. Editorial Alhambra Mexicana. Primera Edición, México, 1981.
56. SALLE, A.I. Bacteriología. Editorial Gustavo Gili. S.A., Barcelona, España, 1945. pp. 144-153.
57. SHUKLA, J.P. and DUTTA, S.M. Production of Fungal Protein from Rhizopus sp. Indian Journal of Experimental Biology. Vol. 3 No 4, Oct, 1965.
58. STREULL, C.A. Adsorption Chromatography of Polar Organic Molecules on Biogel. Journal of Chromatography. Vol. 47, 1970. pp. 355-360.
59. SUGANO, Nobuo and FUJII, Hithoshi. Application of a Strain of the Genus Rhizopus for Sake Brewing. Natural Research Institute Brew. Tokyo Japan, 1982.
60. SYMPOSIUM OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR TROPICAL ROOT CROPS. Tropical Root Crops, Production and Uses in Africa. Cameroon, 1983.
61. THOMPSON, D.D. and ROUNTREE, Harlan. The Free Organic Acid Composition of Rhizopus and Mucor Species. Healt Research Center. USA, 1982.

62. UNDERKOFER, Leland A. and MICKEY, Richard J. Industrial Fermentations. Vol 1. Chemical Publishing Co. Inc. New York, USA, 1954.
63. VAS, Karoly, and ZETELAKY, Kornelia. The Role of Aereation and Agitation in the Production of Glucosa Oxidasa in Submerged Cultive. Biotechnology an Bioengineering. Vol. X, 1968. pp. 45-59.
64. VILLA, Carlos Mario. Técnicas de Diseño de Experimentos. Curso Asociación Química Colombiana, Medellín, 1986.
65. VITTI, P. Industrialization of the Cassava Production of Starch, Chips and Fluor. Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia dos Alimentos. ICA. Boletín 6, 1966. pp. 26-33.
66. WASKMAN, Selman A. Process for the Production of Fumaric Acid. USA Patent Office, August 17, 1943.