

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



TESIS DOCTORAL

Producción de ácido fumárico con *Rhizopus arrhizus*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Víctor Martín Domínguez

Directores

Victoria Eugenia Santos Mazorra

Miguel Ladero Galán

Madrid

© Víctor Martín Domínguez, 2023

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas



Producción de ácido fumárico
con *Rhizopus arrhizus*

Tesis Doctoral dirigida por:

Victoria Eugenia Santos Mazorra

Miguel Ladero Galán

Víctor Martín Domínguez

Madrid, 2022

La Dra. Victoria Eugenia Santos Mazorra y el Dr. Miguel Ladero Galán, catedrática y profesor titular, respectivamente, del Departamento de Ingeniería Química y de Materiales de la Universidad Complutense de Madrid, afirman haber dirigido el trabajo recogido en la presente Memoria, realizado dentro del Programa de Doctorado en Ingeniería Química del citado departamento de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid y afirman que, a su juicio, reúne los requisitos de originalidad y rigor científico necesarios para ser presentada como Tesis Doctoral.

Los directores,

Dra. Victoria Eugenia Santos Mazorra

Dr. Miguel Ladero Galán

Agradecimientos

Antes de recapitular este viaje a lo largo de 6 años de investigación, mucho trabajo, mucha ciencia, muchos fines de semana y noches en el laboratorio y mucho de todo, es imprescindible atender a la parte no científica de la presente Tesis.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores, la Dra. Victoria E. Santos Mazorra y el Dr. Miguel Ladero Galán, que desde el principio confiaron y apostaron por mí, dándome una oportunidad para poder entrar en este maravilloso mundo, todo el aprendizaje que me han transmitido y su inestimable guía a lo largo de este viaje, ¡Muchas gracias!

Por supuesto también hay que agradecer su apoyo y ayuda a todos los profesores que componen el grupo de Físico-Química de Procesos Industriales y MedioAmbientales, el Dr. Félix García-Ochoa, que sin él no habría sido posible la tesis; la Dra. María Isabel Guijarro, el Dr. Pedro Yustos y el Dr. José Manuel Toledo, por su inestimable ayuda siempre que la he necesitado y sus consejos. Un agradecimiento especial merece el Dr. Emilio Gómez, el primero de todos mis mentores en esta aventura química, desde mis primeros conocimientos acido-base en el I.E.S. José de Churriguera de Leganés, hasta su ayuda para terminar esta tesis.

Y por supuesto no iba a olvidarme del Dr. Juan Manuel Bolivar, solo puedo tener palabras para agradecerte todo el apoyo que me has brindado en estos años, en todos los sentidos. Compartiendo confidencias, consejos y conocimientos de todo tipo. De los cafés a media mañana hasta las cañas al salir. Muchas gracias, Juanma, por levantarme cuando caía y bajarme cuando me iba.

Pero no solo he recibido enseñanza y guía de profesores y directores, es inevitable acordarme de todas las personas que estuvieron antes que yo en el grupo y de cómo me enseñaron y me han servido de inspiración, la Dra. Susana de la Morena, el Dr. Alberto Rodríguez, el Dr. Mateusz Wojtusik, el Dr. Miguel G. Acedos, la Dra. Isabel de la Torre y el Sr. Alberto Ramón, muchas gracias a tod@s. No podría olvidarme de la Dra. Vanessa Ripoll, por sus consejos a lo largo de la tesis, su ejemplo y la gran oportunidad que me ha brindado, todas las palabras de agradecimiento se me quedan cortas.

Y por supuesto hay que agradecer a toda la gente que ha estado conmigo estos últimos años de tesis, por aguantarme con mis chistes malos y ayudarme cuando no podía más o cuando más lo he necesitado. Gracias al Sr. Alberto García Martín, que

cada día desde que llegó no deja de sorprenderme y enseñarme cosas, y sobre todo por sus apreciaciones. Gracias al primer y mejor biorrefinero verde segoviano de la historia, Jorge García Montalvo, por todo el cariño que da a su manera, y por estar siempre ahí. Gracias al terremoto de Badajoz, Celia Álvarez González, por todas las fresinas, las latinas y por no por parar nunca.

Muy agradecido también a todos mis compañeros del laboratorio “upstairs” desde los más “novatos” como David González, que ha sido llegar y ponernos patas arriba; hasta los que ya llevan más tiempo, Álvaro Lorente e Itziar Arias, muchas gracias chic@s. Također hvala Lucija Ruzic za sve ovo vrijeme i što je uvijek bila spremna za zabavu.

Una mención muy especial se merece Cynthia Elisabeth Hopson Safatly, básicamente por todo. Por ser tan maravillosa, y ese superpoder que tiene para arreglarte un día de mierda solo con unas chuches y un abrazo.

No podría olvidarme del artista del laboratorio, Tomas Pedregal, que desde el mismo momento que entra por la puerta, ya sabes que el día va a ser una locura. También agradecer a todos los técnicos del laboratorio que han estado en estos años, muchas gracias a Inma Erdocia e Iván Aldama.

Ahora toca descubrir a los verdaderos responsables de que esté donde estoy, las dos mentes más brillantes que jamás conoceré, mis guías espirituales y mis referentes, en definitiva, las dos personas que te llevarías a una isla desierta sin pensártelo: el Dr. Rubén Fernández Rodríguez y el Dr. Marcos Larriba Martínez.

Sería imposible completar estos agradecimientos sin toda la gente que ha pasado a lo largo de estos años por el laboratorio y ha contribuido y colaborado para que esta tesis haya llegado a buen puerto; esas personas que vinieron a aprender y acabaron enseñándome: Nieves Martínez, Laura Bouzas, Beatriz Salmerón, Paula Bonilla, Paula I. Alemán, David de la Torre, Teresa Fernández-Nieto, Daniel Cruz y Jorge Parés.

Además, quisiera agradecer a Clara Yepes, el tiempo que estuvimos en el laboratorio que, aunque breve, fue intenso: desde las limpiezas interminables a las sesiones de hitazos.

También quiero agradecer al Dr. Ulf Pruesse, la Dra. Anja Kuenz, el Dr. Laslo Eidt y a Ute del Thünen Institute de Braunschweig por acogerme en mayo de 2019 y hacerme sentir como en casa, Danke schön!

Por supuesto, hay que destacar a las personas que han cargado el mayor peso de un doctorando quejica estos años, mi familia. Gracias a mis padres, por apoyarme en todas mis decisiones, por consolarme cuando no podía más y reír conmigo cuando estaba contento; por estar siempre, en lo bueno y en lo malo, incondicionalmente; en definitiva, por ser mis padres. También, mención muy especial merece mi hermano, Adrián; el mejor compañero que jamás tendré en cualquier cosa, desde viajes improvisados a castillos lejanos, hasta soñar con récords y medallas. También agradecer a Melissa todo su apoyo que, aunque ha llegado en la última etapa, ha dado cariño y apoyo como para toda la tesis.

También quiero acordarme de mi familia acuática, de todos mis compañer@s y entrenadores del Club Natación Leganés y demás amigos de las piscinas, que me han ayudado tanto estos años, han conseguido sacar lo mejor de mí, aun cuando ni yo mismo lo creía. Sois las verdaderas medallas.

Y como no, siempre me tengo que acordar de Marta Gómez, parte fundamental de esta Tesis y de mi vida, ahora y siempre. Gracias por estar.

En este mundo hay gente que llega sin avisar y para quedarse, por eso quiero acordarme de María Moral, porque nunca es demasiado tarde para llegar y ser importante.

Es inevitable acordarme de toda la gente que me acompañó en el camino hasta llegar hasta aquí, mis compañeros de carrera: Gonzalo Yagüe, Judit Casado y Cristina Alcubilla, un cachito de todo esto es vuestro. Y también de mis compañeros de máster, que nunca dejaron de animarme a seguir adelante y luchar por lo que quería: Jesús Lavado y Claudia Tello. Y como no, hay que destacar a Laura Casarrubios, por todos esos días, fáciles y difíciles, hiciera sol o lloviera, siempre dispuesta a escucharme y desahogarnos, sin ti esto no habría pasado.

A estos agradecimientos les faltarían algo si no incluyéramos a Marta Presa y a las berenjenas del Reino de León, que, aunque la vida nos lleva por caminos distintos, innegablemente han sido una parte muy importante de este viaje.

Por último, quisiera agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación por financiar esta Tesis Doctoral por medio una beca del programa de ayudas para contratos predoctorales para la formación de doctores, de la cual he sido beneficiario (PRE2018-084908) en el marco del proyecto de investigación BIOREFINE (ref: CTQ2017-84963-C2-1-R).

No sé si me dejo a alguien, solo agradecer a toda la gente que me ha acompañado y aguantado en este viaje que ya llega a su fin, si me he olvidado de ti, discúlpame, y ¡Muchísimas gracias!

Y ahora... vamos con la 100cia.

Índice

Resumen.....	1
Summary.....	3
Abreviaturas y nomenclatura.....	5
1. Introducción.....	11
1.1. Antecedentes.....	13
1.2. Biorrefinerías.....	19
1.3. Residuos de fruta como materia prima.....	22
1.4. Ácido fumárico.....	25
1.4.1. Aplicaciones.....	26
1.4.2. Mercado y viabilidad.....	29
1.4.3. Vías de producción.....	32
1.5. Hongos filamentosos.....	36
1.5.1. Metabolismo.....	39
1.5.2. Morfología.....	42
2. Alcance y objetivos.....	49
3. Materiales y métodos.....	53
3.1. Materiales.....	55
3.1.1. Biocatalizadores.....	55
3.1.2. Medios de cultivo.....	56
3.1.3. Residuos.....	57
3.2. Equipos.....	58
3.2.1. Dispositivos de reacción.....	58
3.2.2. Equipos de análisis.....	59
3.2.3. Equipos auxiliares.....	60
3.3. Procedimientos experimentales.....	61
3.3.1. Pretratamiento de residuos.....	61

3.3.2.	Hidrólisis enzimática de residuos.....	62
3.3.3.	Detoxificación de hidrolizados	63
3.3.4.	Cultivo y elaboración de stock fúngico	64
3.3.5.	Cultivo y fermentación fúngica.....	66
3.3.6.	Medida de transferencia de oxígeno en biorreactor	68
3.4.	Métodos de análisis	68
3.4.1.	Análisis electroquímicos	68
3.4.2.	Cuantificación de la biomasa.....	69
3.4.3.	Cromatografía líquida de alta resolución	70
3.4.4.	Distribución de tamaño de partículas	72
3.4.5.	Métodos colorimétricos	72
3.4.6.	Análisis en Centros de Apoyo a la Investigación	73
3.5.	Recursos informáticos.....	74
3.6.	Métodos matemáticos	74
3.6.1.	Parámetros estadísticos.....	74
3.6.2.	Métodos de cálculo	76
4.	Discusión integradora	79
4.1.	Producción de ácido fumárico empleando medios sintéticos	83
4.1.1.	Morfología y estudios de la etapa de inóculo.....	83
4.1.2.	Estudio del medio de cultivo.....	87
4.1.3.	Estudios para la modelización cinética del proceso	91
4.2.	Adaptación y uso de hidrolizados	94
4.2.1.	Hidrólisis enzimática	94
4.2.2.	Adaptación a hidrolizados.....	96
4.2.3.	Fermentación de hidrolizados de residuos agroalimentarios ...	99
4.3.	Modelización cinética del proceso en matraz Erlenmeyer.....	102
4.3.1.	Modelización en experimentos basados en glucosa.....	102

4.3.2.	Modelización en experimentos con fructosa y APH	104
4.4.	Estudios en biorreactor	107
4.4.1.	Correlación empírica de $k_L \cdot a$ con las variables	108
4.4.2.	Producción de ácido fumárico en biorreactor	110
4.4.3.	Modelización cinética en biorreactor.	116
5.	Conclusiones.....	127
5.1.	Producción en matraz Erlenmeyer.....	129
5.2.	Adaptación y uso de hidrolizados de residuos agroalimentarios...	130
5.3.	Modelización cinética en matraz Erlenmeyer.....	131
5.4.	Estudios en biorreactor	132
6.	Bibliografía.....	135
ANEXOS	147

Resumen

Producción de ácido fumárico con *Rhizopus arrhizus*

La necesidad del desarrollo de procesos industriales sostenibles ha llevado al concepto de biorrefinería, por el cual se usan materias primas renovables (biomasa) como punto de partida de procesos industriales. En el contexto de estos procesos el ácido fumárico está considerado uno de los productos químicos más prometedores para su obtención industrial, ya que tiene una amplia variedad de aplicaciones industriales que permitirían el desarrollo de una nueva industria sostenible en la valorización de biomasa, constituyendo una alternativa a la petroquímica.

Por esta razón, en este trabajo se ha abordado el estudio de un proceso fermentativo de producción de ácido fumárico a partir de residuos de fruta, ya que son ricos en azúcares fermentables. Para esta producción se utilizan determinados hongos filamentosos que son conocidos por ser los mejores productores naturales de ácido fumárico. La cepa *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526 ha sido la seleccionada para el desarrollo de este trabajo.

Debido a la necesidad de conseguir experimentos reproducibles, se ha dedicado un gran esfuerzo a la realización de estudios enfocados al desarrollo y control de la morfología del hongo, con el objetivo de tener una morfología estable, que nos permita desarrollar una metodología de trabajo útil y con reproducibilidad, debido a las particularidades del trabajo con hongos filamentosos. Una vez conseguida la morfología adecuada, se han desarrollado las técnicas de trabajo a utilizar en el resto de la investigación, tras lo cual, se han llevado a cabo estudios sobre la producción del inóculo, determinando las condiciones de operación más favorables para llevarlo a cabo, buscando siempre la mejora en la posterior fase productiva. Posteriormente se ha procedido a la mejora del proceso por medio de estudios sobre las condiciones de operación y formulación del medio de cultivo.

Se ha estudiado con profundidad la influencia del carbonato de calcio en el proceso, utilizado como controlador de pH y aporte de CO₂: desde su microcomposición hasta la distribución de tamaño de partículas y los sistemas de cristalización de distintos tipos de carbonato. También se ha estudiado la necesidad de la función y presencia de componentes minoritarios en el medio de cultivo empleado habitualmente en la bibliografía sobre la producción de ácido fumárico, y

como la eliminación de estos permite aumentar la producción de este ácido en el bioproceso.

Además, se han realizado estudios sobre la fuente de nitrógeno, determinando que las condiciones restrictivas de esta maximizan la producción de ácido fumárico. Una vez finalizados estos estudios relativos a la composición del medio de cultivo, se han obtenido unas condiciones de operación que proporcionan unos valores de rendimiento satisfactorios, observándose una mejora en la producción de ácido fumárico de un 177% respecto a los experimentos iniciales (0,46 g_FA/g_G consumida).

Posteriormente, se abordó el estudio relativo al empleo de hidrolizados de fruta como materia prima. Para ello se han obtenido y caracterizado hidrolizados de residuos de naranja y manzana, concluyendo que los más aptos para el desarrollo del proceso son los residuos de manzana, conocidos en inglés como *Apple Pomace*, si bien se ha detectado la presencia de ciertos compuestos en estos hidrolizados que provocan inhibición sobre el metabolismo fúngico.

Se han empleado los hidrolizados de fruta obtenidos en el proceso fermentativo, tanto a las condiciones determinadas anteriormente para medios sintéticos, como con nuevas condiciones de operación empleadas con el objetivo de mejorar el proceso y paliar los efectos de la inhibición detectada. A pesar de ello, se han logrado conseguir rendimientos en la producción de ácido fumárico muy próximos a los obtenidos con medios sintéticos y aun aceptables para el desarrollo del proceso (0,32 g_FA/g_G consumida).

Finalmente se han llevado a cabo experimentos de implantación del proceso en biorreactor. Gracias a este cambio de escala y al dispositivo utilizado, se ha podido desarrollar un estudio en profundidad del consumo y transferencia de oxígeno en el bioproceso, observando como altas velocidades de transferencia de oxígeno aumentan la velocidad de producción, pero apenas tienen efecto sobre la producción final o el crecimiento celular, aunque afectan notablemente a la selectividad a ácido fumárico del proceso. El estudio del consumo de oxígeno ha permitido apreciar el efecto de la muerte celular al final del bioproceso, lo que constituye una novedad.

Además de todos estos estudios, de forma paralela, se ha realizado la modelización cinética del bioproceso consiguiendo obtener un modelo cinético que reproduce muy adecuadamente las observaciones experimentales en las diversas condiciones de operación estudiadas. En este trabajo se presenta, por vez primera, una modelización completa del bioproceso que incluye el efecto del oxígeno

Summary

Fumaric acid production with *Rhizopus arrhizus*

The need for the development of sustainable industrial processes has led to the biorefinery concept, whereby renewable raw materials (biomass) are used as a starting point for industrial processes. In the context of these processes, fumaric acid is considered one of the most promising chemical products for industrial production, since it has a wide variety of industrial applications that would allow the development of a new sustainable industry in the revaluation of biomass, constituting an alternative to petrochemicals.

For this reason, in this work we have approached the study of a fermentative process for the production of fumaric acid from fruit residues, since they are rich in fermentable sugars. For this production, certain filamentous fungi are used, which are known to be the best natural producers of fumaric acid. The strain *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526 has been selected for the development of this work.

Due to the need to achieve reproducible experiments, a great effort has been dedicated to carry out studies focused on the development and control of the morphology of the fungus, with the aim of having a stable morphology, which allows us to develop a useful and reproducible work methodology, due to the particularities of working with filamentous fungi. Once the adequate morphology was obtained, the working techniques to be used in the rest of the research were developed, after which, studies were carried out on the production of the inoculum, determining the most favourable operating conditions to carry it out, always looking for the improvement in the subsequent productive phase. Subsequently, the process has been improved by means of studies on the operating conditions and formulation of the culture medium.

The influence of calcium carbonate in the process, used as pH controller and CO₂ supply, has been studied in depth: from its micro-composition to the particle size distribution and crystallization systems of different types of carbonate. The need for the function and presence of minority components in the culture medium commonly used in the literature on fumaric acid production has also been studied, and how the elimination of these components allows increasing the production of this acid in the bioprocess.

In addition, studies have been carried out on the nitrogen source, determining that the restrictive conditions of this one, allow maximizing the production of fumaric acid. Once these studies on the composition of the culture medium were completed, operating conditions were obtained that provide satisfactory yield values, with an improvement in fumaric acid production of 177% with respect to the initial experiments (0.46 g_FA/g_G consumed).

Subsequently, the study on the use of fruit hydrolysates as raw material was addressed. For this purpose, orange and apple waste hydrolysates have been obtained and characterized, concluding that the most suitable for the development of the process are apple wastes, known as Apple Pomace, although the presence of certain compounds in these hydrolysates that cause inhibition of fungal metabolism has been detected.

The fruit hydrolysates obtained in the fermentation process have been used, both at the conditions previously determined for synthetic media, and with new operating conditions used with the aim of improving the process and mitigating the effects of the inhibition detected. In spite of this, yields in fumaric acid production have been achieved very close to those obtained with synthetic media and still acceptable for the development of the process (0.32 g_FA/g_G consumed).

Finally, experiments have been carried out to implement the process in a bioreactor. Thanks to this change of scale and the device used, it has been possible to develop an in-depth study of oxygen consumption and transfer in the bioprocess, observing how high oxygen transfer rates increase the production rate, but have hardly any effect on the final production or cell growth, although they notably affect the selectivity of the process to fumaric acid. Studying the oxygen consumption has been possible to appreciate cellular death at the end of the bioprocess, which is a novelty.

In addition to all these studies, in parallel, the kinetic modelling of the bioprocess has been carried out, obtaining a kinetic model that reproduces very adequately the experimental observations in the different operating conditions studied. This work presents, for the first time a complete kinetic modelling of the bioprocess including the effect of the oxygen.

Abreviaturas y nomenclatura

Abreviaturas

AP	<i>Apple Pomace</i> : Residuos de manzana
APH	<i>Apple Pomace Hydrolysate</i> : Hidrolizado de residuos de manzana
ATP	Adenosín trifosfato
CAGR	<i>Compound Annual Growth Rate</i> : Tasa anual de crecimiento
CNME	Centro Nacional de Microscopia Electrónica
DAD	<i>Diode Array Detector</i> : Detector array de diodos
DES	<i>Deep Eutectic Solvent</i> : Disolvente eutéctico de bajo punto de fusión
DOE	<i>Department Of Energy</i> : Departamento de energía de EE. UU.
DPPH	2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo
EDS	<i>Energy Dispersion Spectroscopy</i> : Espectroscopia de dispersión de energía
FAPA	<i>Fumaric Acid for Polymer Application</i> : Ácido fumárico para aplicación en polímeros (proyecto de investigación)
FBRM	<i>Focused Beam Reflectance Measurement</i> : Medida de reflexión de haz concentrado
FOB	<i>Free Of Board</i> : Libre de transporte
FQPIMA	Físico-Química de Procesos Industriales y MedioAmbientales (grupo de investigación)
GMO	<i>Genetically Modified Organism</i> : Organismo modificado genéticamente
GRAS	<i>Generally Recognised As Safe</i> : Generalmente reconocido como seguro
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> : Cromatografía líquida de alta resolución
ICTS	Instalación Científico-Técnica Singular
ISA	<i>Ionic Strength Adjustment</i> : Ajuste de fuerza iónica (disolución)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NRRL	<i>Northern Regional Research Lab</i>

ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
ONU	Organización de las Naciones Unidas
OPW	<i>Orange Peel Wastes</i> : Residuos de piel de naranja
OPWH	<i>Orange Peel Wastes Hydrolysate</i> : Hidrolizado de residuos de piel de naranja
OTR	<i>Oxygen Transfer Rate</i> : Velocidad de transferencia de oxígeno
OUR	<i>Oxygen Uptake Rate</i> : Velocidad de consumo de oxígeno
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i> : Agar-patata
RID	<i>Refractive Index Detector</i> : Detector de índice de refracción
RMSE	<i>Root Mean Square Error</i> : Error cuadrático medio
r.p.m.	Revoluciones por minuto
r.p.s.	Revoluciones por segundo
SSF	<i>Solid State Fermentation</i> : Fermentación en estado sólido
SSR	<i>Sum of Squared Residuals</i> : Suma de residuos al cuadrado
TCA	<i>Tri-Carboxylic Acids</i> : Ácidos tricarboxílicos (ruta metabólica)
UCM	Universidad Complutense de Madrid
USD	Dólar estadounidense
vvm	<i>Volume Vessel per Minute</i> : Volumen de trabajo por minuto

Nomenclatura

%VE	Porcentaje de variación explicado
C	Parámetro pre-exponencial de correlación de transferencia de oxígeno [s ⁻¹ ·(m/s) ^{-α} ·(rps) ^{-β}]
F ₉₅	Parámetro de F de Fisher al 95% de confianza
K	Número de parámetros que posee un modelo
k _d	Constante cinética de muerte celular [gx/(L·h ²)]
k _E	Constante cinética de desaparición de etanol [g _E /(gx·h)]

k_F	Constante cinética de producción de ácido fumárico [$g_{FA}/(g_X \cdot g_I \cdot h)$]
$k_{L \cdot a}$	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno [h^{-1}, s^{-1}]
m_s	Coefficiente de mantenimiento celular [$g_G/(g_X \cdot h)$]
N	Número de datos experimentales o velocidad de agitación [r.p.s.]
r	Velocidad de reacción [$g/(L \cdot h)$]
t	Tiempo [h]
UI	Unidad de actividad enzimática
V_s	Velocidad superficial de paso de gas [m/s]
X_m	Parámetro de biomasa máxima en ecuación logística [g_X/L]
Y_{FrEn}	Rendimiento de fructosa respecto mantenimiento celular [g_{Fr}/g_G]
Y_{FrX}	Rendimiento de fructosa respecto crecimiento celular [g_{Fr}/g_G]
Y_{GX}	Rendimiento de glucosa respecto crecimiento celular [g_G/g_X]
Y_{IF}	Rendimiento de intermedio metabólico respecto ácido fumárico [g_I/g_{FA}]
Y_{IX}	Rendimiento de intermedio metabólico respecto crecimiento celular [g_I/g_X]
Y_{MF}	Rendimiento de ácido málico respecto de ácido fumárico [g_{MA}/g_{FA}]
Y_{NX}	Rendimiento de fuente de nitrógeno respecto crecimiento celular [$g_{Fuente \text{ de nitrógeno}}/g_X$]
Y_{O_2En}	Rendimiento de oxígeno respecto mantenimiento celular [g_{O_2}/g_G]
Y_{O_2Et}	Rendimiento de oxígeno respecto de etanol [g_{O_2}/g_{Et}]
Y_{O_2X}	Rendimiento de oxígeno respecto crecimiento celular [g_{O_2}/g_X]

Letras griegas

α	Exponente de velocidad de agitación en correlación de transferencia de oxígeno
β	Exponente de velocidad de superficial en correlación de transferencia de oxígeno

μ	Velocidad específica de crecimiento del microorganismo [h^{-1}]
μ_m	Velocidad específica de crecimiento del microorganismo en ecuación modificada de M'Kendrick y Pai [$\text{L}/(\text{g}_{\text{Fuente de nitrógeno}} \cdot \text{h})$]

Subíndices

Et	Referido a etanol
FA	Referido a Ácido fumárico
Fr	Referido a fructosa
G	Referido a glucosa
I	Referido al intermedio metabólico
MA	Referido a ácido málico
X	Referido a biomasa

1. Introducción

“El amor es física y química”

Severo Ochoa

1.1. Antecedentes

El progreso de la humanidad siempre ha ido de la mano del progreso científico, siendo la biotecnología una de las primeras herramientas que ha acompañado al ser humano en su camino del conocimiento.

Este desarrollo científico ha ido mejorando la calidad de vida de la población a lo largo de la historia, sobre todo desde la Revolución Industrial, a finales del s. XVIII, cuando la sociedad comenzó a entender que su progreso y bienestar estaban condicionados por el desarrollo tecnológico.

A lo largo del s. XX, y más concretamente, al finalizar la II guerra mundial, la ciencia y la industria experimentaron un crecimiento casi exponencial. Esto se debió al advenimiento de la energía nuclear y el desarrollo de la industria petroquímica¹. Estos avances repercutieron en el bienestar social de los países industrializados, desarrollándose una primera globalización con una internacionalización de la economía². Si bien, a finales de dicho siglo, comenzó a ser patente que este crecimiento experimentado no era ilimitado. Varias crisis económicas se sucedieron, entre ellas, la crisis del petróleo en los años 70, mostrando las primeras evidencias de la necesidad de un crecimiento sostenible y duradero³.

La conciencia ambiental ha ido en aumento en la sociedad desde los años 80 hasta las primeras décadas del s. XXI. En la búsqueda de un desarrollo sostenible, se han propuesto alternativas de modelos sociales e industriales^{3,4}. En estos años han surgido nuevas disciplinas, como la biotecnología (ya como disciplina científica) o la informática, que han conseguido transformar nuevamente la sociedad y ampliar la calidad de vida de las personas. Tienen, además, un gran potencial como herramientas para el desarrollo sostenible⁵.

Todo el progreso y bienestar social experimentado en el último siglo, se ha hecho siempre a costa de los recursos disponibles, generando ciertos problemas. Este desarrollo tuvo lugar sin tener en cuenta la sostenibilidad, poniendo el foco en crecer, pero no observando el cómo ni las consecuencias (al menos las conocidas) que algunas prácticas acarrearán^{1,6}.

Las principales fuentes de energía y recursos en las que se han basado estas sociedades, desarrolladas a lo largo del s. XX y comienzos del s. XXI han sido el petróleo, el gas natural y el carbón, todos recursos no renovables. Estas materias primas son los pilares sobre los que se sustenta la industria a nivel global. Estos

productos fósiles suponen tanto una fuente de energía (o combustibles) como una materia prima de la que se extraen y/o producen infinidad de compuestos de interés industrial, tanto *commodities* como *building blocks*^{1,7}. Este uso intensivo de ambos ha generado una dependencia fundamental en la sociedad, que tiene que buscar alternativas si quiere garantizar una consolidación sostenible de los progresos experimentados, aplicados a materias primas distintas, abundantes y renovables⁸.

Asimismo, el uso del petróleo y el gas natural como fuentes de energía y materias primas conlleva serios problemas medioambientales: desde los vertidos y emisiones generados en la extracción de estos, pasando por posibles y potenciales problemas industriales derivados del procesamiento, manipulación y transformación de estos en sustancias muy peligrosas⁹. Además, de los problemas ocasionados por el consabido cambio climático^{10,11}.

También existe la problemática surgida del uso de los productos obtenidos, como puede ser la miríada de componentes nocivos generados en la combustión para obtención de energía, uso en el transporte, o incluso calefacción¹¹. Respecto a los vertidos materiales, destaca recientemente el problema de la existencia de microplásticos en la mayoría de los ecosistemas, incluso encontrados en el tracto digestivo de personas y animales¹².

Aparte de todos estos inconvenientes, derivados del uso de estos productos energéticos, la industria petroquímica y los procesos de extracción de recursos fósiles son muy perjudiciales para el medioambiente, generando gran cantidad de emisiones atmosféricas y vertidos a acuíferos, siendo potencialmente peligrosas en caso de accidente⁹. En ocasiones se producen vertidos o fugas que pueden ser fatales para ciertos ecosistemas, tal y como ocurrió en el año 2002 con el petrolero *Prestige* en las costas de Galicia¹³.

Sin embargo, el mayor y más conocido problema generado por el uso intensivo del petróleo a lo largo del último siglo, es el calentamiento global, que está generando una crisis climática sin precedentes¹¹. Este cambio climático se debe a la acumulación de gases de efecto invernadero (principalmente al CO₂, por la enorme cantidad emitida) en concentraciones superiores a las existentes naturalmente. Estas emisiones hacen que el efecto invernadero se dé de manera excesiva, y con ello, el clima global se está vea afectado¹¹.

La temperatura media de la tierra lleva elevándose inexorablemente desde el inicio de las revoluciones industriales (Figura 1.1a)¹⁴. Esto es debido a la creciente

necesidad de energía de las sociedades postindustriales. Esta energía clásicamente se ha suministrado por medio de combustibles fósiles como el carbón, en primer lugar; y el petróleo desde la II guerra mundial, de hecho, tanto las emisiones de los gases de efecto invernadero como la temperatura se han visto significativamente aumentadas desde el advenimiento de la industria petroquímica, en la década de 1940 (Figura 1.1b)^{1,15,16}.

Dentro de estas emisiones, la que más está contribuyendo al cambio climático es el CO₂¹⁵, ya que es el producto principal de la combustión de los derivados del petróleo y el gas natural. Aunque también existen otros compuestos emitidos que tienen mayor potencial de efecto invernadero como puede ser el metano (CH₄); el dióxido de carbono es el más emitido y el que está generando mayores problemas¹⁷.

Aparte de la problemática ambiental, existen también problemas a otros niveles: desde conflictos sociales, como guerras por el control de reservas y garantizar abastecimiento, hasta las crisis económicas generadas por la variabilidad de precios⁶.

Basar la actividad económica en recursos no renovables no es sostenible a largo plazo, ya que, tarde o temprano, se acabarán las reservas de estos⁶. Este hecho, ligado a la creciente demanda de materias primas en los países emergentes hace que se deban de buscar alternativas a la economía lineal clásica¹⁸.

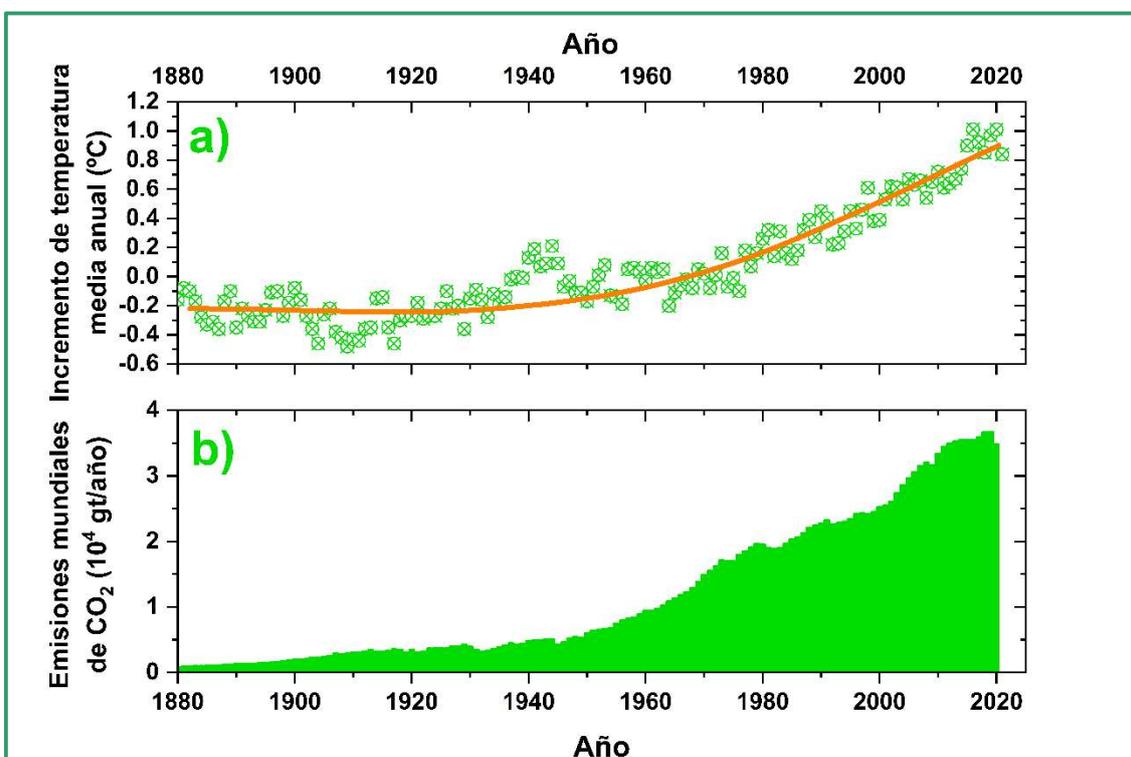


Figura 1. 1: a) Fluctuación de la temperatura media de la Tierra en el último siglo¹⁴. b) Evolución de emisiones de CO₂ en el último siglo¹⁵.

Ante estas situaciones tan acuciantes, es necesario un modelo social basado en el desarrollo sostenible que permita el crecimiento económico y el progreso social^{10,11}, basándose en el respeto hacia el medioambiente, conociendo, midiendo y controlando las consecuencias. Debe basarse la producción industrial y energética en medios renovables, capaces de garantizar el mantenimiento respetuoso del sistema a largo plazo, con mínimas consecuencias^{6,10,11}.

En este contexto surge la economía circular, concepto basado en el reciclaje y reutilización de recursos, que propicia el avance hacia un modelo de desarrollo sostenible, donde el crecimiento económico y el progreso social vayan de la mano, a la vez que se sea totalmente respetuoso con el planeta, los ecosistemas y se haga un consumo responsable y sostenible de los recursos disponibles^{1,19}.

Así pues, se busca la sustitución de los recursos no renovables (sobre todo del petróleo) por recursos capaces de regenerarse en periodos razonables de tiempo, a través de una explotación sostenida y responsable, de esta manera se consigue adecuar y sincronizar las demandas de la industria y la sociedad a los ciclos naturales, como los del agua o el carbono^{1,3}.

En esta economía circular es vital el concepto de reciclaje. Este permite que las sustancias catalogadas como residuos puedan ser aprovechadas como materia prima en distintos procesos¹⁶. De esta manera, se elimina parcialmente la necesidad de la gestión de residuos (y sus consiguientes gastos), por parte de ciertas industrias sobre ciertas sustancias; ya que los residuos (o parte de ellos) generados por una industria suponen la materia prima de otras, que a su vez generan productos o prestaciones útiles en la industria y la sociedad. Los posibles residuos generados por estas nuevas industrias pueden ser, a su vez, revalorizados en otras industrias y así sucesivamente, generando una industria cíclica¹⁶.

Esta alternativa presenta multitud de estrategias para su implantación, ya que, al reciclarse gran variedad de materiales, se implican gran variedad de procesos y alternativas para su reciclado. Ciertos materiales como el vidrio o metales como el aluminio, son casi infinitamente reciclables^{19,20}. Sin embargo, otros materiales como el papel son reciclables hasta cierto punto, lo que implica generar estrategias para combinar el reciclado con producto nuevo, lo que permitiría un consumo programado y responsable^{20,21}.

Ante la necesidad del desarrollo sostenible, la Organización de las Naciones Unidas (ONU) estableció en 2015 los 17 Objetivos para el Desarrollo Sostenible

(ODS), constituyendo un plan de acción a cumplir en 15 años, denominado Agenda 2030. Estos objetivos, enumerados en la Figura 1.2, son transversales y se orientan a todos los aspectos de las sociedades. Se ha hecho un llamamiento a toda la humanidad para colaborar en la consecución de estos objetivos y así poder hacer frente a la creciente pobreza y desigualdad, consolidar el empoderamiento de niñas y mujeres y afrontar la crisis climática²².

Dentro del presente campo de estudio, se enmarcarían directamente varios de estos objetivos, como son el número 7, 9, 12 y 13. Sin embargo, secundariamente otros objetivos se verían parcialmente abordados, como son el 6, el 14 y el 15. Por último, hay un par de objetivos, totalmente transversales, en los que se contribuiría, aunque no estén totalmente relacionados, como son los objetivos 2 y 3²².

En este contexto de desarrollo sostenible del progreso científico y económico, hay una herramienta con alto potencial: la biotecnología, que se define como la aplicación de distintos sistemas, técnicas y conocimientos de las ciencias físicas, químicas y biológicas, aplicadas sobre soluciones tecnológicas, con el objetivo de crear, modificar o desarrollar productos o procesos, ofreciendo soluciones específicas a problemas o retos planteados²³.

Este es un ámbito científico-técnico amplio y multidisciplinar que engloba diversas materias, desde la ingeniería genética hasta la ingeniería química, pasando por la fisiología vegetal, la enzimología o la microbiología, entre muchas otras.



Figura 1. 2: Objetivos de Desarrollo Sostenible²⁴.

Aunque las aplicaciones biológicas para usos tecnológicos o prestacionales se llevan empleando desde los inicios de la civilización²³, siendo una de las primeras tecnologías desarrolladas; el origen de la biotecnología como disciplina se produce en el s. XX. El desarrollo de la ingeniería genética, en los años 80, puso el foco sobre todas las posibilidades que podían brindar la biología y la bioquímica, debido tanto a la diversidad natural como artificial que estaba comenzando a gestarse¹⁶.

Al ser una tecnología multidisciplinar, la biotecnología tiene varias ramas en función de las aplicaciones y puntos de vista que se apliquen. Así pues, se definen diversos tipos de biotecnologías, como puede verse en la Figura 1.3.

Las distintas ramas se nombran por colores, distinguiéndose las ramas más conocidas como la roja (médica), blanca (industrial), azul (marina), amarilla (alimentaria) o gris (ambiental). Existen otras ramas menos conocidas o derivadas de estas principales, como puede ser la biotecnología marrón (remediación de suelos) o la naranja (educativa), más transversal²³.



Figura 1. 3: Distintas ramas de la biotecnología.

Dentro de todas estas disciplinas, cabe destacar la biotecnología blanca, enfocada en las aplicaciones industriales de los procesos biotecnológicos. Estos procesos son llevados a cabo principalmente por enzimas o microorganismos, siendo estas las bio-factorías más comunes^{23,25}. Estas se han empleado a gran escala durante varias décadas. En ambos casos, pueden ser obtenidos debido a la biodiversidad natural existente, siendo seleccionadas las mejores cepas para tener las productividades y condiciones de operación más indicadas. No obstante, debido al auge de la ingeniería genética y las nuevas técnicas de edición génica (como CRISPR), pueden conseguirse nuevas especies mejoradas, con el objetivo de tener especificidades mejores y procesos más sencillos^{26,27}.

Además, se están comenzando a desarrollar procesos usando otras bio-factorías como plantas o células animales (principalmente de mamíferos). Con estas se obtienen determinados productos específicos de alto valor añadido con aplicaciones biomédicas.

A la vista de todas las posibilidades que ofrecen los procesos biotecnológicos aplicados en la industria, la biotecnología puede entrar en sinergia con el concepto de biorrefinería, cuyo objetivo es desarrollar una industria basada en recursos renovables, siendo capaz de complementar, ahora, y llegar a sustituir a largo plazo la actual industria química pesada, cimentada en el petróleo como principal materia prima^{7,28}.

1.2. Biorrefinerías

Las biorrefinerías surgieron en los años 70, a raíz de la crisis del petróleo, con el objetivo de desarrollar alternativas para la obtención de combustibles. El concepto se basa principalmente en el uso de biomasa como materia prima renovable.

Esta biomasa, al tratarse, proporciona productos de alto valor añadido o sustratos apropiados para otros procesos de transformación^{29,30}. Dichos procesos tienen una naturaleza muy ecléctica. Desde procesos físicos o químicos²⁹, hasta la aplicación de soluciones biotecnológicas^{31,32}, ofreciendo una amplia amalgama de materias primas alternativas al petróleo.

El desarrollo de este tipo de procesos supone una gran oportunidad, ya que se proponen procesos industriales con materias primas a coste muy bajo^{7,33}, a la vez que

son ambientalmente estables, revalorizan residuos y reducen la dependencia industrial y social de recursos no renovables.

En función del tipo de biomasa usada como materia prima, se han ido sucediendo distintas generaciones de biorrefinerías¹:

La primera generación de biorrefinerías aprovechaba directamente biomasa procedente de cultivos ricos en almidón y azúcares (cultivos también usados en alimentación)⁷. Esta biomasa es ideal para su uso en procesos microbianos, ya que, empleando pretratamientos sencillos, se obtenían los medios de cultivo necesarios para llevar a cabo estos procesos³¹. En esta primera generación de biorrefinerías se desarrollaron multitud de procesos para la obtención de biocombustibles como biodiesel o bioetanol, siendo estos los productos más clásicos y comunes en las biorrefinerías¹.

Sin embargo, surgió un dilema moral en la implantación a nivel industrial de estos procesos, ya que se estaban utilizando cultivos alimentarios para obtener combustibles, generando un problema ético, al existir escasez de alimentos en ciertas regiones del planeta. Además, es difícil que la biomasa alimentaria sea, por sí sola, capaz de sustituir los recursos materiales ahora utilizados en refinerías y petroquímicas. Para solventar estos problemas se está desarrollando una segunda generación de biorrefinerías, utilizando otro tipo de cultivos, obligatoriamente no destinados a alimentación⁷. Entre estos nuevos cultivos se están promoviendo y seleccionando aquellos de rápido crecimiento y con bajo requerimiento de recursos, para no desplazar a los cultivos alimenticios³¹.

Las biorrefinerías de segunda generación surgieron en los años 90 en el seno de la industria papelera, con la idea de realizar una total valorización de todos los materiales que intervienen en sus procesos de producción.

Esta segunda generación también aprovecha los residuos agroindustriales de tipo biomásico como materias primas^{1,4,31}, englobando materiales de diversa procedencia, desde residuos agrícolas tales como restos de podas, pajas, tallos u hojas^{34,35}; hasta residuos de distintos alimentos⁷, tales como frutas, provenientes de la industria alimentaria^{29,31}.

Las biomásas de segunda generación exigen pretratamientos mucho más intensivos y específicos para poder ser aprovechadas. También requieren una investigación más profunda en los procesos, ya que no todos los procesos son

adecuados para cada biomasa, dada la amplia variedad, en estructura y, a veces, en composición, de cada materia prima⁷. Incluso, varios componentes de la biomasa lignocelulósica son perjudiciales para ciertos procesos biocatalíticos y catalíticos; por ejemplo, las ligninas u otros componentes aromáticos de los residuos son inhibidores de los procesos de sacarificación, fermentación y de varios procesos catalíticos ⁴.

Uno de los recursos materiales más generales usados en biorrefinerías de segunda generación son los materiales lignocelulósicos; obtenidos en gran cantidad de diversas industrias como la agroalimentaria, la papelera o la maderera. Estos residuos están siendo ampliamente estudiados y se están desarrollando una gran cantidad de procesos para su tratamiento y posterior aprovechamiento, tales como el tratamiento alcalino, la *steam explosion* o el método *organosolv*^{29,36} (Figura 1.4).

En los últimos años ha surgido una nueva posibilidad: la tercera generación de biorrefinerías, relacionada con el aprovechamiento de los recursos marinos. Estas biorrefinerías se están desarrollando principalmente a partir de la floreciente biotecnología de microalgas y cianobacterias¹⁶.

Además, con el desarrollo de la ingeniería genética, las aplicaciones biotecnológicas más punteras se están introduciendo en el ámbito de las biorrefinerías; los organismos modificados genéticamente (GMOs: *Genetically Modified Organisms*) han comenzado a usarse en este tipo de procesos, dando lugar a la denominada cuarta generación de biorrefinerías.

Esta nueva generación se basa, en buena parte, en procesos desarrollados o en desarrollo en la segunda y tercera generación de biorrefinerías, aplicando multitud de modificaciones sobre microalgas y cianobacterias, y también sobre plantas. Estas modificaciones van dirigidas a la producción de bioproductos y biocombustibles de manera muy versátil. Al mismo tiempo, al ser microorganismos fotosintéticos, pueden captar CO₂ atmosférico y fijarlo para la producción de los bioproductos¹⁶. Incluso, esta capacidad de captación de carbono puede ser maximizada, obteniendo aplicaciones muy prometedoras, tanto en biorrefinerías, como en el tratamiento de aguas¹⁶.

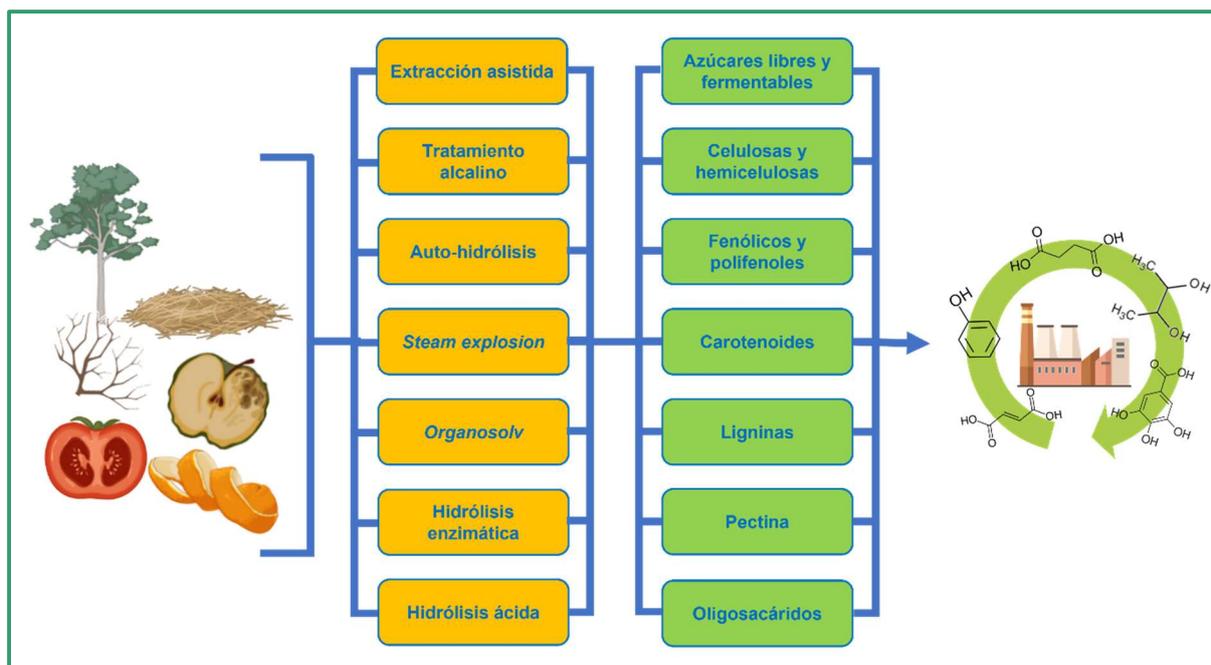


Figura 1. 4: Posibles procesos de valorización de biorrefinerías de segunda generación.

1.3. Residuos de fruta como materia prima

La industria alimentaria supone una excelente fuente de biomasa susceptible de aprovecharse como materia prima para biorrefinerías de segunda generación. Dentro de esta industria podrían destacarse las relacionadas con frutas, tales como las industrias de zumos y bebidas. Los restos de fruta excedentes de estas manufacturas suelen ser gestionados como subproductos, generando de esta manera, la posibilidad de tener materias primas a muy bajo coste. Por otro lado, la composición de estos residuos es alta en azúcares y materiales celulósicos. Por medio de pretratamientos sencillos y consolidados, pueden extraerse distintas fracciones aprovechables en procesos fermentativos, abriendo así un amplio abanico de posibilidades de producción.

Además, los residuos de fruta son ricos en ciertos compuestos de interés industrial por su alto valor añadido. Como puede verse en la Figura 1.4, hay una amplia gama de productos directamente extraídos de residuos de fruta con aplicación directa en el mercado o la industria, tales como aceites esenciales u aromas, muy apreciados en industrias de especialidades como la cosmética³⁰. En el presente trabajo, se ha centrado la atención sobre los residuos provenientes de dos frutas en particular: naranja y manzana.

La naranja, con una producción mundial superior a las 73,31 Mt/año (2017)³¹, es la fruta cítrica más producida del planeta, destacando Brasil como su mayor productor, seguido de cerca por varios países de la cuenca mediterránea. La mayor parte de esta producción es para consumo alimentario, ocupando un lugar preponderante la industria de zumos. Esta industria genera gran cantidad de residuos de naranja, que suponen una gran oportunidad como posible materia prima en biorrefinerías de segunda generación.

Los residuos de naranja están compuestos básicamente de la piel y pulpa, remanentes del proceso de exprimido, comúnmente son conocidos como *Orange Peel Wastes* (OPW). Este residuo está desaprovechado en gran medida, ya que sus principales aplicaciones se basan en su compostaje o en su uso como alimento de ganado. Este hecho convierte a los OPW en un candidato muy ventajoso sobre el que basar una producción de biorrefinería, ya que se puede hacer una revalorización integral del residuo, siendo muchos de los productos obtenidos muy rentables. Sin embargo, los OPW deben ser previamente sometidos a un proceso de extracción para obtener compuestos de alto valor añadido, como son sus aceites esenciales³¹.

Por su parte, la manzana es la fruta más consumida a nivel mundial, además es considerada como una de las mayores fuentes de antioxidantes en la dieta humana³⁷. En ciertos países como Alemania, supone el producto alimentario más producido y consumido; tanto en consumo directo como indirecto, a través de distintos alimentos procesados o bebidas, como zumos o sidra^{29,38}. No es de extrañar pues, que ante tal cantidad de procesado se obtengan grandes cantidades de residuos, entre 200 y 250 kt/año³⁸. Estos residuos son conocidos como *Apple Pomace* (AP). Están compuestos principalmente de peladuras y parte de pulpa de manzana sobrante del proceso de obtención del zumo. Además, en muchas industrias, también se obtienen sólidos de sedimentación como residuo del proceso de clarificación del zumo, que usualmente forman parte del AP.

Debido a la diversa naturaleza de los residuos con los que se va a trabajar, se deberán efectuar distintos procesos para el tratamiento de las materias primas. Con el fin de llevar a cabo un proceso fermentativo, la hidrólisis enzimática de los residuos es una buena opción para evitar la formación de huminas y furfurales propia de los procesos de sacarificación ácida³⁹. La sacarificación enzimática tiene como objetivo la liberación de todos los azúcares simples (monosacáridos) contenidos

en los residuos mediante la hidrólisis de celulosa y hemicelulosas, que son los componentes mayoritarios de los OPW y AP.

Sin embargo, la hidrólisis de estos residuos para obtener los denominados *Orange Peel Wastes Hydrolysate* (OPWH) y *Apple Pomace Hydrolysate* (APH) puede presentar ciertos problemas. Estos candidatos a medio de fermentación estarán compuestos de mezclas de distintos azúcares en distintas concentraciones. Tendrán también una cierta carga de compuestos antioxidantes, fenólicos y aceites esenciales, que son compuestos tóxicos y que generan inhibición sobre los microorganismos con los que se vaya a realizar el proceso fermentativo⁴⁰⁻⁴²; como por ejemplo el limoneno³¹, un compuesto muy presente en las frutas cítricas. Por eso mismo, es conveniente llevar a cabo procesos de detoxificación y extracción de estos compuestos potencialmente tóxicos para obtener un medio de cultivo viable para la fermentación^{41,43}.

Además, la extracción previa de estos compuestos es una forma muy conveniente de valorizar más el proceso de biorrefinería, como se ha comentado previamente, estos compuestos son de alto valor añadido y muy preciados en ciertas industrias^{29,30}.

Por tanto, un primer paso muy conveniente sería la extracción de los aceites esenciales, con disolventes, practicada directamente sobre los residuos. Esta extracción da lugar a una fase líquida con alta carga en estos compuestos de interés. Para este proceso de extracción se han probado multitud de disolventes, desde agua a otros disolventes como acetona, etanol, etilenglicol o propilenglicol²⁹; también mezclas de alguno de estos disolventes en agua en distintas proporciones²⁹. Incluso se está investigando el uso de disolventes eutécticos de bajo punto de fusión (DES o *Deep Eutectic Solvents*) como alternativa sostenible y eficaz para estos procesos de extracción^{44,45}.

Por otro lado, se obtiene un sólido ya extraído y con una baja carga en estos compuestos. Este sólido se encuentra en unas condiciones más favorables para su hidrólisis. Por un lado, tiene bajo contenido en compuestos potencialmente tóxicos, por otro lado, se trata de un sólido seco, con un volumen específico menor, lo que hace su manipulación mucho más fácil (Figura 1.5)^{29,46}.



Figura 1. 5: Tratamientos de residuos de frutas en biorrefinería.

El contenido de estos hidrolizados en compuestos potencialmente tóxicos puede ser elevado. Por ello, antes de su uso, se debe llevar a cabo un proceso de detoxificación para tener unas condiciones idóneas para llevar a cabo el proceso fermentativo^{41,43}.

1.4. Ácido fumárico

El ácido (E)-2-butenodioico ($C_4H_4O_4$), comúnmente conocido como **ácido fumárico**, debe su nombre a la planta de la cual fue aislado por primera vez en 1832, *Fumaria officinalis*. Es un di-ácido orgánico de cuatro carbonos con un doble enlace simétrico en la posición 2 (Figura 1.6).

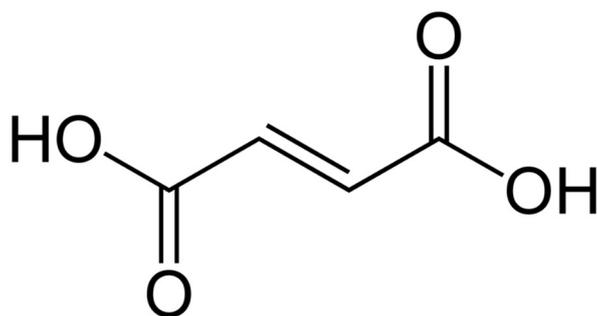


Figura 1. 6: Estructura del ácido fumárico

La presencia de este doble enlace puede dar lugar a dos posibles isómeros: si el doble enlace hace que los grupos ácidos estén al mismo lado de la molécula (posición cis) se tiene el ácido maleico, isómero del ácido fumárico, siendo este último la forma trans. Esta diferencia de conformación proporciona propiedades muy

distintas en ambos ácidos. El ácido fumárico al ser más lineal y tener menores impedimentos estéricos, puede cristalizar en sistemas más compactos y estables que el ácido maleico. Estas características estructurales se aprecian en ciertas propiedades físicas. Afecta tanto a las propiedades más clásicas como el punto de fusión, como a otras propiedades como la solubilidad.

La solubilidad del ácido fumárico en agua es característica por ser muy limitada a temperatura ambiente. En condiciones estándar, su límite de solubilidad es de 7 g/L; esta propiedad, si bien es muy sensible a la temperatura, viendo incrementado varias veces su valor en intervalos de temperatura moderados (≈ 10 °C).

Además, el ácido fumárico es una sustancia muy hidrofóbica; bastan concentraciones moderadas de ácido fumárico en agua para cambiar el menisco de la solución de cóncavo a convexo.

En cuanto a propiedades químicas se refiere, es un ácido débil, con pKs próximos entre ellos ($pK_1= 3,03$; $pK_2= 4,44$), lo que le da cierto poder tamponador. Esta propiedad se ve reflejada en sus aplicaciones². Esta cualidad también es función de su ya mencionada estructura química, ya que el ácido maleico tiene pKs más alejados, proporcionando unas propiedades químicas distintas.

Macroscópicamente, en su forma pura, es un sólido blanco, inodoro y muy higroscópico. Suele poseer pequeños tamaños de partícula y presenta bastante electricidad estática, lo que dificulta su manipulación^{4,47}.

Es habitual encontrarlo tanto en su forma pura, como también en forma de fumaratos; sales tanto uni- como divalentes que suelen ser bastante insolubles, dándose por la combinación con metales como hierro, potasio, sodio o calcio^{2,47}.

1.4.1. Aplicaciones

Debido a sus propiedades físicas y químicas, el ácido fumárico tiene muchas aplicaciones en diversidad de áreas.

El ácido fumárico es catalogado por el Departamento de Energía de Estados Unidos (DOE: *Department Of Energy*) como una de las sustancias más prometedoras para ser producidas por procesos fermentativos, a través de biorrefinerías⁴⁸. Esta designación viene motivada por sus múltiples aplicaciones en la industria química,

siendo un potencial *building block*: un compuesto intermedio en la industria química, a partir del cual pueden obtenerse una amplia gama de productos de diferente naturaleza, con muy diversas aplicaciones³⁵.

Los productos obtenidos a partir del ácido fumárico pueden clasificarse en dos amplios grupos:

- ❖ Compuestos obtenidos directamente por modificación química: Tetrahidrofurano (THF), 1,4-butanodiol, γ -butirolactona, pirrolidonas, esterés, diaminas, 4,4-bionolle o ácido hidroxibutírico.
- ❖ Derivados insaturados del succinato: Plastificantes, resinas, *crosslinkers* o polipirrolidonas⁴⁸.

Todos estos compuestos obtenidos a partir del ácido fumárico son esenciales en la industria de materiales. Se usan directamente como monómeros, como intermediarios o como precursores en muchos procesos de obtención de polímeros. Destacan los poliuretanos (1,4-butanodiol) y polivinilos (pirrolidonas), siendo también reactivos típicos en la obtención de resinas⁴⁸.

Destacable es también su uso en la condensación de polioles y poliácidos para generar nuevos materiales. También resinas alquídicas, muy importantes en la fabricación de materiales usados en distintos tipos de revestimientos. Además, también se usa como precursor de aditivos para mejorar propiedades de los materiales poliméricos (como entrecruzantes o *crosslinkers*) o, incluso, en la obtención de materiales compuestos⁴.

Otros productos derivados del ácido fumárico se usan directamente como disolventes en tintes, pinturas plásticas, pegamentos o barnices, llegando a tener aplicación directa en cartuchos de impresión⁴⁹.

A parte de todas estas aplicaciones en la industria química, los compuestos obtenidos a partir de ácido fumárico poseen propiedades terapéuticas muy demandadas en la industria farmacéutica; teniendo efectos anti-carcinogénicos, antiinflamatorios y neuro-protectores⁵⁰. Destaca el caso de *racetam*, una familia de fármacos con múltiples usos: nootrópicos, anticonvulsivos, ...^{48,51}. También destaca el ácido hidroxibutírico, que se emplea como tratamiento del insomnio y como neuroprotector⁵¹.

No obstante, el ácido fumárico no solo se emplea como *building block* en la industria, de hecho, como puede verse en la Figura 1.7, tiene su principal aplicación

en la industria alimentaria (32%)^{52,53}, donde se usa como acidulante, corrector del pH, antimicrobiano y antioxidante^{2,53}. Es un aditivo alimentario ampliamente empleado y reconocido como GRAS (*Generally Recognised As Safe*: Generalmente reconocido como seguro), cuyo código es E-297⁵⁴. Su extenso uso se debe, sobre todo, a sus propiedades químicas, siendo un ácido relativamente fuerte y con cierto poder tamponador, se requieren dosis muy moderadas del mismo para corregir el pH de los alimentos.

Además, cuenta con la ventaja de que no interfiere mucho en el sabor de alimentos (simplemente una ligera nota picante, según cata), siendo un perfecto aditivo para bebidas⁵⁴. Es ampliamente utilizado en productos cárnicos procesados o congelados como beicon, salchichas o carnes ahumadas. También en varios productos lácteos como quesos, donde se emplea como estabilizante y conservante. Incluso se usa en otros productos como, por ejemplo, en la industria del chocolate⁵⁵.

A pesar de su aplicación directa para la industria alimentaria en ella también se usa una vez más como *building block*, ya que es precursor de la síntesis de otros ácidos como son el L-aspartico y el L-málico, ampliamente usados en bebidas e industria cosmética^{2,10,56}.

En esta última, el ácido fumárico también es ampliamente usado como corrector de acidez y como texturizante para cremas y geles. Se aprovechan sus propiedades físicas y terapéuticas, ya que su uso es beneficioso en tratamientos cutáneos⁵⁰.

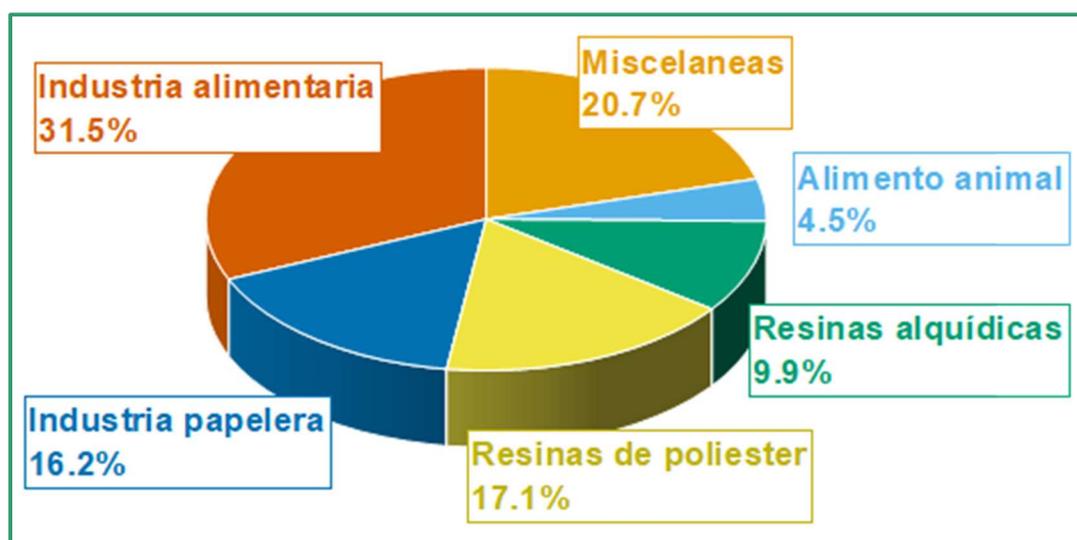


Figura 1. 7: Aplicación del ácido fumárico en distintas industrias⁵⁷.

En la industria papelera, el ácido fumárico tenía su segunda mayor aplicación industrial, usado como agente de calibrado. Sin embargo, este uso está siendo progresivamente relegado, debido a la implantación del tratamiento alcalino^{4,21}.

Terapéuticamente, el ácido fumárico y sus ésteres tienen multitud de aplicaciones en medicina. Su uso en enfermedades cutáneas, como la psoriasis, está bastante consensuado, incluso se están explorando nuevas aplicaciones en campos como la inmunología o la neurología^{50,51}. La *US Food and Drug Administration* reconoce el dimetil fumarato como un tratamiento para la esclerosis múltiple (*encephalomyelitis disseminata*), enfermedad crónica inflamatoria autoinmune del sistema nervioso⁵⁸.

Sin embargo, una de las aplicaciones más novedosas del ácido fumárico es como suplemento alimenticio del ganado bovino. Se ha demostrado que su uso reduce en un 70% las emisiones de metano provocadas por la actividad ganadera, que suponen un 95% de las emisiones totales de metano^{2,17,59}.

En los últimos años el ácido fumárico ha generado interés como producto de biorrefinería, debido a su aplicación en la industria de polímeros^{21,60}. Este aspecto ya se ha comentado previamente; sin embargo, se están desarrollando aplicaciones nuevas, relacionadas con la producción de plásticos biodegradables, en los que el ácido fumárico puede actuar como comonomero o como *crosslinker*; aportando propiedades muy características, sobre todo robustez e impermeabilidad^{2,21}.

Además de esto, también puede usarse como aditivo en materiales celulósicos, combinando las propiedades de estos materiales con la hidrofobicidad e impermeabilidad que aporta el ácido fumárico²¹. Estas propiedades suponen un nuevo horizonte en embalajes, sobre todo de productos alimentarios. Se reduce así el uso de polímeros procedentes del petróleo y haciendo más sostenible a la industria del embalaje alimentario, crítica en la preservación de alimentos.

1.4.2. Mercado y viabilidad

Como todo producto químico de base, el ácido fumárico posee un bajo precio de mercado: entre 1.280 y 1.700 USD/ton como precio FOB (*Free On Board*: Libre de transporte)⁵⁷. Este bajo coste se debe en parte a los costes de fabricación, involucrando la adquisición, tratamientos y transformación de las materias primas, así como su ulterior purificación^{28,59,61}. Este precio oscila en función del grado de

pureza. Así pues, dependerá del propósito para el que se quiera utilizar el producto, si se requiere un alto grado de pureza para aplicaciones en la industria de polímeros, en la industria farma-cosmética o en aplicaciones alimentarias; o si se requiere un grado más técnico, como pueda ser en la industria papelera^{4,28}.

Sin embargo, este precio no es solo debido a aspectos tecno-económicos; sino también a factores puramente de mercado, siendo el más destacable su alta oferta en el mercado. En 2012 se produjeron a nivel mundial 225,2 kton de ácido fumárico^{4,61}, cifra que se ha visto aumentada a lo largo de la década, siendo su producción de 255 kton en 2021⁵². Si bien es verdad que la producción ha aumentado, la proyección de crecimiento del mercado del ácido fumárico no ha cumplido completamente las expectativas esperadas, debido al contexto económico de los últimos años. Sin embargo, se espera que en los próximos años esta tasa crezca enormemente: mientras que en el periodo 2014-2020⁵² se tenía una tasa anual de crecimiento (CAGR: *Compound Annual Growth Rate*) del 2,90%, la previsión para esta tasa se ha visto aumentada al 3,88% para el periodo 2022-2027⁵³.

Esta tasa de crecimiento reforzada se da sobre todo en el principal uso del ácido fumárico, la industria alimentaria. Últimamente se buscan aditivos lo más naturales y sostenibles posibles, que sean efectivos a bajas dosis y no intervengan en las propiedades organolépticas de los alimentos^{28,54,62}. En este contexto el ácido fumárico cumple todos los requisitos, por esta razón, se espera que su demanda sea creciente a lo largo de la presente década. Además, también se espera que la industria use cada vez más esta molécula, ya sea para la obtención de nuevos materiales, o su empleo como precursor de otras sustancias con mercados emergentes^{52,63}. Destaca el ejemplo del ácido L-aspártico, cuya tasa de crecimiento evoluciona en paralelo a la del ácido fumárico (al ser este su precursor industrial) y que tiene una prometedora proyección de mercado^{10,64}.

El consumo geográfico del ácido fumárico, como puede verse en la Figura 1.8, está claramente polarizado en la región Asia-Pacífico, destacando la República Popular China como el principal consumidor a nivel global, siendo el responsable de casi la mitad del mercado del ácido fumárico⁵³. Estos hechos se deben principalmente a dos razones: la primera es que China en particular y la región Asia-Pacífico en general están consideradas “la fábrica del planeta”, en ellas se localizan la mayoría de las manufacturas¹⁸. Esto es debido al proceso de globalización y externalización de la industria llevado a cabo a finales del s. XX, donde multitud de empresas

trasladaron su producción a países del sudeste asiático. Por esta razón, debido a los requerimientos de estas factorías, esta región es la principal consumidora de *building blocks*^{52,53}. Destacando la importancia en esta región de la industria de polímeros y materiales plásticos, como las resinas alquídicas^{18,59}.

La segunda razón de este consumo tan notable, es que la región Asia-Pacífico y China es la zona más poblada y con mayor densidad de población del planeta, esto hace que el consumo de alimentos, sobre todo procesados, sea muy superior al del resto de regiones^{18,53}. Al ser el ácido fumárico ampliamente utilizado en alimentos procesados, su consumo es tan acusado en estas regiones⁵².

Además, a la vista de las Figuras 1.7 y 1.8, destaca como la segunda mayor aplicación del ácido fumárico su uso en la industria papelera relacionada con la colofonia^{18,65,66}. Teniendo en cuenta que China es una de las grandes productoras de papel a nivel mundial y que solo este país abarca el 90% del mercado de la colofonia, no es de extrañar que casi la mitad del consumo mundial de ácido fumárico sea debido al gigante asiático^{18,65,66}.

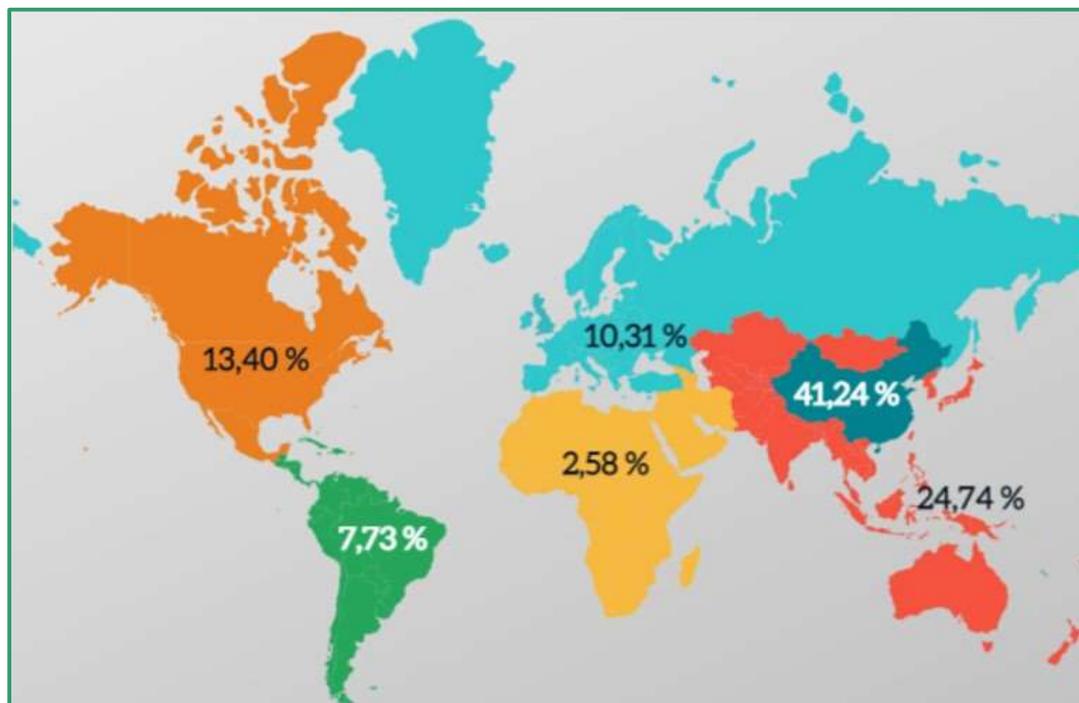


Figura 1. 8: Consumo de ácido fumárico en distintas regiones⁵³.

1.4.3. Vías de producción

A lo largo de la historia el ácido fumárico se ha obtenido por diferentes vías de producción, en función de las tecnologías disponibles y las bases económicas de cada época. Su producción y aplicación a nivel industrial comienza en los años 50 del s. XX, donde se propusieron procesos de obtención por medio de fermentación con hongos filamentosos, al igual que en el presente estudio^{67,68}. La materia prima de este proceso era glucosa, obtenida a partir de caña de azúcar y los medios de fermentación eran sintéticos y optimizados a partir de esta materia prima⁶⁷.

Sin embargo, tras el auge del petróleo como principal combustible y su conversión en uno de los pilares de la economía mundial capitalista^{1,47}, los procesos fermentativos de obtención de ácido fumárico fueron abandonados en pro de la floreciente industria petroquímica, que ofrecía mejores rendimientos y una materia prima más barata y fácil de conseguir (al menos en aquella época)^{4,16}.

Por otra parte, en los años 80 del s. XX las rutas fermentativas volvieron a ganar cierto interés tras las sucesivas crisis económicas, entre ellas la famosa crisis del petróleo de 1973. Estos factores, combinados con una naciente concienciación ambiental en la sociedad y la necesidad de buscar fuentes renovables de materias primas, dieron lugar a este intento de recuperar esta vía de producción. Este intento resultó finalmente infructuoso, ya que el coste de las materias primas y la disponibilidad de las mismas no fueron capaces de competir con la consolidada industria petroquímica^{1,16,69}.

En los últimos años (primera década del s. XXI) se han retomado investigaciones, ofreciendo múltiples posibilidades para la obtención de ácido fumárico a través de distintas vías biotecnológicas (tanto la fermentativa como la enzimática)^{4,47}. Estos estudios están ligados al naciente concepto de biorrefinería, y particularmente a las biorrefinerías de segunda generación²⁸. De esta manera, se tienen alternativas factibles y prometedoras para poder desarrollar un proceso de producción de ácido fumárico eficiente, competitivo económicamente y, ante todo, sostenible.

Vía química

Como ya se ha mencionado, la producción por vía petroquímica de ácido fumárico es la más consolidada actualmente. Existen dos posibles materias primas para su obtención: el benceno y el n-butano. Si bien es cierto que, históricamente, el benceno ha sido siempre más empleado, desde principios del s. XXI se usa de forma casi unánime el n-butano, esto se debe al creciente precio del benceno y a los riesgos que conlleva su manipulación^{2,47}.

Tanto el n-butano como el benceno se someten al mismo tratamiento inicial: Oxidación parcial catalizada por vanadil-pirofosfato $[(VO)_2P_2O_7]$, catalizador típicamente empleado en la industria para este tipo de procesos de oxidación controlada⁷⁰ (Figura 1.9).



Figura 1. 9: Esquema de obtención industrial por vía química de ácido fumárico.

Por medio de esta primera etapa química se obtiene el anhídrido maleico, considerado industrialmente el precursor del ácido fumárico^{2,70}. El uso y manipulación del anhídrido maleico supone un gran riesgo, tanto de seguridad industrial como a nivel medioambiental^{47,71}. Hay que considerar que es un peligroso contaminante y que su manipulación conlleva graves riesgos de exposición para los operarios, ya que es muy irritante para la piel y su inhalación provoca episodios de asma^{71,72}. Por otro lado, su manipulación supone un gran peligro ya que, en presencia de aminas y piridinas, se llevan a cabo reacciones muy violentas, generando explosiones. Además, el anhídrido maleico es considerado como un contaminante muy peligroso, su vertido en aguas puede ser fatal⁷¹.

A partir del anhídrido maleico se obtiene el ácido fumárico a nivel industrial en dos etapas (Figura 1.9): primero se hidrata para obtener ácido maleico (esta hidratación se lleva a cabo calentando el anhídrido maleico en presencia de agua⁷⁰); posteriormente se lleva a cabo una isomerización a 150 °C del ácido málico para

transformarlo en el fumárico⁷³. El rendimiento total de este proceso es del 112% en masa, siendo bastante superior a los rendimientos obtenidos por medio de procesos biotecnológicos a partir de glucosa^{2,47}.

En el proceso inicial de oxidación parcial de n-butano (proceso muy exotérmico) se producen grandes cantidades de CO y CO₂ como subproductos de la reacción⁷¹. Como puede verse la presencia de anhídrido maleico es el factor más urgente ambientalmente hablando en la obtención de ácido fumárico. Estas son las razones de más peso y urgencia para el desarrollo de procesos verdes de economía circular. Dentro de este tipo de procesos, la biotecnología ofrece dos modelos de proceso que pueden suponer una alternativa a la vía actual^{2,28}.

Vía enzimática

La producción por medio de procesos catalizados por enzimas es relativamente novedosa. Las rutas metabólicas de producción de ácido fumárico y las enzimas que interviene en ellas son bien conocidas⁷⁴. Sin embargo, no se han podido desarrollar técnicas productivas que puedan desembocar en procesos viables y rentables a nivel industrial²⁸.

A pesar de ello, en los últimos años se ha comenzado a contemplar la posibilidad de desarrollar enzimas capaces de llevar a cabo los procesos requeridos con rendimientos óptimos, gracias a novedosas técnicas biotecnológicas⁷⁵. Teniendo las ventajas típicas de este tipo de procesos como son las condiciones de operación suaves y la alta selectividad hacia los productos. Reduciendo de esta manera las exigencias energéticas del proceso y la presencia de subproductos, no deseados o incluso peligrosos².

Una de las propuestas para la obtención enzimática de ácido fumárico, consiste en la isomerización cis-trans del ácido maleico. Son conocidas varias especies de microorganismos que son capaces de sintetizar enzimas malato cis-trans-isomerasas, con unas actividades bastante razonables. Destacan las producidas por microorganismos de los géneros *Arthrobacter*⁷⁴, *Alcaligenes* y *Proteus*²⁸.

En un primer momento, la actividad a temperaturas de operación de estas enzimas, no eran viables a escala industrial ya que se requería aumentar la temperatura de operación para mejorar el rendimiento y la productividad del proceso. Sin embargo, las enzimas disponibles no eran lo suficientemente estables térmicamente como para salvar estos escollos⁷⁴. No obstante, se han seleccionado

especies pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*⁷⁵. Estos géneros producen isomerasas termoestables, con actividades de hasta 200 UI/L⁷⁵, competentes ya para llevar a cabo el proceso, con un rango de temperaturas de operación adecuado, llegando a ser estables a 45 °C⁷⁵.

En cuanto a los medios de reacción, se ha comprobado que estas enzimas pueden llevar a cabo el proceso en disolventes de naturaleza orgánica, tales como el tolueno. Siendo la productividad de las enzimas adecuada en estos medios, convirtiendo el proceso en una alternativa factible²⁸.

A pesar de estos avances en la vía enzimática de producción de ácido fumárico, hay problemas de base que no se han solventado todavía, o que aún no pueden serlo. El principal problema reside en que la reacción llevada a cabo es la última etapa de la vía química de obtención del ácido fumárico⁷⁶. Esta etapa es la que supone una revolución verde en cuanto al proceso, haciendo que las condiciones de operación más suaves y al proceso menos contaminante. Sin embargo, el proceso de obtención de ácido málico para llevar a cabo esta etapa sigue siendo el mismo que en la vía química; lo que continúa implicando el uso y manipulación del peligroso anhídrido maleico⁷¹. Además, en última instancia, también supone el uso de n-butano o benceno como materias primas. Este último hecho implica que el proceso sigue siendo dependiente de la industria petroquímica, aunque incluya ciertas mejoras con el fin de hacerlo menos agresivo ambientalmente^{70,71}.

Vía fermentativa

La vía fermentativa para la producción de ácido fumárico no es un proceso novedoso. Como se ha comentado anteriormente, fue el primer método desarrollado, y posteriormente abandonado. Por esta razón, a lo largo de la historia ha sido estudiado en función de las tecnologías disponibles en cada época, dando lugar a resultados dispares^{67,69}.

Estos resultados se deben sobre todo al cultivo y manipulación de los microorganismos responsables de estos procesos fermentativos. Los hongos filamentosos son los microorganismos que mejor producción de ácido fumárico presentan, acarreando varios problemas operativos, que serán expuestos en secciones posteriores^{59,77}.

Hoy en día, los esfuerzos por desarrollar esta vía fermentativa están indudablemente unidos al concepto de biorrefinería: las materias primas para estas

fermentaciones son medios de cultivo ricos en diversos tipos de azúcares^{4,28}. Esta variedad en tipos y concentraciones de azúcares viene dada por el origen de estos, entre los que destaca la hidrólisis enzimática de residuos de distintas biomásas^{7,31}.

La naturaleza de cada biomasa determina el tipo de proceso sobre el que se puede emplear. Así pues, ciertos residuos de la industria agroalimentaria, como pueden ser residuos provenientes de frutas, poseen una composición química formada principalmente por celulosas, hemicelulosas y pectinas^{29,31}. Los hidrolizados provenientes de estos residuos serán ricos en azúcares, tales como la glucosa o la fructosa (muy presente como azúcar libre en las frutas)^{29,31}. Además, en ciertos tipos de frutas (por ejemplo, los cítricos) deben de llevarse a cabo ciertos tratamientos para eliminar compuestos potencialmente tóxicos, como es el caso del limoneno³¹.

Por una parte, los residuos de naturaleza lignocelulósica tendrán un mayor contenido en glucosa y xilosa, obtenidas tras la hidrólisis⁷⁸, pero también habrá ligninas presentes en el medio, que deben ser extraídas para evitar posibles efectos inhibitorios^{3,29,72}.

La selección del tándem microorganismo-residuo puede ser vital a la hora de desarrollar un proceso fermentativo. Así pues, entre los objetivos del presente trabajo está la elección de un residuo apto y viable para el microorganismo seleccionado (mejor productor natural). De esta manera, se genera conocimiento de cómo actúa el microorganismo en cada una de las etapas, en cada uno de los dispositivos y en cada régimen de operación propuesto.

Por medio de diversas herramientas, entre las que destacan la modelización cinética, se puede llegar a un entendimiento, tanto cuantitativo como fenomenológico del proceso. Permitiendo posteriormente simular y escalar el proceso, de cara a su implantación industrial.

1.5. Hongos filamentosos

Como ya se ha mencionado, los mejores productores naturales de ácido fumárico son los hongos filamentosos. Este tipo de microorganismos presentan particularidades frente a otros biocatalizadores empleados a nivel industrial.

El reino *Fungi*, con casi millón y medio de especies distintas⁷⁹, posee una heterogeneidad y una diversidad enormes desde los puntos de vista morfológico,

fisiológico y ecológico⁸⁰. Abarca desde las levaduras hasta los basidiomicetos, pasando por los mohos o los líquenes. Sin embargo, todas sus especies presentan características comunes que los engloban en dicho reino. Las características más representativas son, principalmente, el carácter eucariota de todas sus especies y su pared celular quitinosa.

Los hongos han sido utilizados desde la antigüedad, no solamente como alimento, sino también como catalizadores de procesos biotecnológicos. Los más conocidos son las levaduras, usadas en la elaboración de alimentos fermentados como pan, vino o cerveza^{79,81}. También destaca el uso de ciertos mohos para la elaboración de quesos, como el caso de *Penicillium* para la elaboración de los quesos Cabrales, Rochefort, Brie o Camembert. Igualmente el tempeh es un alimento obtenido de la fermentación de soja por medio de *R. oryzae*^{81,82}.

Dentro de este reino, destacan los hongos filamentosos, englobados en la clasificación *Zygomycota*, a la que pertenecen la mayoría de los mohos. Los hongos de esta clasificación se caracterizan esencialmente por su capacidad de reproducción sexual, con la formación de las zigosporas⁸³. Pudiendo también reproducirse asexualmente, por medio de la producción de esporangiosporas⁸¹.

Estos organismos constituyen especies tanto unicelulares como pluricelulares, cuyas células se agrupan en hifas (Figura 1.10). La unión de las hifas da lugar a los micelios, característica fundamental que agrupa a este tipo de microorganismos. Estos micelios son los que conforman la parte vegetativa de los hongos^{81,84}. En cultivos sumergidos, es esta parte la que conforma el grueso de la biomasa y la que da lugar a las distintas morfologías, que pueden ser controladas en función de varios factores y variables^{25,59}.

Los hongos filamentosos juegan un papel fundamental en los ecosistemas, ya que tienen una función regeneradora en este. Al ser organismos heterótrofos y saprófitos, deben de segregar gran cantidad de enzimas hidrolíticas, para la descomposición y liberación de los nutrientes de los que se alimentan^{25,80}. Esta capacidad, unida al hecho de que, al ser organismos eucariotas, realizan modificaciones postraduccionales en las proteínas que sintetizan, les convierte en una importante fuente de enzimas para usos industriales, idóneas para el desarrollo de procesos en biorrefinerías^{80,81,83}.

Además, los hongos filamentosos se usan en la producción de compuestos de alto valor añadido desde el descubrimiento de los antibióticos. Se han utilizado

ampliamente estos microorganismos como principales productores de distintos fármacos, ciertos aminoácidos y de varios ácidos orgánicos, como el cítrico, el glucónico²⁸ o incluso el itacónico⁸⁵.

Rhizopus es uno de los géneros de mohos más utilizados en la industria, se conocen especies pertenecientes a él desde la antigüedad y a lo largo de la historia han tenido múltiples aplicaciones⁸². A este género pertenecen por ejemplo el moho negro del pan (*R. stolonifer*), u otras especies de interés industrial como *R. oryzae*, o *R. oligosporus*^{81,82}.

El género *Rhizopus*, debido a su metabolismo, es conocido como el género productor de ácido fumárico por excelencia. Destacando dos especies conocidas como los mayores productores naturales: *R. arrhizus* y *R. oryzae*^{2,86}.

Estas dos especies de hongo a menudo son confundidas, teniendo una taxonomía confusa. Constituyen la misma cepa, clasificada indistintamente en una especie u otra en función del catálogo donde se consulte.

En la presente tesis, se ha usado la cepa *R. arrhizus* NRRL 1526, cuyo nombre taxonómico es: *Rhizopus oryzae* Went & Prins. (1895) [MB#433253].

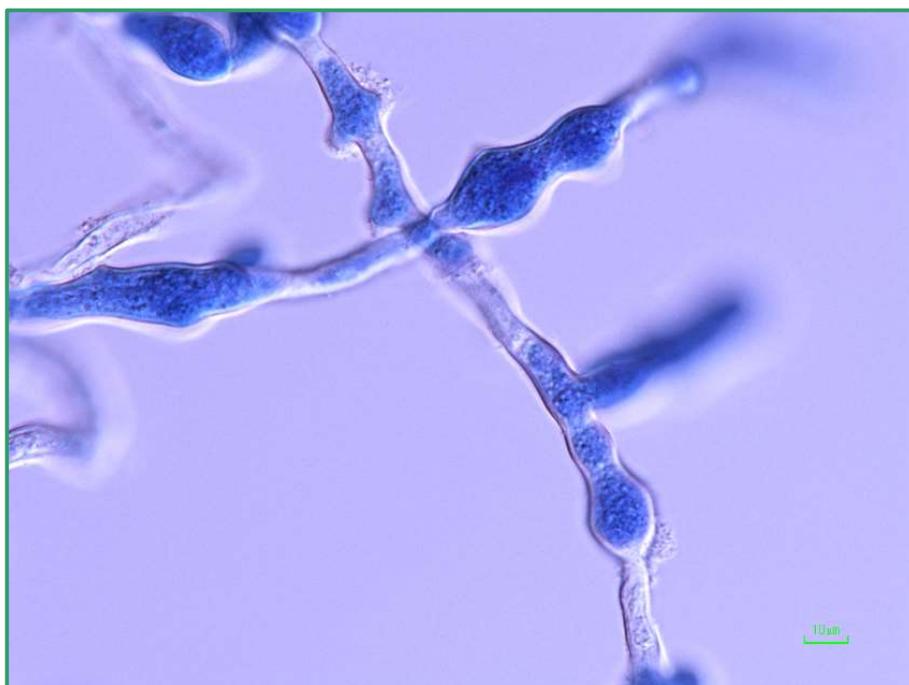


Figura 1. 10: Hifas de *R. arrhizus* NRRL 1526 vistas al microscopio.

1.5.1. Metabolismo

Los hongos del género *Rhizopus* son capaces de sintetizar ácido fumárico mediante dos rutas metabólicas distintas. Ambas están relacionadas con el ciclo de Krebs, también llamado ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA: *Tri-Carboxylic Acids*), que presenta dos versiones alternativas y compatibles: la oxidativa (común en todos los organismos celulares aerobios) y la reductiva. Destaca la ruta reductiva, que solo poseen ciertos tipos de microorganismos, con la propiedad de obtener compuestos orgánicos usando CO_2 como sustrato.

El punto de partida de ambas rutas, como puede verse en la Figura 1.11, es el piruvato. La principal fuente de piruvato en el interior celular es la glicolisis, que lo sintetiza a partir de glucosa. Sin embargo, a lo largo del presente trabajo se intentará la producción de ácido fumárico también a partir de otro monosacárido: la fructosa. Este monosacárido también produce piruvato a través una ruta algo distinta a la glucosa.

El ciclo de Krebs es la ruta más usual donde encontrar el fumarato, es común a la mayoría de los seres vivos. Sin embargo, el fumarato producido en este ciclo es un intermedio en una cascada de reacciones, que suele tener una vida media muy corta. Además, en los organismos eucariotas este ciclo tiene lugar en el interior de la mitocondria, siendo anómala la presencia de ácido fumárico proveniente de este ciclo en el exterior de esta.

Por su parte, el TCA reductiva es una ruta metabólica que se produce en el citosol. Por lo tanto, el ácido fumárico producido por los hongos del género *Rhizopus*, es proveniente de esta ruta. La secreción del ácido fumárico se realiza de manera sencilla por un transportador de membrana, capaz de transportar tanto fumarato como malato (también presente en la ruta)⁸⁷.

Esta ruta metabólica también parte del piruvato, que es convertido en oxalacetato por medio de fijación de CO_2 , para pasar de compuestos C3 a C4 (Figura 1.11). Este hecho hace que el proceso de producción de ácido fumárico sea ambientalmente más atractivo, ya que presenta la posibilidad de fijar CO_2 . Este proceso se lleva a cabo por medio de la enzima piruvato carboxilasa.

La fijación de CO_2 abre la posibilidad a que el proceso tenga un rendimiento molar del 200%, ya que pueden obtenerse 2 moles de ácido fumárico por cada mol de glucosa consumido. Este hecho es debido a que el aporte de CO_2 introduce 2 átomos

de carbono por cada mol de glucosa consumida teóricamente. Si bien es verdad que alcanzar este rendimiento teórico es imposible, ya que esta ruta está presente en mitad del metabolismo de un organismo vivo, un sistema muy complejo que tiene varios flujos de carbono, ramificados hacia diversas rutas necesarias para el mantenimiento celular²⁸.

El oxalacetato, al llegar al citosol, comienza la ruta metabólica propiamente dicha. Por medio de la malato deshidrogenasa, se transforma en malato. Este proceso implica gasto de poder reductor en la célula, necesitando la enzima gastar una molécula de NADH²⁸.

Finalmente, el malato es deshidratado por medio de la fumarasa para dar lugar al fumarato²⁸. Posteriormente es excretado de la célula, por medio de una proteína *symporter* de dicarboxilato-protón, siendo los ácidos málico y fumárico competidores en el transporte al exterior⁸⁷.

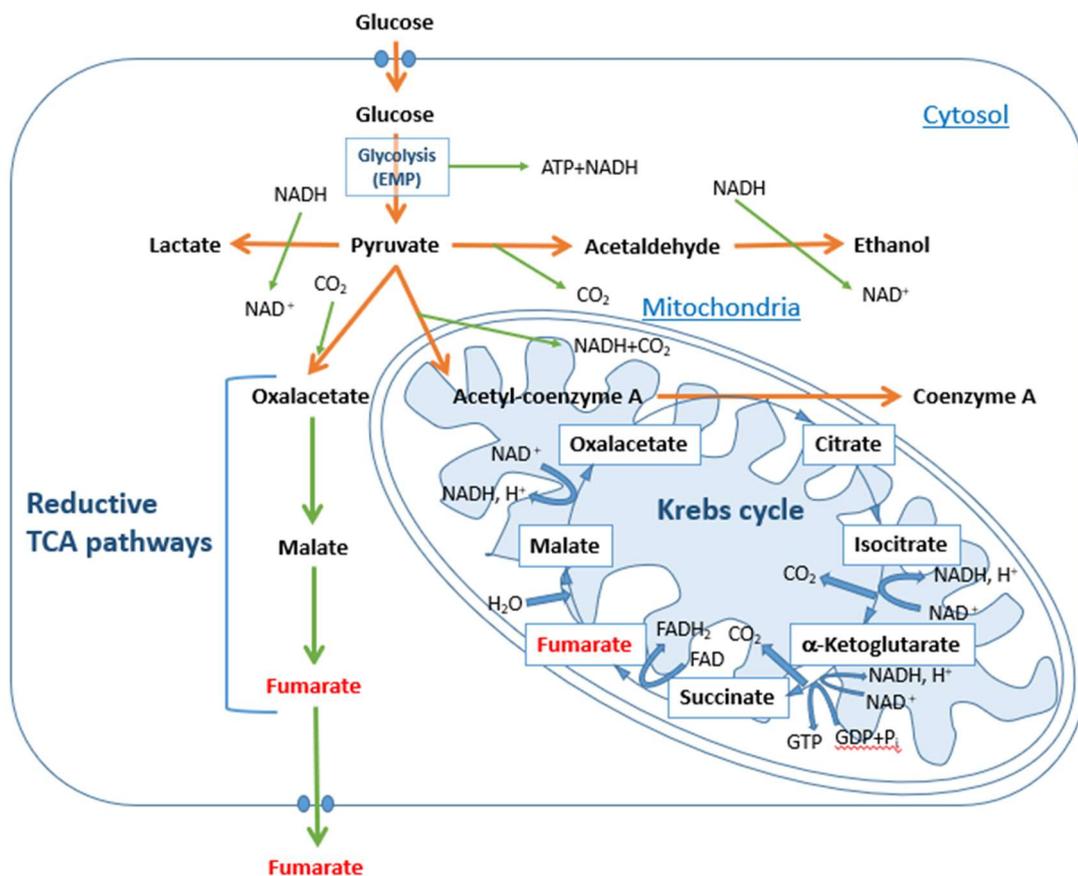


Figura 1. 11: Rutas metabólicas de *R. arrhizus* donde está involucrado el fumarato⁴.

La enzima fumarasa (EC 4.2.1.2), permite la hidratación o deshidratación reversible entre fumarato y malato, esta reacción solo se da de forma reversible en ciertas especies fúngicas, siendo posible en el género *Rhizopus*. Sin embargo, en ciertas levaduras como *S. cerevisiae*, no se da esta reacción de forma reversible; sus fumarasas (tanto mitocondrial como citosólica) únicamente catalizan la conversión de fumarato a L-malato⁸⁸.

Para llevar a cabo las dos rutas del metabolismo fúngico en las que interviene el fumarato, los hongos del género *Rhizopus* poseen dos fumarasas, codificadas por dos genes distintos⁷⁶. Una de ellas se encuentra en el interior de la mitocondria, asociada al ciclo de Krebs. Esta fumarasa mitocondrial, aunque permite la conversión reversible, solo cataliza la producción de L-malato⁷⁶. Esto es debido a que las condiciones internas de la mitocondria dirigen el metabolismo. El segundo tipo de fumarasa, se encuentra en el citosol y es responsable del último paso del TCA reductiva. Esta enzima también permite la conversión reversible, pero debido a las condiciones químicas del citosol, el rendimiento de la transformación está enfocado a la producción de fumarato⁷⁶. En función de las condiciones a las que estén sometidas las células, puede influirse sobre la dirección de la reacción.

Varios autores han demostrado que condiciones limitantes de nitrógeno en los medios de cultivo aumentan la producción de ácido fumárico⁸⁸. También el tipo de fuente de nitrógeno y el número de estas, afectan a dicha productividad, tanto como a la morfología^{89,90}. Esto se debe a que estas condiciones restrictivas aumentan la actividad enzimática de la fumarasa citosólica, lo que implica una mejora sustancial de la producción de fumarato, afectando al rendimiento y a la selectividad⁷³.

Sobre la maximización de la producción de ácido fumárico, estimulando la actividad de la fumarasa, se han desarrollado también estrategias de producción. No solo la imposición de ciertas condiciones restrictivas de nitrógeno, incluso se han desarrollado estrategias de aplicación de las condiciones restrictivas de fuente de nitrógeno⁹¹.

En algunos de estos estudios, se sugieren distintas estrategias de control de pH⁹² o de transferencia de oxígeno⁹³, ya que, jugando con el valor de estos parámetros a lo largo del ciclo celular, puede maximizarse el rendimiento en la producción de ácido fumárico.

1.5.2. Morfología

Uno de los grandes retos que presentan los procesos con hongos filamentosos en su implantación industrial es el mantenimiento de una morfología adecuada para la producción. El desarrollo y control de esta morfología es muy complejo.

La morfología de los hongos filamentosos es la forma macroscópica que desarrolla el micelio, en el que se conforma la comunidad de células que forman estos seres. Es un indicativo del estado metabólico de estas y está influida en gran medida por las condiciones del ambiente en el que se están desarrollando.

Esta forma del micelio es la que va a determinar cómo van a dirigirse los flujos metabólicos en las células y está determinada por las condiciones de desarrollo. Al ser el micelio un conjunto de filamentos denominados hifas, la manera en la que crecen y se relacionan estas determinará la morfología final. Por otra parte, no solo la fase de desarrollo es la única clave para desarrollar una morfología, ya que a lo largo de todo el proceso la interacción de las hifas puede verse afectada y ello desembocar en un cambio de morfología.

Las hifas son las estructuras constituyentes del micelio, están formadas directamente por las células, que suelen tener forma alargada, estando todas envueltas por una pared celular de quitina. Estas hifas pueden ser septadas o no, pudiendo darse en su interior intercambio de material genético entre células a través de sus paredes con fines reproductivos⁸¹.

El crecimiento de las hifas se realiza siempre apicalmente, desde el extremo de esta (yema) y van creciendo, según se van reproduciendo las células en su interior. Es usual que surjan ramificaciones, debido a la reproducción de células en el interior de estas. Estas ramificaciones, que también crecerán desde la yema, juegan un papel fundamental en la interacción con otros filamentos, formando las morfologías del micelio. Existen tres tipos de morfología definidos en estos microorganismos (Figura 1.12):

- ❖ Micelio.
- ❖ *Pellet* (gránulo).
- ❖ *Clump* (aglomerado).



Figura 1. 12: Diferentes tipos de morfología de *R. arrhizus*.

Cada uno de los tipos de morfología presenta sus propias características: la morfología en micelio es la desarrollada en condiciones naturales por los hongos filamentosos, que crecen en superficies. Es una morfología dispersa, que se expande en busca del mayor número de nutrientes posible. Se desarrolla sobre superficies y llegado cierto punto de su fase celular, comienza a esporular, originando la parte sexual de los micelios.

La morfología en micelio disperso está reconocida como la que ofrece una mayor producción del ácido fumárico². Sin embargo, el uso de esta morfología presenta serios problemas técnicos en la implantación industrial del proceso. Por un lado, usada sobre fermentadores clásicos, tipo tanque agitado, hace que la viscosidad del medio aumente en gran medida. Esto eleva la exigencia energética del proceso y disminuye la vida útil de los equipos, debido al desgaste que esto supone. Por otro lado, el micelio disperso también ofrece problemas de homogeneidad en la mezcla, ya que esta morfología tiende a adherirse sobre todas las superficies disponibles en el interior del fermentador, como pueden ser las paredes de este (micelio anular, Figura 1.13a) o sobre las distintas sondas, sensores, agitadores y tabiques deflectores presentes (Figura 1.13b).

Para intentar solventar estos problemas, se han propuesto regímenes de operación alternativos al tanque agitado, como puede ser la fermentación en estado sólido (SSF: *Solid State Fermentation*), obteniendo buenas conversiones finales^{85,94}. Sin embargo, estos procesos se dan de manera muy lenta y deben de tener un control muy minucioso, ya que se debe de garantizar una buena transferencia de nutrientes

en el interior del micelio, cosa muy difícil de conseguir, y de no ser así, el metabolismo de los hongos se dirige hacia la formación de otros subproductos.

Por otro lado, el desarrollo de esta morfología se está intentando a través de la inmovilización del hongo sobre soportes con alta superficie específica, como pueden ser matrices esponjosas de poliuretano o poliestireno expandidos, arcillas expandidas o virutas de madera⁴⁷. Incluso se están probando ciertas fibras naturales, como corcho⁴⁷ o esponjas vegetales⁶⁰. Esto abre una posibilidad al uso de esta morfología, aunque esta tecnología aún está en sus primeras etapas de desarrollo, siendo aún muy lento el proceso de producción de ácido fumárico con la morfología de micelio disperso⁸⁸.

La morfología granular (*pellet*) es, a priori, la morfología más atractiva desde el punto de vista industrial se da en cultivos fermentativos sumergidos y consiste en pequeñas partículas (≈ 1 mm de diámetro) en suspensión en el caldo de cultivo. Si bien esta morfología no es tan productiva como el micelio disperso, aporta productividades bastante cercanas, pero de manera más rápida. Además ofrece la ventaja de ser totalmente adecuada para el cultivo en fermentadores convencionales tipo tanque agitado⁸⁴.

El principal inconveniente de esta morfología es su obtención y control a lo largo del proceso, ya que, si se produce un crecimiento excesivo del mismo, puede evolucionar a morfología aglomerada (*clump*), para su obtención hay muchos trabajos que apuntan a varias condiciones de operación como la agitación o el contenido en fuente de nitrógeno^{84,90}.

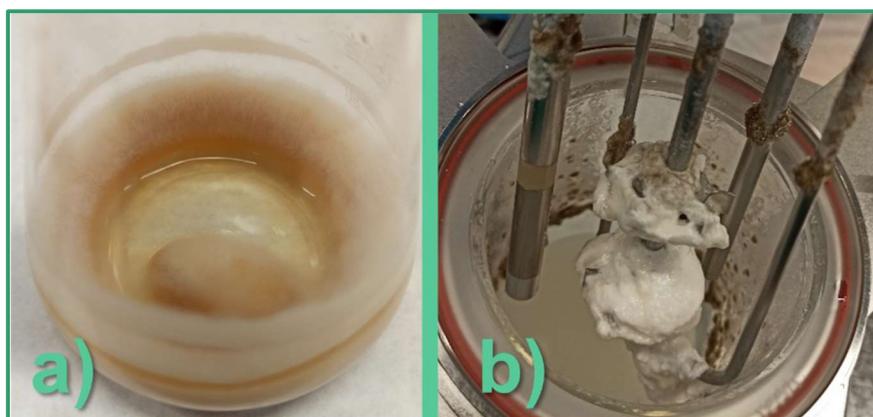


Figura 1. 13: a) Micelio anular y *clump* en matraz. b) Micelio sobre agitador de biorreactor.

El uso de fuentes de nitrógeno de distinta naturaleza, o la combinación de varias fuentes de nitrógeno puede proporcionar diversidad en las morfologías. Incluso dentro de la morfología en pellets, pueden obtenerse partículas de distintos tamaños y comportamientos. La modulación de las concentraciones de estas fuentes de nitrógeno también influye sobre el desarrollo de estas morfologías⁹⁰.

Ciertos autores también señalan la conveniencia de limitar el contenido de las fuentes de nitrógeno en la fase de producción, ya que una gran concentración de nitrógeno desembocará en un excesivo y rápido crecimiento de la biomasa, perdiendo de esta manera la morfología en pellet, al ser estos demasiado grandes y convertirse en *clumps*.

Para el control de esta morfología, también se ha intentado la inmovilización sobre soportes, usando pequeñas partículas de ciertos soportes⁹⁵. Pueden obtenerse pellets de tamaños adecuados, si bien deben de tenerse en cuenta ciertos parámetros de control sobre los mismos para que no haya un crecimiento excesivo y se conviertan en *clumps*^{84,95}.

Se han utilizado varios materiales como soporte para el desarrollo de los *pellet*, desde esponjas de materiales sintéticos como poliuretano⁴⁷. Otros materiales que den soporte en la formación del pellet y posteriormente puedan ser degradados por el hongo, tales como la agarosa, se están desarrollando. Además, también se ha estudiado la influencia del tamaño de partícula del CaCO₃ usado como corrector de pH^{95,96}. Se ha observado que partículas muy finas de carbonato actúan como soporte en el desarrollo de los *pellets*, haciendo que estos sean más estables en el tiempo y se consigan mayores rendimientos⁹⁵.

El *clump* es la morfología a evitar en todo proceso con microorganismos filamentosos, también es, por desgracia, la morfología a la que acaban evolucionando estos microorganismos a lo largo del proceso. Por esta razón el control de la morfología es crítico^{81,84}.

Estos *clumps* son básicamente aglomerados de biomasa, compuestos por el aglutinamiento de varios micelios, bien a lo largo del proceso debido a los choques entre *pellets* ocasionados por la agitación, por la adhesión y excesivo crecimiento de los micelios sobre las superficies en el biorreactor, o por crecimiento anómalo de los *pellets* que, superado cierto valor crítico, son considerados *clumps*^{90,93}.

El principal problema que presenta esta morfología viene derivado del tamaño y naturaleza de esta. La morfología en *clump* dificulta en gran medida el desarrollo del proceso, al generar falta de homogeneidad en el medio de fermentación, obstaculiza la medida y control del proceso al adherirse sobre las sondas, difusores de aire y agitadores; aumenta la viscosidad del medio; y, por último, afecta enormemente al rendimiento del proceso^{90,93}.

Debido a su tamaño, la difusión hacia el interior de nutrientes y oxígeno se ve dificultada y, en la mayoría de los casos, totalmente impedida. Se genera, por un lado, una superficie con células bien nutridas que continúan con su metabolismo en condiciones óptimas. Por el contrario, en el seno del *clump*, habrá un núcleo con células en escasez de recursos, que ven afectado su metabolismo hacia la formación de subproductos, tales como el etanol^{84,97}. Al estar en condiciones anaerobias, la muerte de estas células del núcleo puede tener lugar, teniendo de esta manera perdida del biocatalizador, volviendo el proceso altamente ineficiente.

En la mayoría de los casos, y sobre todo en operaciones en biorreactor, la aparición o aglomeración de esta morfología es inevitable a tiempos largo⁹⁷. Es por esto por lo que las condiciones de operación y las estrategias de producción deben de estar encaminadas hacia el máximo mantenimiento posible de la morfología. Cuanto más tarde se produzca esta degradación de la morfología, mejores rendimientos de producción se obtendrán⁹⁷.

A pesar de todo, en la industria se usan distintas morfologías, condiciones y regímenes de operación, en función del producto obtenido y del microorganismo productor⁸⁶. Cada especie filamentosa tiene sus propias particularidades y condiciones óptimas de producción; si el balance final es favorable, puede llegar a utilizarse cualquier tipo de método de producción²⁸.

2. Alcance y objetivos

“Era como si un mundo nuevo se abriese ante mí, el mundo de la ciencia, al que finalmente se me permitió conocer con toda libertad”

Marie Skłodowska Curie

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es el estudio de la producción biotecnológica de **ácido fumárico con *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526 a partir de residuos alimentarios (de fruta: manzana y naranja)**. Para abordar este objetivo general se han considerado diversos subobjetivos.

Debido a que en el grupo de investigación en el que se ha desarrollado este trabajo no se disponía de un procedimiento experimental reproducible para el trabajo con microorganismos filamentosos, el primer subobjetivo es el **desarrollo de un procedimiento de preparación estándar del inóculo** que permita estudiar la influencia de las variables consideradas en este estudio.

El siguiente subobjetivo es la puesta a punto de **métodos analíticos** para el seguimiento de los experimentos realizados, siendo de especial importancia la determinación cuantitativa de la biomasa.

Con los procedimientos experimentales conseguidos, se abordará la **simplificación del medio de cultivo** habitualmente empleado en la literatura ya que se pretende trabajar con **hidrolizados de residuos de frutas**, cuya obtención también es un subobjetivo del presente trabajo. Antes de trabajar con los hidrolizados de frutas se llevará a cabo un estudio con **medios sintéticos** preparados en el laboratorio para comprobar la capacidad del hongo de producir ácido fumárico a partir de fructosa.

El último objetivo experimental trata de hacer un pequeño cambio de escala desde matraz Erlenmeyer a un mini-biorreactor comercial con todas las características propias de un biorreactor de mayor volumen, para determinar la **influencia del oxígeno disuelto** en este proceso aerobio, de lo que no existe información en la bibliografía sobre este proceso.

Por último, se llevará a cabo la **modelización cinética del proceso** en los diversos sistemas y condiciones experimentales empleados. Siendo estos modelos, los primeros existentes sobre el proceso de producción de ácido fumárico por fermentación

3. Materiales y **métodos**

“Si uno no tiene talento para ser artista, ¿Qué hay más bonito que dedicarse a la ciencia?”

Margarita Salas

3.1. Materiales

En esta sección se describen los principales materiales utilizados para el desarrollo de la investigación y está estructurado en función de la naturaleza de los distintos materiales: biocatalizadores, medios de cultivo y residuos.

3.1.1. Biocatalizadores

Microorganismo

El microorganismo utilizado en la producción fermentativa de ácido fumárico, tal y como se ha comentado anteriormente, es un hongo filamentoso del género *Rhizopus*. La cepa seleccionada es *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526, procedente de la colección del *Agriculture Research Service* (NRRL) de Estados Unidos.

La selección de este microorganismo para los estudios realizados se ha hecho a través del proyecto de investigación FAPA (*Fumaric Acid for Polymer Application*), perteneciente a la convocatoria ERA-Net ERA-IB-15-113. Dentro de este proyecto se ha trabajado en conjunto con el grupo de investigación del Dr. Ulf Prüesse perteneciente al Instituto de Tecnología Agrícola del Thünen Institute, situado en Braunschweig (Alemania). La investigación del grupo del Dr. Prüesse incluía, entre otras tareas, la selección del microorganismo productor por *screening*.

Una vez se seleccionó *R. arrhizus* NRRL 1526 como la cepa más conveniente para la producción de ácido fumárico, esta fue enviada a los laboratorios del grupo FQPIMA. Fue recibido en forma de suspensión de esporas en una disolución de suero salino-glicerol. Los protocolos para el sembrado y la elaboración del stock son descritos más adelante.

Enzimas

En la presente tesis, se han llevado a cabo hidrolisis enzimáticas para la elaboración de los medios de fermentación finales. Para la obtención de estos, se han usado diversas enzimas comerciales:

- ❖ Biogazyme 2x: Rica en endo- y exoglucanasas.
- ❖ Xylanase 2x: Rica en endo- y exoxilanasas y xiloxidasas.
- ❖ β -glucosidase 1000: Rica en β -glucosidasas, xilanasas y β -xilosidasas.
- ❖ Pektinase L40: Rica en endo- y exopectinasas, entre otras actividades.

Todas ellas son pertenecientes a la casa ASA spezialenzyme GmbH con sede en Wolfenbüttel (Alemania), empresa colaboradora con el grupo de investigación a través de varios proyectos de ámbito europeo ERA-Net, como FAPA o SPAREC, este último perteneciente a la convocatoria ERA-Net SUSFOOD2 PCI2018-093114.

3.1.2. Medios de cultivo

Para llevar a cabo las investigaciones integradas en la presente tesis, se han usado diversos medios de cultivo. En un principio se comenzó con medios de cultivo conocidos, descritos en bibliografía. Posteriormente se han ido modificando para adaptarlos a las distintas etapas de la investigación.

Para el crecimiento y la esporulación del hongo, necesarios para elaborar el stock a usar como punto de partida en los experimentos, se ha usado medio PDA (*Potato Dextrose Agar*: agar-patata). El PDA es un medio ampliamente usado y consolidado para el crecimiento de hongos. Se ha usado una versión comercial de este medio de Sigma-Aldrich (ref. 70139).

En la etapa de inóculo se utilizó el medio B desarrollado por Rhodes en 1959⁶⁷, siendo un medio ampliamente conocido y usado para el crecimiento y desarrollo fúngico. No obstante, este medio ha sido ligeramente modificado³⁴, eliminando su contenido en CaCO₃, para disponer de una evolución libre de pH (Tabla 3.1).

Para la etapa de producción de ácido fumárico se han usado distintos medios de producción, basados en el medio C, propuesto por Ling y Ng en los años 80 del s. XX⁶⁹. Sin embargo, ese medio ha ido sufriendo modificaciones a lo largo de las distintas etapas de la investigación. En todo caso, el contenido en microelementos se ha mantenido siempre inalterado, ya que está optimizado para la producción⁶⁹.

Finalmente se han utilizado como medio de fermentación distintos medios elaborados con los hidrolizados de residuos. Si bien no se han utilizado de forma directa, sino que han sido complementados con sulfato de amonio como fuente principal de nitrógeno, a diferentes concentraciones. Además, se les ha añadido la misma composición de micronutrientes presente en el medio C con el fin de tener condiciones de operación más semejantes a las usadas con medios sintéticos.

Tabla 3. 1: Composición de los medios de cultivo de partida empleados.

Componente	[Medio de inóculo] ⁶⁷ (g/L)*	[Medio C] ⁶⁹ (g/L)**
Glucosa	40	130
(NH ₄) ₂ SO ₄	4	1,8**
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,4	0,4
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,044	0,44
KH ₂ PO ₄	1,6	0,3
FeCl ₃ × 6 H ₂ O	0,0075	0,0075
Ácido tartárico	—	0,0075
CaCO ₃	—*	50
<i>Corn steep liquor</i> (CSL)	0,5 mL/L	0,5 mL/L

*Medio B definido por Rhodes⁶⁷ modificado al ser eliminado el contenido de CaCO₃³⁴.

**Medio C original definido por Ling y Ng⁶⁹, ha sido modificado a lo largo de la investigación para adecuarlo a las necesidades de la misma^{34,95}.

3.1.3. Residuos

En la integración final del proceso se precisa el uso de medios obtenidos de residuos reales de la industria. Por ello, los distintos residuos utilizados como materia prima han sido proporcionados por distintas industrias.

Los residuos de naranja, cascara y pulpa (OPW) han sido proporcionados por la empresa FRUSA-Frutos y Zumos S.A. con sede en Albal, Comunidad Valenciana.

Los residuos de manzana, principalmente peladuras (AP), han sido suministrados por la empresa Concentrados Villaviciosa S.A. (COVILLASA) con sede en La Almunia de Doña Godina, Aragón.

Ambas empresas alimentarias se dedican a la elaboración de zumos concentrados para la posterior obtención de bebidas; son colaboradores del grupo de investigación en el proyecto de ámbito europeo SPAREC, perteneciente a la ERA-Net SUSFOOD2 PCI2018-093114.

Todos estos residuos han sido almacenados congelados a -20 °C para su conservación. De esta manera las condiciones y procesos que se llevan a cabo en el laboratorio son más reproducibles en la implantación industrial del proceso.

3.2. Equipos

Esta sección enumera y describe todos los equipos utilizados a lo largo de la investigación, desde dispositivos experimentales hasta equipos de análisis o equipamientos auxiliares.

3.2.1. Dispositivos de reacción

Hidrolisis enzimática: Para llevar a cabo las hidrólisis enzimáticas de los residuos, se han utilizado biorreactores de vidrio, equipados con camisa de refrigeración. Dicha refrigeración se ha logrado con agua impulsada y refrigerada por un baño termostatzado de la casa Selecta (Madrid, España), modelo Termotronic-100. La agitación en el interior de los biorreactores ha sido con turbinas *Rushton*, accionadas por agitadores marca IKA (Staufen, Alemania), modelo RW20 digital.

Fermentación a pequeña escala: Las fermentaciones se han realizado a distintas escalas y en distintas etapas. A pequeña escala se han llevado a cabo en matraces Erlenmeyer, agitados por medio de un agitador orbital modelo Unimax 1010 de Heidolph Instruments (Schwabach, Alemania).

Para tener un control sobre la temperatura, en las distintas etapas del proceso fermentativo a escala matraz, se ha contado con una estufa Selecta (Madrid, España) modelo 2000207, que consta de control de temperatura PID. Dentro de la cual, se encuentra instalado el agitador orbital.

Fermentación a mayor escala: Para llevar a cabo el proceso a escalas superiores y con dispositivos de reacción análogos a los usados industrialmente, se ha contado con un biorreactor comercial de la casa Applikon Biotechnology (Delft, Países Bajos), modelo my-Control MiniBio de 500 mL de capacidad.

Este biorreactor está equipado con distintos accesorios para controlar las condiciones de operación y llevar a cabo el proceso de manera deseada. El pH y la

cantidad de oxígeno disuelto son medidos por sondas específicas del controlador del biorreactor. A su vez dicho dispositivo cuenta con control PID de las variables empleadas (agitación y temperatura).

El caudal de aire empleado en el proceso se ha extraído de la línea de aire comprimido existente en la Facultad de Ciencias Químicas, la presión de entrada al biorreactor es ajustada a 1 atm por medio de un filtro manorreductor y el caudal se regula con un rotámetro de precisión. Antes de entrar al fermentador, el caudal de aire es esterilizado por filtración.

3.2.2. Equipos de análisis

Medidor de pH y electrodo selectivo de iones: Para llevar a cabo la medida del pH en las distintas muestras, se ha utilizado un medidor de pH Hanna Instruments (Villafranca Padovana, Italia) modelo HI-5222 equipado con una sonda específica de medida de pH HI-1131.

Aparte de medir pH, el medidor acepta sondas específicas de medida selectivas a distintos iones. En la presente tesis se ha usado la sonda selectiva de amonio HI-4101 con la que se ha determinado el contenido de nitrógeno amoniacal.

Cromatografía: Para la determinación de la composición de las distintas muestras líquidas se ha empleado la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*). Se ha empleado un equipo modular de Jasco (Tokio, Japón), serie 2000, constituido de los siguientes dispositivos: bomba Jasco PU-2089; muestreador Jasco AS-2059; horno para columna de cromatografía Jasco CO-2060; medidor índice de refracción: Jasco RI-2031, detector diodo array: Jasco MD-2015.

Para llevar a cabo estos análisis se han empleado dos columnas distintas. Por un lado, para el análisis de ácidos orgánicos y etanol se ha empleado una columna de protones de la casa comercial Benson polymeric (Reno, EE. UU.) BP-800 H⁺ (300x7.8 mm). Por otro lado, para la determinación de los distintos azúcares presentes en las muestras se ha empleado una columna de plomo Benson BP-800 Pb (300x7.8 mm).

3.2.3. Equipos auxiliares

Agitador de rodillos: Para llevar a cabo las fases de extracción y contacto en los procesos de detoxificación se ha empleado un dispositivo de la marca IKA (Staufen, Alemania) modelo ROLLER 10 Basic.

Autoclave: Para la esterilización del material y medios de cultivo concernientes al sembrado, manipulación, cultivo, crecimiento y producción de los microorganismos se ha empleado un equipo P-Selecta Presoclave-II de Selecta (Madrid, España).

Balanza de precisión: Material de laboratorio básico en multitud de operaciones elementales, se ha empleado un dispositivo KERN ABS (max: 220 g, d= 0,1 mg) de la casa KERN & SOHN GmbH (Ebingen, Alemania).

Balanza termogravimétrica: Usada para determinar la humedad de los residuos, se ha empleado un dispositivo KERN MLB-C (max: 50 g, d= 1 mg) de la casa KERN & SOHN GmbH (Ebingen, Alemania).

Cámara de flujo laminar: Para trabajar en condiciones de esterilidad se ha empleado un equipo Telstar (Tokio, Japón) modelo mini-V/PCR.

Centrífugas: Separar la biomasa microbiana por centrifugación es una operación básica en biotecnología, para llevarla a cabo en los distintos protocolos y a distintas escalas se han usado dos equipos distintos:

- ❖ Thermo Scientific (Waltham, EE. UU.) modelo Heareus pico 17 para centrifugar volúmenes bajos.
- ❖ Sigma (Osterode am Harz, Alemania) modelo 4-16K para volúmenes mayores.

Microscopio óptico: El análisis de la morfología fúngica, así como el conteo de esporas para la elaboración del stock se ha realizado utilizando un microscopio marca Optika Microscopes (Ponteranica, Italia) modelo Optikam 3.

Placa calefactora: En la elaboración de disoluciones para medios de cultivo se ha empleado una placa calefactora con control de temperatura PID y agitación magnética IKA (Staufen, Alemania) modelo RCT Basic.

Ultracongelador: Con el fin de conservar los stocks de esporas del microorganismo se emplea un equipo SANYO (Osaka, Japón), modelo VIP de la serie MDF-U33V.

3.3. Procedimientos experimentales

En esta sección se describen los distintos protocolos desarrollados y llevados a cabo en las distintas etapas de la investigación.

3.3.1. Pretratamiento de residuos

Debido a los distintos residuos usados como materia prima en la presente Tesis, los pretratamientos realizados serán adecuados a las propiedades de cada uno de los residuos:

Naranja:

Los residuos de naranja están principalmente compuestos por la pulpa y las cascara de las mismas, y de esta forma fueron recibidos en el laboratorio. Pueden ser conservados a -20 °C en congelador hasta 3 meses sin que se vean comprometidos y pierdan propiedades para su uso⁹⁸.

Para poder trabajar con ellos, se deben de triturar 3 veces hasta conseguir partículas de entre 2 y 3 mm de tamaño⁹⁸. Una vez que poseen un tamaño idóneo para trabajar con ellos, se determina su contenido en humedad por medio de la balanza termogravimétrica. Conocido este valor de humedad, se realizarán todos los cálculos posteriores, ya que la base de cálculo de todos los procedimientos es el sólido seco.

Una vez se tiene el sólido en un estado idóneo para su manipulación, se realiza la extracción de los aceites esenciales. Para ello se realiza una fase de contacto con acetona, teniendo un 5% de sólido seco en el disolvente durante 18 h en ausencia de luz. Posteriormente se separa por medio de una filtración a vacío con embudo Buchner, matraz Kitasato y filtro de papel.

De este proceso se obtienen dos fracciones distintas: por un lado, se tiene el sólido, que se seca a 45 °C *overnight*, y ya podrá utilizarse directamente como sólido seco para la hidrólisis enzimática.

La otra fracción, el líquido extractivo, contiene los aceites esenciales, de la cual pueden ser extraídos y valorizados (fuera del alcance de este trabajo).

Manzana:

En cuanto a los residuos de manzana, están principalmente compuestos por la peladura y la pulpa sobrante del proceso de obtención del zumo, así como por los sólidos sedimentados del proceso de clarificación. Este AP posee un tamaño de partícula adecuado para su manipulación. Por esta razón, no precisa de pretratamientos.

Su humedad también ha sido determinada, como en el caso de los OPW, para poder hacer los cálculos necesarios, para llevar a cabo las distintas operaciones.

3.3.2. Hidrólisis enzimática de residuos

El proceso de hidrólisis es análogo a todos los residuos, una vez que han sido pretratados, su objetivo final es la sacarificación total de la biomasa de dichos residuos.

Esta hidrólisis se lleva a cabo en los biorreactores descritos en la sección 3.2.1 a 50 °C, temperatura de trabajo óptima de las enzimas utilizadas, con una agitación de 350 r.p.m.

La carga de sólido depende del residuo utilizado, usualmente se realizan cargas totales de sólido inferiores al 20%, dependiendo de la humedad del sólido y del residuo que se hidrolice. El régimen de operación elegido para la hidrólisis enzimática es *fed-batch*, ya que, para evitar alcanzar viscosidades elevadas y para obtener concentraciones mayores de monosacáridos, es mejor dosificar las cargas.

El medio de reacción utilizado es tampón citrato 100 mM a pH 5, con este medio se mantiene la integridad de las enzimas a lo largo del proceso. Este pH se ha ido controlando y corrigiendo a lo largo del proceso usando NaOH 3 N.

En cuanto al coctel enzimático usado, está compuesto de las enzimas descritas en el capítulo 3.1.2. Esta combinación de enzimas (Tabla 3.2) lleva a la total hidrólisis y sacarificación de los distintos residuos empleados. Si bien las concentraciones no están optimizadas, se añaden en exceso para asegurar el máximo rendimiento.

Como se tiene un proceso en *fed-batch*, donde se van añadiendo cantidades de residuo periódicamente, el tiempo de operación se alarga, por lo que también se han realizado más de una carga de enzimas.

Tabla 3. 2: Composición del coctel enzimático empleado en la hidrolisis.

Enzima	Concentración (mg _{enzima} /g _{sólido seco})
Biogazyme 2x	18
Xylanase 2x	12
β -glucosidase 1000	9
Pektinase L40	9

3.3.3. Detoxificación de hidrolizados

Una vez que se han obtenido los hidrolizados de los residuos, estos deben de ser detoxificados. Esta etapa tiene como objetivo eliminar su alto contenido en sólidos en suspensión y compuestos potencialmente tóxicos para los microorganismos.

Inicialmente, se realiza una separación de los sólidos en suspensión del hidrolizado. Los gruesos se retiran por medio de un filtrado sencillo con un tamiz de 2 mm de luz. Para la separación de los sólidos en suspensión más finos, se hace una etapa de contacto con CaCO_3 que actúa como floculante. Se añade al hidrolizado una cantidad de 1 g/L de la sal y se tiene en contacto durante 10 min en un agitador de rodillos a 80 r.p.m. y a temperatura ambiente.

Tras esta etapa de contacto, los sólidos en suspensión quedan adheridos al carbonato y son fácilmente separados por centrifugación. Se realizan tres ciclos de centrifugación a 8.500 r.p.m. durante 10 minutos, recogiendo el sobrenadante de cada ciclo y volviendo a centrifugarlo en el ciclo posterior.

Después de la separación de los sólidos en suspensión, se aplican dos etapas de detoxificación con distintos adsorbentes. En primer lugar, se hace una etapa de detoxificación con carbón activo: se ponen en contacto 100 g de carbón por cada litro de hidrolizado (10%) y se tienen en contacto durante 30 minutos en las mismas condiciones de agitación que en el caso del carbonato (agitador de rodillos a 80 r.p.m. y temperatura ambiente).

Tras esta primera etapa de detoxificación, se separa el carbón activo por medio de una filtración sencilla con un filtro de papel y asistida con un vacío suave usando un embudo Buchner y un matraz Kitasato.

En la segunda etapa, se usa una resina de intercambio iónico Dowex® 50WX8, también conocida como Amberchorm® 50WX8, este contacto tiene exactamente las mismas condiciones de operación que la primera fase de detoxificación (10% de sólido, temperatura ambiente, 30 min de contacto y agitación en rodillos a 80 r.p.m.). La separación del sólido en este caso también se hace de la misma manera que en la fase anterior, por medio de un filtro de papel con Buchner y Kitasato.

Una vez que termina la etapa detoxificación, la resina debe de ser regenerada para posteriores ciclos de detoxificación. Para ello, se hace un primer lavado con agua MilliQ (500 mL por cada 100 g de resina), posteriormente se realiza la regeneración propiamente dicha, haciendo un contacto de la resina con ácido sulfúrico (H₂SO₄ 0,125 M, 100 mL por cada 100 g de resina) y, finalmente, se hace un lavado igual que el inicial. Después de esto se seca la resina en un cristizador y se almacena ya lista para usarse en otro ciclo de detoxificación.

Una vez que se ha detoxificado el hidrolizado, se realiza una filtración preliminar con un filtro de microfibras de vidrio (GE healthcare 1820-125) como fase previa a la esterilización por filtración, practicada con filtros esterilizantes. Este tratamiento da como resultado los hidrolizados, listos para usarse como fuente de carbono en los medios de fermentación. Son conservados a 4 °C en oscuridad.

3.3.4. Cultivo y elaboración de stock fúngico

El stock es el punto de partida para todos los experimentos, los stocks de bacterias se hacen con células de estas. Sin embargo, en hongos, estos stocks se hacen de esporas, como es el caso del presente trabajo.

En primer lugar, debe de cultivarse el microorganismo. Se siembran placas de Petri de medio PDA con *R. arrhizus* NRRL 1526, recibido como una suspensión de esporas. Se extiende sobre la placa con un asa de Drigalski, después del sembrado se incuban las placas a 34 °C durante cinco o seis días, hasta que se observe una esporulación adecuada (Figura 3.1) con un crecimiento del hongo en forma de césped.

Una vez que se ha conseguido una buena esporulación, se procede a la extracción de las esporas: se añaden 15 mL de suero salino (NaCl 9 g/L) a cada placa y se deja en contacto durante 15 minutos, para mejorar el contacto y la extracción, se presiona suavemente el césped con un asa de Drigalski de manera que el suero salino este extendido por toda la placa.

Transcurridos los 15 minutos, se retira el extracto de esporas y se deposita en un tubo de centrifuga de 50 mL. Tras ello, se retira el micelio en forma de césped con unas pinzas y se introduce en el mismo tubo de centrifuga que el extracto de esporas. Se agita el tubo en vortex con el fin de extraer el mayor número de esporas posible y se retira el micelio del interior del tubo, teniendo de esta manera el extracto final de esporas en suero salino.

Esta disolución de esporas debe de ser cuantificada para calcular la dosis adecuada para la elaboración del stock. Para ello se emplea una cámara de Neubauer donde se hace el conteo de las esporas con un microscopio óptico a 100 aumentos. Si el conteo no pudiera ser posible debido a una alta cantidad de esporas, se podrá diluir el extracto con suero salino hasta que sea posible la cuantificación.

Tras el conteo, se calcula la concentración de esporas del extracto y el volumen de cada stock para tener la dosis deseada. El extracto es repartido en alícuotas del volumen determinado en microtubos. Se añade además un volumen glicerol al 80%, que será igual a un tercio del volumen de las alícuotas de extracto. Esto se hace para tener una concentración final de glicerol de un 20%, proporción idónea para proteger las esporas en el proceso de ultracongelación.

Una vez que se tiene el stock de esporas en los microtubos, se conservan ultracongelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Figura 3. 1: Placa de PDA esporulada antes de la extracción de esporas.

3.3.5. Cultivo y fermentación fúngica

En la presente Tesis se han llevado a cabo las fermentaciones fúngicas tanto a pequeña escala en matraces Erlenmeyer, como a escalas mayores, usando un biorreactor. En ambos casos, todo el material que se ha usado, relacionado con este proceso, ha debido ser esterilizado antes por medio del autoclave y se ha procedido a la manipulación del microorganismo en cámara de flujo laminar, con el objetivo de evitar la contaminación por otros microorganismos.

Matraz Erlenmeyer

El proceso fermentativo implica varias etapas, como la mayoría de los procesos con microorganismos. Inicialmente, se deben de llevar a cabo etapas previas para crecer y adecuar el hongo, que después será llevado a la etapa de producción en las mejores condiciones posibles. Estas etapas son necesarias para estimular el metabolismo del hongo y hacerle llegar a un estado metabólico propicio para la producción. Además, en estas etapas previas se optimiza la morfología del hongo, siendo pues estas etapas vitales en el proceso.

Las etapas previas se han llevado a cabo en matraces Erlenmeyer de 100 mL con 20 mL de medio de inóculo a 200 r.p.m. y 34 °C. La concentración inicial de esporas es de $5 \cdot 10^8$ esporas/L. Sin embargo, estas condiciones de operación han sido estudiadas con el fin de mejorar el proceso.

La etapa de producción se ha llevado a cabo tanto en matraces Erlenmeyer, como en biorreactor, para hacer el cambio de etapa se ha traspasado desde un inóculo ya crecido, un 10% (v/v) del volumen de producción.

En las fermentaciones llevadas a cabo en matraces Erlenmeyer, se han tenido las mismas condiciones de operación que en la etapa de inóculo: matraces de 100 mL con 20 ml de medio, 400 r.p.m. y 34 °C. En estas etapas de producción, se ha ido haciendo un seguimiento de la evolución de los distintos componentes en el medio de fermentación.

Debido a la naturaleza filamentosa del hongo empleado, la cuantificación de la biomasa se hace por determinación del peso seco. Para poder hacer un seguimiento de la evolución de esta en el proceso, se ha desarrollado el protocolo de trabajo denominado “un matraz, una muestra”. Este protocolo consiste en que cada muestra tomada a lo largo del proceso es un matraz distinto. Por esta razón el proceso debe

de desarrollarse con una reproducibilidad exquisita, siendo todos los matraces inoculados en cada experimento exactamente iguales a un tiempo determinado.

Biorreactor:

Las fermentaciones llevadas a cabo en biorreactor también han contado con su etapa de inóculo, llevada a cabo en matraz Erlenmeyer, en las mismas condiciones que se han descrito previamente. Para la puesta en marcha de estas fermentaciones también ha sido transferida al biorreactor el 10% (v/v) de un inóculo ya crecido.

El dispositivo de reacción es descrito en el apartado 3.2.1, teniendo una capacidad total de 500 mL, las fermentaciones se han llevado a cabo en 200 mL de volumen de trabajo, a una temperatura de 34 °C, en rango de agitaciones comprendido entre 200 y 1.000 r.p.m., los caudales de aire se han variado desde 0 a 2 vvm (0 – 0,4 L/min).

Las muestras tomadas a lo largo de los experimentos han sido extraídas por la boquilla correspondiente del dispositivo, se han tomado muestras del caldo de cultivo de 2 mL, pudiendo cogerse hasta 10 muestras por experimento, ya que no debe de extraerse más del 10% del volumen de trabajo, para no afectar a la reproducibilidad.

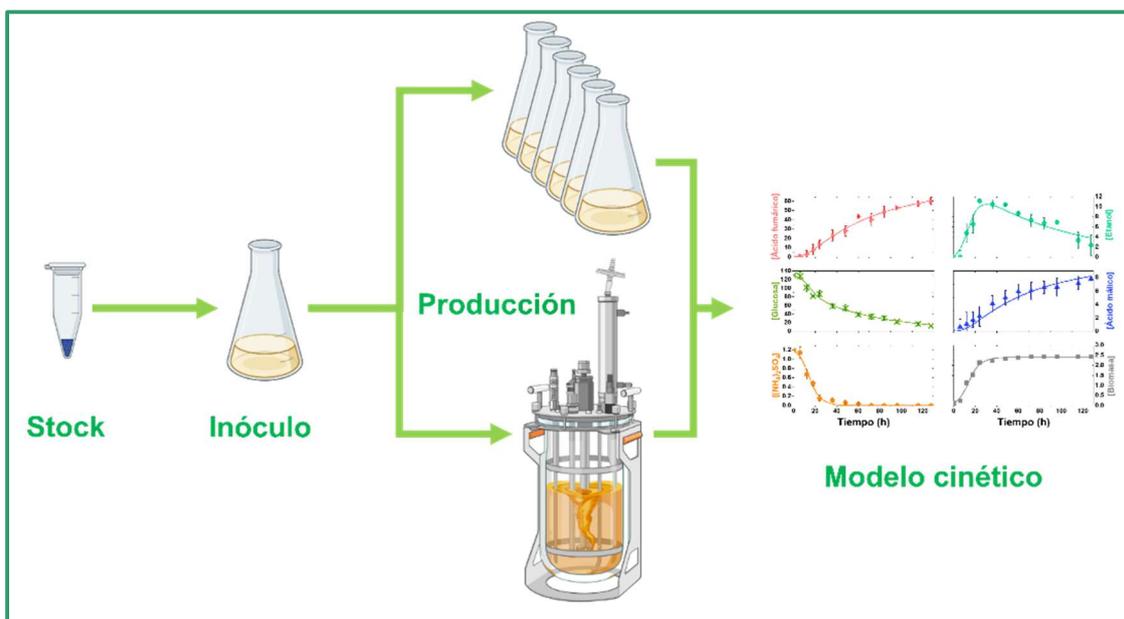


Figura 3. 2: Etapas del proceso fermentativo.

3.3.6. Medida de transferencia de oxígeno en biorreactor

Se ha llevado a cabo la determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L \cdot a$), tanto en presencia como en ausencia de células:

Método dinámico de desorción con Nitrógeno

La determinación física del valor del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en ausencia de células se ha llevado a cabo en el biorreactor empleado en este trabajo sin inocular el medio de cultivo. En ciertas condiciones de agitación, se satura de oxígeno el medio y, posteriormente se introduce nitrógeno a un caudal determinado para desorber el oxígeno de la fase líquida, tomando datos de la concentración de oxígeno cada 10 segundos durante unos pocos minutos. El proceso se lleva a cabo a varias velocidades de agitación y de caudal de nitrógeno.

Método dinámico en presencia de células

Este método se realiza sobre la fermentación en proceso. Consiste en, llegado cierto momento, interrumpir el aporte de oxígeno en el biorreactor y medir la evolución de este en disolución, con esta etapa se mide la velocidad de consumo de oxígeno, ya que el aporte de este se ve interrumpido. Tras esta medida, se vuelve a introducir aireación y se mide la evolución de oxígeno hasta su estabilización, de manera que en esa etapa se mide conjuntamente OUR y OTR.

3.4. Métodos de análisis

En esta sección se enumeran y describen los distintos medios de análisis utilizados en la investigación.

3.4.1. Análisis electroquímicos

pH

El pH de las muestras líquidas se ha determinado con un dispositivo HI-5222 y una sonda HI-1131 de Hanna Instruments (Villafranca Padovana, Italia), descritos anteriormente. Las medidas se han realizado directamente sobre las muestras

liquidadas, obteniendo el valor correspondiente de pH por lectura directa. Previamente a las medidas, se debe hacer el calibrado del dispositivo, mediante disoluciones patrón de pH conocido.

Medida de amonio

Para la determinación del amonio en disolución, se ha empleado el mismo dispositivo que para la medida de pH, pero usando una sonda específica HI-4101 (Hanna Instruments, Villafranca Padovana, Italia).

Las muestras líquidas deben ser adecuadas para este análisis. Para lograrlo se añaden 20 μ L de disolución ISA (*Ionic Strength Adjustment*) a alícuotas de 1 mL de muestra. Esta disolución convierte los iones amonio en amoniaco (compuesto permeable a la membrana de la sonda, que realmente es detectado)

Los resultados obtenidos en las medidas se miden en mV, para conocer el contenido real de amonio en las muestras se realiza previamente un calibrado de la sonda con disoluciones patrón de amonio.

3.4.2. Cuantificación de la biomasa

Determinación por peso seco

La cuantificación de biomasa por peso seco se ha utilizado en las primeras etapas de la investigación. Para llevarla a cabo, por medio del método de trabajo “un matraz, una muestra” se ha tomado la cantidad total de biomasa en cada uno de los matraces.

En primer lugar, se lava la biomasa; para ello se ha utilizado HCl al 5% y agua MilliQ, directamente añadidos a los matraces. Posteriormente se calientan los matraces hasta 60 °C para maximizar la solubilización de posibles precipitados. Después de esto, se filtra en caliente con filtro de papel (previamente tarado) asistida por vacío con embudo Buchner y matraz Kitasato. Una vez filtrado el sólido, se lava con agua MilliQ en abundancia.

Finalmente se lleva el filtro con el sólido a calefacción, se deseca a 105 °C durante 48 h y, tras ello, se determina la cantidad de sólidos por pesada.

Medida indirecta por nitrógeno fijado

Debido a interferencias encontradas en la cuantificación de biomasa por peso seco, se ha desarrollado un método indirecto, a través de la cantidad de fuente de nitrógeno fijada. El sulfato de amonio es la única fuente de nitrógeno existente en los medios de producción, se conoce su concentración inicial y se ha llevado a cabo un seguimiento de su evolución a lo largo del tiempo.

Por tanto, se asume que todo el sulfato de amonio consumido es asimilado por el microorganismo y pasa a formar parte de su biomasa. Con lo cual, conociendo la composición elemental de la biomasa y realizando cálculos estequiométricos sencillos, se llega a la determinación de la concentración de biomasa.

3.4.3. Cromatografía líquida de alta resolución

La HPLC es una técnica idónea para la determinación de la concentración de los distintos componentes conocidos en cada muestra.

Las columnas empleadas para la separación cromatográfica han sido descritas en el apartado 3.2.2, ambas columnas trabajan por exclusión molecular, siendo la matriz de su interior una resina entrecruzada de superficie sulfonada.

La columna de protones es muy útil para determinar la concentración de los ácidos orgánicos producidos en la fermentación, así como los distintos alcoholes que se puedan producir. Además, tiene una resolución aceptable con ciertos azúcares como la glucosa y la fructosa (azúcares mayoritarios en los hidrolizados empleados).

Por su parte, la columna de Pb es idónea para la determinación de los distintos azúcares presentes en los hidrolizados. Tiene gran capacidad de separación y resolución de estos, sin tener interferencias entre ellos. Este tipo de columnas son muy convenientes para el análisis de muestras con un variado contenido en carbohidratos.

Al tener cada una de las columnas distinta afinidad por distintos compuestos, deben conocerse las sustancias que se van a medir y determinarse previamente su tiempo de retención con cada una de las columnas. Además, para llevar a cabo esta cuantificación, deben de hacerse previamente calibrados de las distintas especies, en un rango de concentraciones similares a las de trabajo.

El dispositivo que se ha utilizado para llevar a cabo estos análisis ya ha sido descrito en el apartado 3.2.2; es un dispositivo modular que hace pasar la muestra por la columna, donde se lleva a cabo la separación de las distintas sustancias a analizar. Tras ello se realiza la cuantificación de las mismas.

Casi todas las sustancias medidas en el presente trabajo han sido cuantificadas por medio del medidor de índice de refracción (RID: *Refraction Index Detector*). Este dispositivo mide la desviación de la luz comparada con una celda de referencia a partir de la cual se crea la señal medida en el cromatograma.

El ácido fumárico ha sido cuantificado por medio del detector de *array* de diodos (DAD: *Diode Array Detector*) a una longitud de onda específica de 250 nm. Esta longitud de onda se ha seleccionado a través de un estudio del espectro del ácido fumárico, determinándose esta como la longitud de onda idónea para realizar el análisis. Se ha decidido medir esta sustancia con el DAD debido a que no presenta ningún tipo de interferencia con otras sustancias, midiéndose con una sensibilidad excelente.

En la Tabla 3.3 pueden verse las condiciones de los distintos métodos empleados para el análisis de las distintas muestras, en función de la columna cromatográfica empleada. Las muestras de los experimentos de fermentación han sido analizadas únicamente por el método de la columna de protones. Por su parte, las muestras provenientes de los experimentos de hidrólisis enzimáticas se han analizado con ambos métodos, el de la columna de protones y el de la columna de Pb; esto se debe a la rica composición de los hidrolizados en diversos tipos de azúcares.

Tabla 3. 3: Métodos de HPLC utilizados

Columna	Protones	Pb
Fase móvil	H ₂ SO ₄ 0,1 M	H ₂ O MilliQ
Presión máxima (MPa)	6	6
Caudal (mL/min)	0,5	0,6
Temperatura (°C)	60	80
Volumen de inyección (µL)	10	10
Tiempo de método (min)	30	35

3.4.4. Distribución de tamaño de partículas

Para la determinación de la distribución del tamaño de partículas, se ha empleado un método recurrente en algunos bioprocesos como la floculación de algas.

La técnica empleada es la medida de la longitud de cuerda de partícula por medio de reflexión de haz concentrado, FBRM (*Focused Beam Reflectance Measurement*), usando un dispositivo Particle Track 400 probe (PT400) de Metler-Toledo (Columbus, EE. UU.). Este equipo se ha utilizado gracias a la colaboración del Dr. Patricio López Expósito y la Dra. María Ángeles Blanco Suárez pertenecientes al grupo de investigación “Celulosa y papel” de la UCM.

La técnica consiste en la medida del tiempo de reflexión de un haz laser concentrado giratorio, conociendo la velocidad de giro y el tiempo de reflexión, se puede determinar la longitud de cuerda de las partículas. Posteriormente, por medio de un software específico de corrección, usando modelos de regresión, se obtiene la distribución de tamaño de partículas.

3.4.5. Métodos colorimétricos

En este apartado se enumeran los diversos métodos analíticos basados en la colorimetría, usados para la determinación de ciertas sustancias específicas en diversos ensayos.

Determinación de proteína soluble

Se ha realizado la cuantificación de proteína soluble en muestras líquidas usando el método de Bradford⁹⁹ para determinar la presencia de péptidos en los distintos medios de fermentación. Se ha seguido el protocolo original definido por Bradford en 1976⁹⁹. Obteniendo resultados de gramos de péptido soluble por litro de muestra.

Determinación de compuestos fenólicos

Para la determinación del contenido de compuestos fenólicos totales, presentes en las distintas muestras de hidrolizados, se ha llevado a cabo el método de Folin-Ciocalteu, concretamente el protocolo desarrollado por Ribeiro et al.¹⁰⁰. Con este método se determina el contenido total de compuestos fenólicos, expresado en miligramos de ácido gálico equivalente por litro.

Determinación de actividad antioxidante

Los compuestos antioxidantes contenidos en los distintos medios obtenidos de los residuos de frutas, han sido cuantificados por el método DPPH⁴⁴ (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo), obteniendo los resultados en miligramos equivalentes de TROLOX (Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) por litro.

3.4.6. Análisis en Centros de Apoyo a la Investigación

La Universidad Complutense de Madrid dispone de una red de Centros de Apoyo a la Investigación en su campus. Estas instalaciones tienen la finalidad de proporcionar a los investigadores de la universidad acceso a ciertas técnicas experimentales avanzadas. En el contexto de esta Tesis, se ha recurrido a alguna de estas instalaciones para llevar a cabo ciertos análisis específicos.

Microscopia electrónica

El Centro Nacional de Microscopia Electrónica (CNME) es una Instalación Científico-Técnica Singular (ICTS), ubicado en el campus de la UCM, es el centro de referencia nacional en esta técnica. Entre los múltiples análisis que ofrece, destaca la microscopia electrónica de barrido con espectroscopia de dispersión de energía, SEM-EDS (*Scanning Electronic Microscopy with Energy Dispersion Spectroscopy*). Esta tecnología combina la obtención de imágenes de alta resolución característica del SEM, junto con un análisis local de composición elemental de muestras que aporta la tecnología EDS.

Para estos análisis se ha empleado el microscopio JSM 6335F de la empresa JEOL (Tokio, Japón). Las muestras analizadas por microscopia electrónica deben ser liofilizadas para eliminar su contenido en agua, ya que esta ocasiona interferencias en los equipos. Además, han sido preparadas con un recubrimiento de oro para obtener mejores condiciones de imagen.

Microanálisis elemental

En las instalaciones de la Unidad de Microanálisis Elemental, utilizando un micro analizador de la empresa LECO Instruments (St. Joseph, EE. UU.), modelo CHNS-932. Se ha obtenido de forma muy precisa la composición elemental de la biomasa fúngica a lo largo del proceso.

Para poder realizar este análisis las muestras han debido ser liofilizadas previamente, ya que el analizador trabaja por combustión total de la muestra.

3.5. Recursos informáticos

Para la realización del presente estudio, se han empleado distintos recursos informáticos, todos ellos proporcionados por la biblioteca de software de la UCM:

- ❖ **Aspen Custom Modeller® V11:** Empleado para el ajuste de los modelos cinéticos a los datos experimentales obtenidos. Emplea métodos matemáticos de ajuste no lineal, basados en el algoritmo NL2SOL, combinado con integración numérica por el método de Euler.
- ❖ **ChromNAV Ver. 2:** Software específico para la obtención, tratamiento e interpretación de cromatogramas, usado para determinar la composición de las muestras analizadas por HPLC.
- ❖ **OriginLab® 2021:** Empleado para la elaboración de gráficas y figuras, así como para realizar ajustes matemáticos sencillos de modelos de crecimiento.
- ❖ **Statgraphics® centurion 19:** Software para el planteamiento y optimización del diseño experimental.

3.6. Métodos matemáticos

En el contexto de la implantación industrial del proceso estudiado, uno de los principales objetivos de la tesis es el modelado cinético del proceso.

Para llevar a cabo este modelado cinético se ha empleado el software Aspen Custom Modeller® V11, descrito en el apartado anterior.

3.6.1. Parámetros estadísticos

Para discernir entre los distintos modelos cinéticos, propuestos en los distintos experimentos. Se busca una bondad de ajuste adecuada a los datos experimentales. Para ello, se ha recurrido a distintos parámetros estadísticos:

El error cuadrático medio, RMSE (*Root Main Square Error*) (ecuación 3.1) es un parámetro que minimizar. Su valor representa una medida del error entre los datos experimentales y los estimados en el modelo obtenido. Este parámetro se basa en la suma de residuos al cuadrado, SSR (*Sum of Squared Residuals*) (ecuación 3.2), teniendo en cuenta el número de grados de libertad que ofrece el modelo (N-K).

$$RMSE = \sqrt{\frac{SSR}{(N - K)}} \quad [3.1]$$

$$SSR = \sum_{j=1}^{j=K} \sum_{i=1}^{i=N} (C_{ij \text{ exp}} - C_{ij \text{ calc}})^2 \quad [3.2]$$

Siendo N el número de datos experimentales y K el número de parámetros que posee el modelo.

Otro criterio estadístico que se ha utilizado para determinar la validez de los modelos propuestos está representado por la F de Fisher. F_{95} (ecuación 3.3) es un parámetro significativo, que indica la probabilidad de que el modelo esté representado por una distribución de Fisher-Snedecor al 95% de probabilidad. Es un parámetro que maximizar, que debe de estar siempre por encima de un valor crítico (teórico y tabulado).

$$F_{95} = \frac{\sum_{j=1}^{j=K} \sum_{n=1}^{n=N} \left(\frac{C_{jn \text{ calc}}}{K} \right)^2}{\sum_{j=1}^{j=K} \sum_{n=1}^{n=N} \left(\frac{SSR}{N - K} \right)} \quad [3.3]$$

Por último, el porcentaje de variación explicado, %VE (ecuación 3.4) representa cuan adecuado es el modelo para explicar la evolución de las variables dependientes con la variable independiente (tiempo en este caso). Su valor debe ser lo más cercano posible al 100%, significando que el modelo explique perfectamente el cambio de las variables dependientes con el tiempo.

$$\%VE = 100 \cdot \left(1 - \frac{\sum_{l=1}^{l=L} SSR_l}{\sum_{l=1}^{l=L} SSR_{\text{medial}}} \right) \quad [3.4]$$

SSR_l indica la suma de residuos al cuadrado, calculada para L variables diferentes; SSR_{medial} representa la suma de desviaciones al cuadrado de los datos experimentales y el valor medio de las variables calculadas.

3.6.2. Métodos de cálculo

Para ajustar los diferentes modelos propuestos en este trabajo (todos consistentes en sistemas de ecuaciones diferenciales acopladas) se ha empleado el método integral de cálculo cinético ya que los datos experimentales son integrales.

Para ello se ha utilizado la integración numérica de las ecuaciones del modelo empleando el algoritmo de Euler de intervalo variable acoplado al algoritmo NL2SOL de regresión no lineal, un método adaptativo de regresión no lineal por mínimos cuadrados. Estas rutinas se encuentran dentro del programa Aspen Custom Modeller® V11.

4. Discusión

integradora

“La lucha milenaria entre el microbio y el hombre se reduce a una sola cuestión: ¿Quién domestica a quién?”

Santiago Ramon y Cajal

En este capítulo de la presente Tesis Doctoral se compendian, discuten e integran las distintas publicaciones divulgadas a lo largo de la realización de este doctorado. Además, también se expone trabajo no publicado y que está por publicar, que forma parte del proceso y del conjunto de la investigación llevada a cabo.

Como ya se ha comentado, esta Tesis se centra en el estudio del proceso biotecnológico de producción de ácido fumárico por el hongo *R. arrhizus*, un proceso que se integraría en una biorrefinería de segunda generación, por lo que se estudia el uso de hidrolizados de residuos de fruta como materia prima. Para ello, como se suele hacer en el desarrollo de este tipo de bioprocesos, se comienza trabajando con medios sintéticos y, posteriormente, se pasa al empleo de los hidrolizados de residuos. Por lo tanto, el presente capítulo está estructurado siguiendo las distintas etapas de la investigación: fermentación con medios sintéticos en incubadora orbital, hidrólisis de los residuos de fruta, producción de ácido fumárico a partir de los hidrolizados de residuos a nivel de incubadora orbital y, por último, estudios de producción de ácido fumárico en biorreactor de laboratorio. Cada una de las secciones se dividirá en distintos apartados recopilando los distintos estudios y publicaciones de cada etapa.

Además de los artículos de investigación científica, el compendio de publicaciones incluye un primer estudio bibliográfico de revisión del estado del arte (*review*) que se realizó en las primeras etapas del doctorado.

La integración de las distintas publicaciones y estudios no publicados en las correspondientes etapas del proceso está recogida en la Figura 4.1. Así pues, las publicaciones científicas que forman parte de este capítulo son:

❖ **Publicación 1:** Revisión bibliográfica.

Título: Fumaric acid production: A biorefinery perspective.

Autores: Víctor Martín-Domínguez, Juliana Estevez, Francisco de Borja Ojembarrena, Victoria E. Santos y Miguel Ladero.

Revista: *Fermentation* (2018). 4, 33.

DOI: 10.3390/fermentation4020033.

❖ **Publicación 2:** Estudios de etapas previas del proceso de fermentación.

Título: Kinetic modelling of the coproduction process of fumaric and malic acids by *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526.

Autores: Víctor Martín-Domínguez, Laura Bouzas-Santiso, Nieves Martínez-Peinado, Victoria E. Santos y Miguel Ladero.

Revista: *Processes* (2020). 8, 188.

DOI: 10.3390/pr8020188.

- ❖ **Publicación 3:** Simplificación del medio de producción y estudio de la influencia de la fuente de nitrógeno.

Título: Production of fumaric acid by *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526: A simple production medium and the kinetic modelling of the bioprocess.

Autores: Víctor Martín-Domínguez, Paula I. Alemán-Cabrera, Laslo Eidt, Ulf Pruesse, Anja Kuenz, Miguel Ladero y Victoria E. Santos.

Revista: *Fermentation* (2022). 8, 64.

DOI: 10.3390/fermentation8020064.

- ❖ **Publicación 4:** Obtención, caracterización de hidrolizados de manzana y producción de ácido fumárico a partir de estos.

Título: Fumaric acid production from apple pomace hydrolysate with *R. arrhizus*: Kinetic modelling.

Autores: Víctor Martín-Domínguez, Jorge García-Montalvo, Alberto García-Martín, Miguel Ladero y Victoria E. Santos.

Revista: *Processes* (invitado y enviado, 2022).

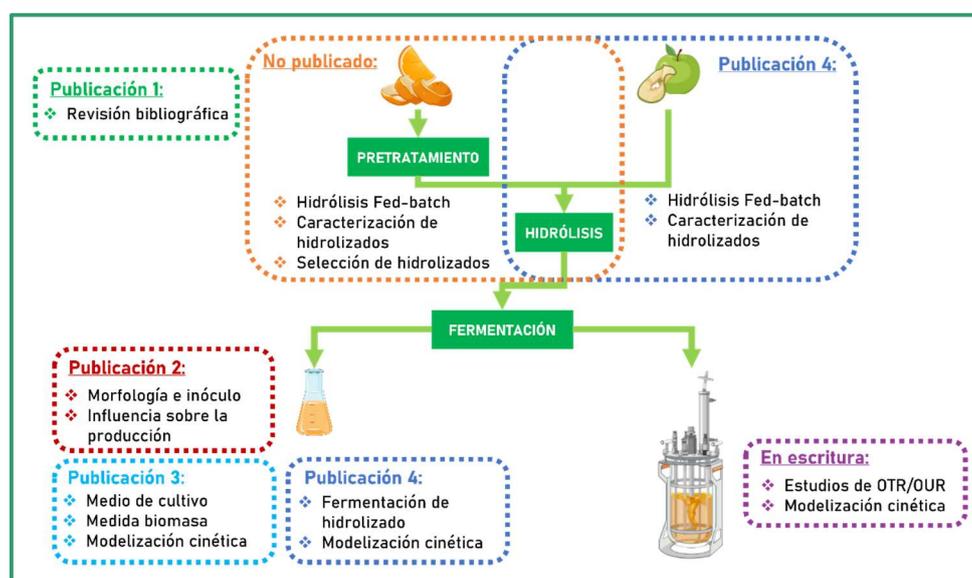


Figura 4. 1: Estructura del trabajo presentado, recogido en diversas publicaciones y partes no publicadas.

4.1. Producción de ácido fumárico empleando medios sintéticos

Como se ha señalado, el primer bloque experimental de la presente Tesis Doctoral versa sobre la producción de ácido fumárico a pequeña escala (en matraz Erlenmeyer de 100 mL), empleando medios sintéticos. Esta primera etapa busca el estudio, comprensión y modelización del proceso en condiciones conocidas. Se han estudiado variables que afectan a las distintas etapas del proceso: desde la morfología del hongo, hasta la composición del medio de fermentación.

Los resultados de este estudio están recogidos en las publicaciones 2 y 3 de los anexos, si bien, para el comienzo de este bloque experimental y la elección de las primeras condiciones de operación, así como de las variables a estudiar y los intervalos de estas, se precisó de un conocimiento previo, obtenido con la realización de la publicación 1, consistente en una mini-revisión del estado del arte, como punto de partida.

4.1.1. Morfología y estudios de la etapa de inóculo

En primer lugar, se estudiaron las etapas previas de crecimiento del hongo. Como ya se ha mencionado en capítulos anteriores, estas etapas tienen el objetivo de desarrollar una morfología adecuada en el micelio, así como promover un estado metabólico propicio para la etapa de producción.

En la bibliografía se encuentran multitud de estudios sobre distintos parámetros que influyen en la morfología del hongo, desde condiciones de operación hasta parámetros de formulación del medio de cultivo^{28,59}. En el presente estudio, se decidió investigar la morfología del hongo en función de la concentración inicial de esporas. Es de destacar que, en el grupo de investigación FQPIMA, no se había desarrollado previamente una metodología de generación de inóculos con hongos filamentosos, por lo que en este trabajo se tuvo que poner a punto todo el procedimiento experimental, sin apoyarse en experiencia previa del grupo.

En este estudio se observó como altas concentraciones de esporas tienden a favorecer la nucleación, teniendo morfologías de *pellets* y micelios dispersos, mientras que las bajas concentraciones de esporas tienden a favorecer el crecimiento descontrolado de la biomasa en pocos núcleos, dando lugar a *clumps*.

Por ello, se determinó la concentración inicial de esporas más conveniente (**10⁹ esporas/L**) para el desarrollo de *pellets* pequeños y bien diferenciados (Figura 4.2), conociendo esta concentración, se elaboró el stock en dosis exactas para comenzar un experimento de forma comparable.

Una vez que se consiguió una morfología adecuada, se procedió a estudiar la evolución de esta. Se realizaron distintos estudios sobre el crecimiento desde las esporas hasta el desarrollo final de la morfología. En primer lugar, se determinó la temperatura a la que mejor se desarrolla el hongo, obteniéndose que a **34 °C** se consigue una buena concentración de biomasa en un tiempo aceptable y con una morfología adecuada (Figura 3 en Anexo II).

Posteriormente, se estudió el desarrollo de la etapa de inóculo, haciendo hincapié en la evolución del pH. En la Figura 4.3a puede

observarse la evolución de la biomasa en crecimiento y del pH en dicha etapa. Cabe destacar la ausencia de CaCO₃ en la formulación del medio, por lo que no existe control de pH y este evoluciona libremente, decreciendo, debido a la producción de ciertos ácidos orgánicos. Al ser el hongo un organismo acidófilo, estos ácidos se producen para adaptar el medio a unas condiciones más favorables para el desarrollo fúngico. Sin embargo, llegado cierto punto, el pH desciende demasiado, generando inhibición al metabolismo, con lo que el crecimiento se ve impedido.



Figura 4. 2: Morfología de *R. arrhizus* NRRL 1526 elegida para producción de ácido fumárico.

El consumo de glucosa en la etapa de inóculo es muy escaso, debido a la inhibición del crecimiento causada por el pH. La producción de ácido fumárico, por su parte, no se detectó en ningún momento. Esta ausencia de producción puede ser debida a la ausencia de una fuente de CO₂, como es el CaCO₃, ya que se precisa como sustrato en la ruta metabólica de producción⁴.

A partir de estas observaciones, se probaron distintos tiempos de la etapa de inóculo, en el marco de la fase de crecimiento exponencial (12, 15 y 17,5 h), y se llevaron a cabo producciones a partir de estos, obteniendo los resultados plasmados en la Figura 4.3b. Cabe destacar la misma concentración final de microorganismo en todos los ensayos, a pesar de la cual, la concentración final de ácido fumárico se volvía menor en las etapas de producción, cuanto más maduro era el inóculo a partir del que se desarrollaba. Este comportamiento confirmó el aletargamiento del metabolismo fúngico en el inóculo por efecto del pH.

El tiempo de inóculo se estableció en **12 h**, ya que se alcanza una mayor concentración final de ácido fumárico. Además, este valor coincide con el criterio clásico de selección del tiempo de inóculo de un tercio de la etapa de crecimiento¹⁰¹.

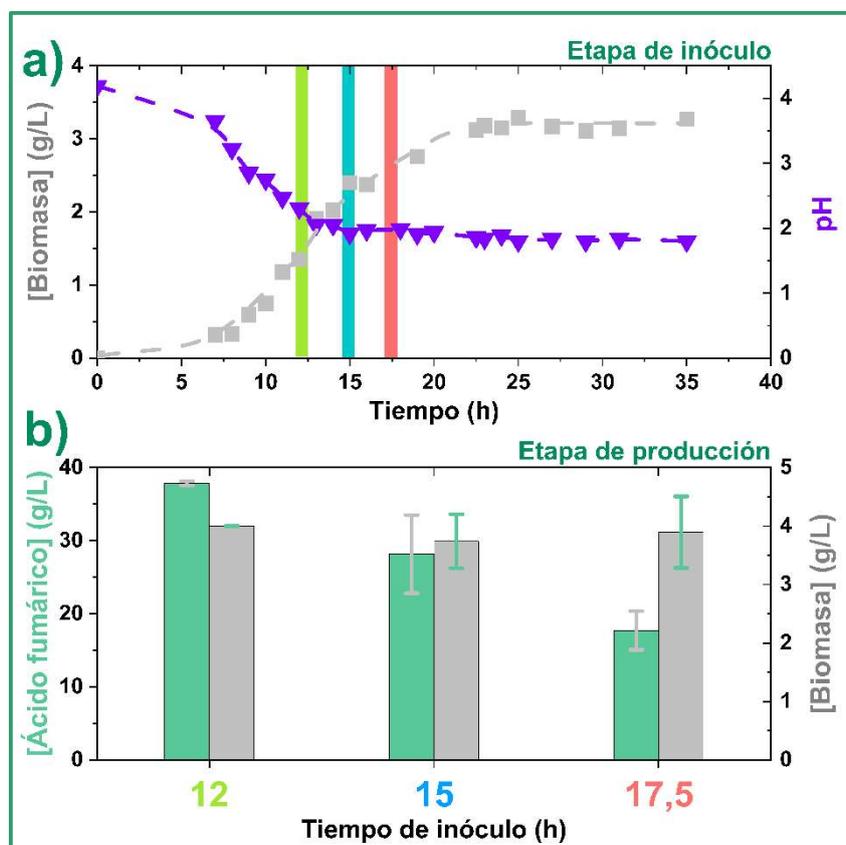


Figura 4. 3: Determinación de la duración del inóculo (a), buscando una mayor producción de ácido fumárico (b) (fermentación tras 5 días a 200 r.p.m. y 34°C).

Tras observar estos efectos, se realizaron experimentos para comprobar la necesidad de control de pH en la etapa de producción, además de la necesidad de un aporte de CO₂. En estos experimentos, se llevaron a cabo fermentaciones con y sin CaCO₃, observando que en las fermentaciones en las que no se usó carbonato para controlar el pH y aportar CO₂, no hubo producción de ácido fumárico; mientras que en las que sí se empleó CaCO₃, sí se observó producción. Con esto, quedó confirmada la **necesidad de introducir CaCO₃** en el medio de producción. Este carbonato proporciona el aporte necesario de CO₂ para llevar a cabo el TCA reductiva y ejercer un control de pH adecuado en el medio.

Una vez que se obtuvo una producción de ácido fumárico controlada, se estudiaron los efectos de ciertas variables de la etapa de inóculo sobre la etapa de producción. En primer lugar, se comprobó la idoneidad de llevar a cabo varias etapas previas. En procesos bacterianos es ampliamente reconocida la necesidad de dos etapas previas, al menos, antes de la fase de producción con el fin de desarrollar un estado metabólico idóneo, tener una concentración de biomasa adecuada y resultados experimentales reproducibles^{102,103}.

Tras este estudio, se evidenció la necesidad de la preparación del inóculo para el adecuado desarrollo y control de la morfología. Además, si no tiene lugar esta etapa de inóculo, parece no alcanzarse un buen estado metabólico para la producción de ácido fumárico, ya que las concentraciones finales obtenidas en estos experimentos eran inferiores (≈ 12 g/L), respecto a las obtenidas con inóculo (≈ 25 g/L). Sin embargo, se llegó a la conclusión de que **la etapa previa debe ser solo una**, ya que un mayor número de etapas aletarga el metabolismo del hongo, debido al bajo valor de pH alcanzado en las etapas de inóculo. También este efecto del pH hace que el crecimiento en la segunda etapa de inóculo sea menor, teniendo una menor concentración inicial de biomasa en la etapa de producción (Figura 4.b en Anexo II).

Seguidamente se estudió la concentración inicial de biomasa idónea para la etapa de producción. Se probaron valores típicos en este tipo de procesos, obteniendo una mayor producción con una carga inicial de 0,154 g_{biomasa}/L, esta concentración es resultado de transferir el **10% (v/v) del inóculo a producción**.

Se observó un crecimiento celular muy parecido con las distintas cargas iniciales, ya que, el crecimiento está limitado por la concentración de nutrientes (sobre todo de la fuente nitrógeno). Sin embargo, cuanto mayor es la carga inicial de biomasa, se observó como el flujo de carbono se dirigía hacia el crecimiento y

mantenimiento celular, más que hacia la producción de ácido fumárico (Figura 7 en Anexo II).

Tras estos estudios preliminares, se llevó a cabo una primera modelización cinética del proceso, basada la ecuación logística (ecuaciones 5-10 en Anexo II). Con esto, se comenzaron a observar ciertos comportamientos que han sido confirmados a lo largo de la investigación: como la limitación del crecimiento celular por algún factor diferente a la concentración de azúcares; o la independencia de la producción de ácido fumárico del crecimiento celular.

Además, en estas primeras fermentaciones se observó cómo se producían varios ácidos orgánicos a la vez que el ácido fumárico: ácidos succínico y cítrico en pequeñas cantidades (5,4 y < 1 g/L, respectivamente). Pero sin duda, lo más llamativo fue la producción de ácido málico (26,45 g/L), ya que se producía en concentraciones muy parecidas al ácido fumárico (29,52 g/L) siendo, por lo tanto, un proceso de coproducción (Figura 8 en Anexo II).

Así pues, en las siguientes etapas de investigación se buscó estudiar en profundidad la composición del medio de cultivo, para intentar entender mejor el proceso y mejorar la producción de ácido fumárico.

4.1.2. Estudio del medio de cultivo

Una vez estudiada la etapa de inóculo, se buscó una forma de mejorar la producción de ácido fumárico, para ello se hicieron estudios sobre ciertos compuestos importantes (que se exponen a continuación) en la formulación del medio empleado hasta el momento, que era el de referencia en bibliografía⁶⁹:

Carbonato de calcio:

El CaCO_3 fue el primer componente en ser estudiado, en el apartado anterior se demostró que su presencia era totalmente necesaria para la producción de ácido fumárico. Por lo que se decidió indagar más en esta necesidad y como mejorar las condiciones de operación a partir de ella. Además, a lo largo de los distintos ensayos realizados, se detectaron ciertos problemas de solidificación del medio. Esta solidificación podría ser debida a una excesiva cantidad de iones Ca^{2+} , que llevan a la precipitación de fumarato de calcio, provocando la formación de agregados de fumarato y biomasa.

Así pues, se buscó la reducción de los iones Ca^{2+} , sin afectar a la producción de ácido fumárico por falta de CO_2 . Se probaron varios niveles de concentración de CaCO_3 . Hallándose que, con una reducción moderada de la concentración de carbonato cálcico (35 g/L), se tenían concentraciones finales muy próximas a las ya obtenidas, pudiendo llegar a ser mayores. Al mismo tiempo, la solidificación no volvió a darse y el control de pH se llevó a cabo de una forma similar, manteniéndose alrededor de un valor de 5. No obstante, se comprobó que una reducción mayor del carbonato provoca una baja producción (Figura 1 en Anexo III).

Asimismo, se estudió la posible influencia del tamaño de partícula del carbonato, buscando dilucidar el rol que este tiene sobre el desarrollo de la morfología. Se estudiaron dos tipos diferentes de carbonatos de calcio (diferentes casas comerciales y distintas especificaciones), con el fin de intentar mejorar el proceso. Se observó que diferentes CaCO_3 , con una distribución distinta del tamaño de sus partículas, proporcionaban distintas producciones de ácido fumárico. Siendo de destacar que, cuando la distribución de los tamaños de partícula es menos dispersa y se tiene un menor diámetro medio de partícula (**20,31 μm**) la producción aumentaba (Figura 2b en Anexo III).

A la vista de estos resultados, se analizaron ambos carbonatos por medio de SEM-EDS. Obteniendo las imágenes mostradas en la Figura 4.4, donde pueden apreciarse distintos sistemas de cristalización, trigonal en el caso de la Figura 4.4a y ortorrómbico en la Figura 4.4b. También se apreciaron diferencias en la forma y tamaño de los microcristales, estas diferencias hacen que se agreguen de forma distinta, dando lugar a las distintas distribuciones de tamaños de partícula.

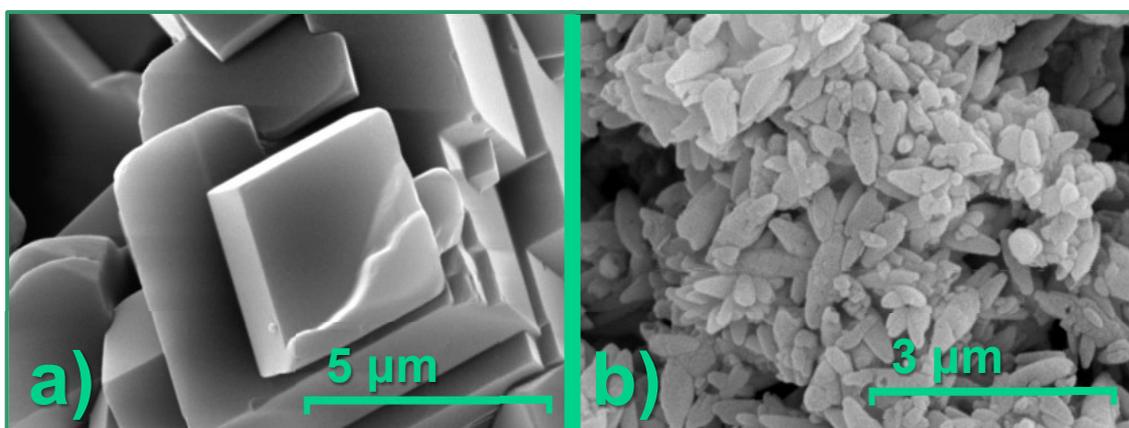


Figura 4. 4: Diferentes sistemas de cristalización y tamaños de partícula en los diferentes tipos de CaCO_3 : a) $dp = 57,77 \mu\text{m}$. b) $dp = 20,31 \mu\text{m}$

El análisis SEM-EDS también proporcionó resultados semi cualitativos de la micro-composición de ambos tipos de CaCO_3 , concluyendo que esta es prácticamente igual en ambos casos. Por lo que las diferentes productividades obtenidas, son debidas al tamaño y la forma de las partículas, no habiendo ningún efecto aparente por parte de la micro-composición de los distintos carbonatos.

Debido a estos resultados, en los experimentos llevados a cabo posteriormente, se usó CaCO_3 con un diámetro de partícula de **20,31 μm** y en una concentración de **35 g/L**, ya que han proporcionado mayores producciones de ácido fumárico y evitan los problemas de solidificación.

Componentes minoritarios del medio:

Con la idea de mejorar aún más la producción de ácido fumárico a través de modificaciones y simplificaciones en el medio de cultivo, se ha estudiado la presencia de dos componentes del medio C: ácido tartárico y *Corn Steep Liquor* (CSL)⁶⁹. Ambos compuestos se encuentran en concentraciones muy bajas en la composición del medio. Además, no parece que tengan una gran influencia sobre el proceso^{95,96}, fueron incluidos en la formulación del medio C por parte de Ling y Ng en 1989⁶⁹.

El posible efecto que debería tener el ácido tartárico sería como tampón para controlar el pH del medio, sin embargo, esta función ya la cumple sobradamente el CaCO_3 , incluso se ha demostrado que la concentración original de carbonato puede ser reducida, por lo que el ácido tartárico no influiría en el pH del proceso.

Por otro lado, la eliminación de este ácido podría ser beneficiosa para el proceso, ya que es un agente precipitante⁹⁶, y el ácido fumárico tiene una solubilidad muy baja, precipitando fácilmente y causando los problemas de solidificación ya mencionados.

Respecto a las fuentes de nitrógeno, está ampliamente demostrado que el número y la naturaleza de estas influye en gran medida sobre la morfología del hongo, lo que finalmente afecta al perfil metabólico y la producción⁸⁴. Por tanto, la eliminación del CSL de la formulación del medio podría tener efectos negativos sobre la morfología. Sin embargo, la concentración de este es tan baja que apenas se esperaba encontrar efecto alguno. Además, la morfología del hongo se desarrolla en la fase de inóculo.

Por lo tanto, la eliminación de ambos compuestos, *a priori*, no debería suponer un inconveniente para el proceso, haciendo la formulación del medio más sencilla.

Curiosamente, la **eliminación del ácido tartárico y del CSL** llevó a un incremento de la concentración de ácido fumárico (de 33,92 a 56,78 g/L), reduciendo la concentración final obtenida de ácido málico (a 7,82 desde los 26,45 g/L iniciales) (Figura 4 en Anexo III). De esta forma se pasó de tener un proceso de coproducción a uno de producción de ácido fumárico, teniendo cierta producción de ácido málico en calidad de subproducto. Este aumento de la selectividad también afectó a otros ácidos orgánicos, como el succínico, que dejó de ser detectado. Este efecto debe estar relacionado con un aumento de la actividad de la enzima fumarasa, responsable de la transformación del malato en fumarato. El aumento de la citada actividad parece estar relacionado con las condiciones limitantes de nitrógeno en muchas especies de hongos y levaduras; como se ha comentado anteriormente y se ha discutido de forma extensa en bibliografía^{4,84}. Por lo tanto, el siguiente paso en el estudio se encaminó a la obtención de estas condiciones, con el fin de aumentar la producción.

Sulfato de amonio:

Se estudió la influencia de la concentración de la fuente de nitrógeno, empleando diferentes niveles de concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para encontrar una mejor producción de ácido fumárico. Se observó que concentraciones de sulfato de amonio inferiores a 1,2 g/L alteran la morfología, pasando de *pellet* a *clump*. Además, se producía un cambio en el perfil metabólico y productivo, obteniendo concentraciones finales de ácido fumárico inferiores a 10 g/L. Sin embargo, se detectó como, a medida que se reducía la concentración de amonio (desde los 1,8 g/L del medio de referencia) y se tenían condiciones más restrictivas de nitrógeno, la concentración final de ácido fumárico aumentaba (Figura 5 en Anexo III).

Por lo tanto, la concentración seleccionada para llevar a cabo el proceso fue de **1,2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /L**, teniendo condiciones limitantes de nitrógeno, sin llegar al límite de pérdida de la morfología.

Una vez que se realizaron todos estos cambios en el medio de cultivo, se obtuvo un aumento en el rendimiento del proceso: desde los 32 g/L obtenidos en los primeros experimentos de producción, con un rendimiento de 0,26 gÁcido fumárico/gGlucosa consumida, hasta los **60,42 g/L** obtenidos en los experimentos en condiciones limitantes de nitrógeno, siendo el rendimiento final de **0,46 gÁcido fumárico/gGlucosa consumida**. Por tanto, se obtuvo un aumento del **177%** en el rendimiento del proceso.

Tras estos estudios sobre la etapa de inóculo y la mejora del medio de producción, se realizó un estudio cinético del proceso, con el fin de conocer el

comportamiento del hongo y ser capaces de entender mejor como se lleva a cabo este proceso.

4.1.3. Estudios para la modelización cinética del proceso

Antes de llevar a cabo la modelización cinética del proceso, se realizó un seguimiento de las distintas especies existentes en el medio de cultivo, a raíz de este seguimiento se detectaron ciertos problemas que debían ser solventados, a la vez que se observaron las particularidades propias del proceso, a raíz de las cuales, proponer el modelo cinético adecuado.

Para poder realizar el estudio cinético del proceso, se llevó a cabo por triplicado la fermentación en las condiciones de operación seleccionadas a lo largo de la presente sección. El primer problema detectado, fue la determinación experimental de la concentración de biomasa. En la Figura 4.5 se muestran a modo de ejemplo (ya que la tendencia se repite en los diferentes experimentos) unos resultados experimentales de determinación del consumo de la fuente de nitrógeno (limitante del crecimiento) y de los sólidos cuantificados por peso seco que, en caso de ser reconocidos como la biomasa, mostraría un crecimiento de tipo diáuxico, que no parece tener sentido sin fuente de nitrógeno en el medio de cultivo a partir de las 70 horas.

En primer lugar, se comprobó la existencia de lisis celular, por medio de medida de péptidos y proteína soluble con el método de Bradford, no detectándose ninguna cantidad significativa, indicando la ausencia de lisis celular. Esto indica que el nitrógeno es asimilado por la biomasa y se integra en ella, permaneciendo en el interior del micelio y siendo reciclado por diversas vías metabólicas y transporte intracelular, en el contexto de la fase estacionaria, aparentemente.

Continuando con el análisis de los sólidos recolectados, se buscó la posible acumulación de cristales de fumarato en la superficie del micelio, a través del análisis SEM-EDS. Se obtuvieron imágenes de alta definición de las hifas a lo largo del proceso (Figura 4.6). Observando y comparando las Figuras 4.6 a y b, puede observarse como se depositan cristales de fumarato sobre la superficie de las hifas.

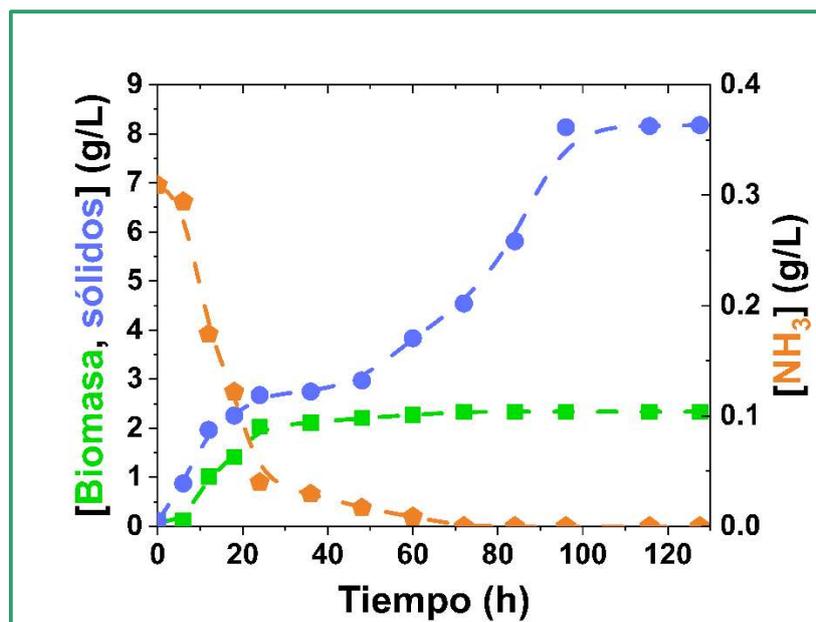


Figura 4. 5: Crecimiento de biomasa calculado en función del consumo de fuente de nitrógeno.

Para poder confirmar la acumulación de los cristales de fumarato, se llevó a cabo un microanálisis elemental de los sólidos. Se observó que los contenidos en nitrógeno y azufre de los sólidos recolectados decrece a medida que el proceso avanza, ambas composiciones decrecen paralelamente (Figura 4.7), indicando que la cantidad de proteína que compone estos sólidos es cada vez menor. Por su parte, el contenido en C, H y O si aumenta, lo que señala hacia la posible acumulación de ácido fumárico. Con los resultados del microanálisis elemental se determinó la formula molecular media de la biomasa: $\text{CH}_{1,80}\text{O}_{0,68}\text{N}_{0,22}$.

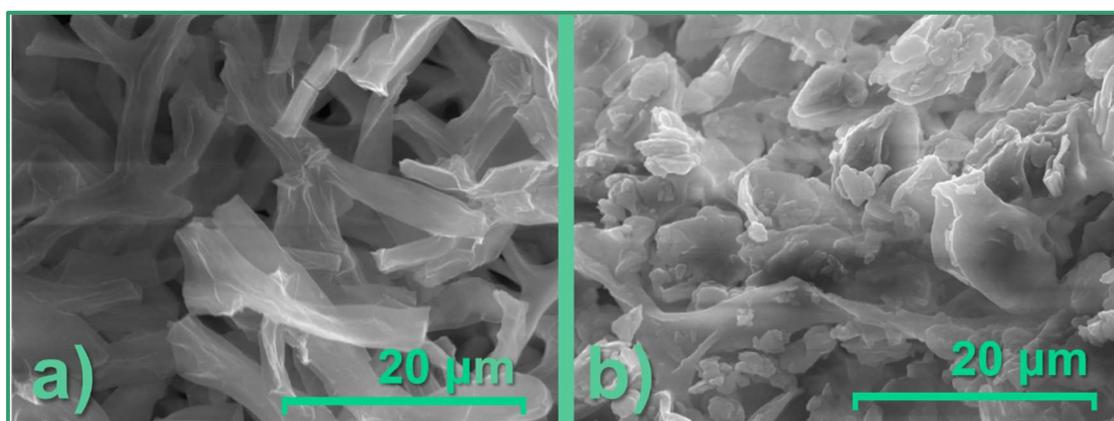


Figura 4. 6: Fotografías de microscopía SEM de la superficie micelial al inicio (a) y final (b) del proceso. Se aprecian depósitos de ácido fumárico en la superficie a tiempo final.

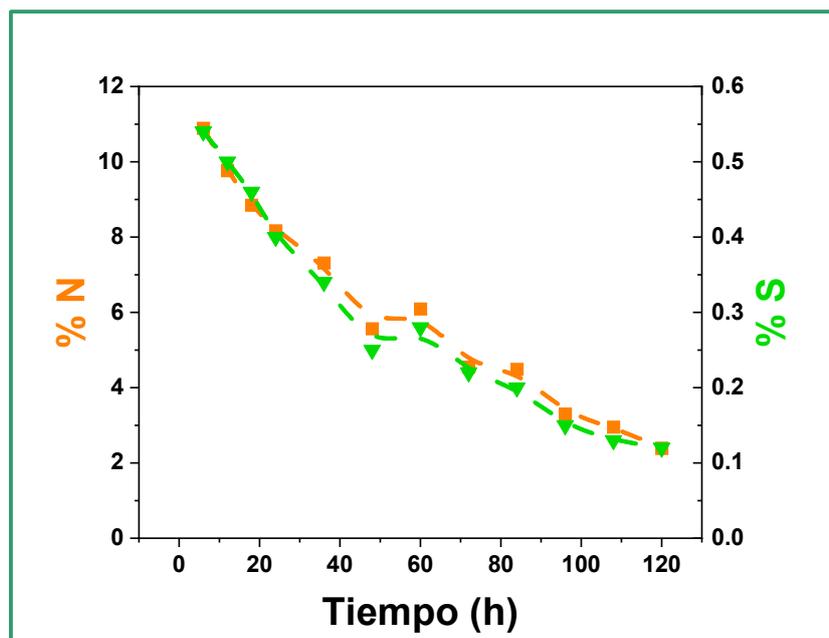


Figura 4. 7: Evolución del contenido en nitrógeno y azufre de los sólidos recogidos por peso seco.

Ante esta situación, la cantidad de biomasa en el proceso no podía ser determinada por peso seco. Se desarrolló un método de cuantificación indirecto, a través de la cantidad de fuente nitrógeno consumida, mediante cálculos estequiométricos.

Por otra parte, se apreció como la evolución de la glucosa es la típica correspondiente a este tipo de procesos, aunque no se consume completamente, su concentración final es muy baja, residual. En lo referente a la aparición de los productos, **los ácidos málico y fumárico siguen una tendencia claramente no asociada al crecimiento celular** (Figura 6 en Anexo III).

A su vez, el etanol sigue un comportamiento particular. En las primeras 36 h de cultivo, es producido con una tendencia totalmente asociada a crecimiento, esta producción se ve interrumpida por la llegada del crecimiento a su fase estacionaria. Sin embargo, en este punto comienza a observarse un fenómeno de desaparición del etanol. Esta desaparición podría ser debida a evaporación, o bien, a su consumo por parte del microorganismo (tras su generación por el efecto *Crabtree* y ante las necesidades energéticas del microorganismo)¹⁰⁴. Este comportamiento ya ha sido previamente observado por otros autores^{91,104,105}. Para determinar el origen de este fenómeno, se llevó a cabo un experimento de evaporación de etanol, en las mismas condiciones de operación que la fermentación (Figura 10 en Anexo III). Se observó

cómo, teniendo concentraciones análogas en ambos experimentos (fermentación y evaporación), la velocidad de desaparición es prácticamente la misma, simplemente causada por evaporación.

Tras todas las observaciones y estudios llevados a cabo; agrupados y conocidos los fenómenos y comportamientos; se propuso un modelo cinético al que se ajustó el proceso. Los resultados de dicho ajuste son analizados en la sección 4.3, así mismo, están detallados en el Anexo III.

4.2. Adaptación y uso de hidrolizados

Una vez que se estudió el comportamiento del hongo con medios sintéticos, conocidas las particularidades y condiciones de operación en las que se consigue una buena producción de ácido fumárico. Se llevó a cabo un estudio de la hidrólisis enzimática y caracterización de los hidrolizados; así como un estudio de adaptación y viabilidad del hongo a estos hidrolizados, usando medios sintéticos como etapa adaptativa.

Finalmente se llevaron a cabo las fermentaciones de los distintos hidrolizados obtenidos, y con ello se realizó una selección del más adecuado para el proceso y posteriormente, un estudio de su fermentación.

Parte de los resultados plasmados en esta sección están recogidos en la publicación 4, los resultados concernientes a la hidrólisis de OPW y la fermentación de dicho hidrolizado, forman parte de los resultados no publicados de la presente Tesis Doctoral.

4.2.1. Hidrólisis enzimática

El siguiente paso en el estudio fue el uso de los residuos, tanto los OPW como el AP. Se les realizaron los pretratamientos y la hidrólisis a ambos, siguiendo los procedimientos descritos en los apartados 3.3.1 y 3.3.2.

En un principio, las condiciones de agitación se vieron dificultadas. Sin embargo, según trascurría el proceso, se redujo el peso molecular de los polímeros presentes en la biomasa por la acción hidrolítica de las enzimas, reduciendo la viscosidad del medio de reacción y favoreciendo la agitación. La pectinasa es la

enzima que más contribuye a esto, ya que degrada la pectina, que tiende a formar geles en presencia de agua.

Tras el proceso de hidrólisis, se llevó a cabo la adecuación y detoxificación de los hidrolizados, ejecutando los protocolos descritos en el apartado 3.3.3. Estas etapas de detoxificación son vitales para que el proceso fermentativo posterior pueda llevarse a cabo. Los compuestos presentes en los hidrolizados de frutas tienen un efecto inhibitorio sobre multitud de enzimas involucradas en el metabolismo fúngico y el crecimiento de los mismos^{41,42}. La etapa de detoxificación con carbón activo tiene como objetivo la eliminación, total o parcial, del contenido en compuestos fenólicos y antioxidantes. Por su parte, el tratamiento con la resina de intercambio iónico tiene como función eliminar el contenido de nitrógeno amónico.

Tras la obtención de los hidrolizados, se procedió a la caracterización de estos. En la Tabla 4.1 pueden verse los resultados de dichos análisis. Por medio del análisis por HPLC se ha determinado la concentración de los azúcares presentes. Puede verse como **ambos hidrolizados presentan una concentración de glucosa y fructosa suficiente** como para alcanzar producciones finales de ácido fumárico adecuadas. A parte de glucosa y fructosa se han detectado otros azúcares presentes en los hidrolizados, como celobiosa o arabinosa, pero en concentraciones muy inferiores.

Los análisis colorimétricos revelan la presencia de sustancias potencialmente tóxicas en los hidrolizados, como son los compuestos fenólicos o antioxidantes⁴¹. El proceso de detoxificación ha eliminado la presencia de estos compuestos, en torno al 43% en fenólicos y el 20% en la actividad antioxidante²⁹. Sin embargo, el contenido en fenólicos sigue siendo bastante significativo, haciendo que **se espere algún tipo de inhibición** a la hora de usar estos hidrolizados como medio de fermentación.

Por último, cabe destacar el análisis de nitrógeno. Como puede verse en la Tabla 4.1, el contenido en proteína soluble en el APH es inferior a la carga enzimática añadida para la hidrólisis (2,87 g/L), por lo que puede considerarse este contenido como residual.

Tabla 4. 1: Caracterización de los hidrolizados de naranja (OPWH) y manzana (APH).

Parámetro	OPWH	APH	Unidades
[Azúcares]	55,45	65,29	g/L
[Glucosa]	31,08	32,48	g/L
[Fructosa]	24,37	32,81	g/L
Compuestos fenólicos totales	177,33	336,32	mg _{eq.} ácido gálico/L
Actividad antioxidante	58,40	53,77	TEAC/L
[NH ₄ ⁺]	< 10 *	< 10 *	mg/L
[Proteína soluble]	–	0,42	g/L

*: Valor inferior al límite de detección

Por su parte el contenido en nitrógeno amoniacal en ambos hidrolizados se encuentra por debajo del límite de detección, pudiendo considerarse nulo, siendo indicativo de que el tratamiento con la resina de intercambio iónico ha sido efectivo. Al no haber contenido inicial de nitrógeno, los hidrolizados se complementan, como los medios sintéticos, con sulfato de amonio; de esta forma se podrán aplicar las condiciones limitantes de nitrógeno requeridas.

4.2.2. Adaptación a hidrolizados

Una vez que se conoció la composición de los hidrolizados, se estudió el comportamiento y producción del hongo con los distintos azúcares que los componen.

Como se detalla en el apartado anterior, los principales azúcares presentes en los OPWH y APH son glucosa y fructosa. La producción y crecimiento a partir de glucosa ya ha sido ampliamente estudiada en la sección 4.1., por lo que, en el presente apartado, se estudiará la posibilidad de producir ácido fumárico a partir de las mismas concentraciones que poseen los hidrolizados, tanto en medios constituidos solo por glucosa, como con mezclas de glucosa y fructosa.

En primer lugar, como continuación de la investigación, se llevó a cabo una fermentación con un medio con glucosa como única fuente de carbono, pero en una concentración de azúcar total semejante a los hidrolizados (60 g/L); la concentración

de fuente de nitrógeno fue modificada para tener una relación C:N exactamente igual a la desarrollada en los estudios de la sección 4.1.

Tras esta primera aproximación, se usó un medio de fermentación análogo a los hidrolizados, basado en una mezcla de glucosa y fructosa a 30 g/L de cada una, en este experimento se guardó igualmente la misma ratio C:N.

En ambos experimentos de adaptación se obtuvieron comportamientos y resultados muy parecidos a los obtenidos anteriormente, tales como el régimen de producción de los ácidos málico y fumárico no asociado a crecimiento.

La introducción de fructosa en el medio de cultivo supone ciertas novedades: En primer lugar, se observó que ambos azúcares no se consumen a la misma velocidad, la glucosa seguía una tendencia muy parecida a la observada en la experimentación realizada hasta el momento. Sin embargo, el consumo de fructosa se daba de forma más lenta, no llegando a ser totalmente consumida (Figura 2 en Anexo IV). Otra particularidad de la presencia de fructosa en el medio es que hace que la producción de ácido fumárico sea incluso superior a la obtenida únicamente con glucosa. Este comportamiento hace **conveniente el uso de mezclas de glucosa y fructosa** como fuente de carbono para el proceso.

A pesar de ello, el rendimiento en ácido fumárico se vio ligeramente reducido (Tabla 4.2) lo que indicaría cierto efecto negativo de la concentración de azúcares. Observando los valores de productividad específica del hongo, se aprecia como a pesar de tener un rendimiento inferior, el tiempo del proceso se ve reducido (Figuras 1 y 2 en Anexo IV), de manera que la producción de ácido fumárico se da más rápidamente y, por tanto, el hongo presenta mayor productividad a bajas concentraciones de azúcares.

Otra característica llamativa en estos experimentos a menores concentraciones de azúcares es que la concentración de etanol no disminuye una vez acaba su producción. En los estudios realizados en la sección 4.1, se hizo un experimento de evaporación, en el que se observó una tendencia muy parecida entre la evaporación del etanol y su desaparición en el medio de fermentación. Debido a que, en estos nuevos experimentos, las condiciones de operación son exactamente las mismas, esta observación sobre la evolución del etanol implica que, en los experimentos comentados anteriormente, el fenómeno que se estaba llevando a cabo era un consumo del mismo por parte del hongo. Este consumo lo convierte en una fuente alternativa de carbono para mantenimiento celular, mientras que su

generación en condiciones claramente aerobias y con una concentración elevada de fuente de carbono se debe al denominado **efecto Crabtree**¹⁰⁶. Este efecto se da en procesos llevados a cabo por ciertas especies de hongos y levaduras, consiste en la producción de etanol como reserva energética^{104,107}, con un doble propósito: En primer lugar, permite generar una reserva energética a usar en posibles situaciones adversas, a la vez que, al generar etanol, elimina a otros microorganismos incapaces de sobrevivir en su presencia, evitando de esta manera la posible competencia por los recursos disponibles¹⁰⁶.

Este efecto se da solamente bajo ciertos requisitos, siendo siempre uno fundamental una gran cantidad de fuente de carbono disponible¹⁰⁴. Una vez generado el etanol, este se consume solo en una situación de falta de energía en forma de ATP. Una concentración de etanol constante en el estado estacionario indicaría que esta carencia energética celular no se da.

Una vez comprobada la viabilidad de la producción de ácido fumárico en medios análogos a los hidrolizados de residuos de fruta, se ha procedido a estudiar el proceso de fermentación de los hidrolizados obtenidos en el laboratorio.

Tabla 4. 2: Comparativa de experimentos realizados con medios sintéticos

Experimento	Referencia (Sección 4.1.3)	Glucosa reducida	Medio análogo
[Azúcares] ₀ (g/L)	130	60	60
[Glucosa] ₀ (g/L)	130	60	30
[Fructosa] ₀ (g/L)	0	0	30
[NH ₄ ⁺] ₀ (g/L)	0,30	0,14	0,14
Ratio molar C:N	238	242	242
[Ácido fumárico] (g/L)	60,42	22,32	22,70
Rendimiento (g _{Ácido fumárico} /g _{Glucosa consumida})	0,46	0,37	0,38
Productividad específica (g _{Ácido fumárico} /(g _{Biomasa} ·h))	0,19	0,32	0,33

4.2.3. Fermentación de hidrolizados de residuos agroalimentarios

En el contexto del desarrollo de un proceso sostenible para la obtención de ácido fumárico, se debe de elegir la materia prima más conveniente para el proceso. Como se comenta en el capítulo 1, varias materias primas pueden adecuarse a un proceso y debe discernirse por medio de diversos criterios cual es la más conveniente.

Por esta razón se han llevado a cabo fermentaciones con los dos hidrolizados obtenidos (naranja y manzana). En función del comportamiento del hongo ante estos, se ha seleccionado el más indicado.

En la Figura 4.8 puede verse como el OPWH no es un sustrato apropiado para el proceso, ya que el rendimiento de producción obtenido en su fermentación es muy bajo, prácticamente nulo. Por el contrario, el APH, ofrece resultados cercanos a los obtenidos con los medios análogos en los experimentos de adaptación (apartado 4.2.1), un poco inferiores, pero aceptables, por lo que se seleccionó el **APH como sustrato a emplear en el proceso.**

Una vez que se hubo seleccionado el hidrolizado más conveniente para el proceso, se llevaron a cabo estudios de la fermentación de este. En un primer ensayo, se realizó la fermentación del APH en condiciones análogas a los experimentos llevados a cabo en el apartado 4.2.3 (Tabla 4.3). Lo primero que llamó la atención fue la **total pérdida de la morfología**, pasando de los *pellets* obtenidos hasta ahora a una morfología cada vez más compacta conforme avanzaba el proceso, más parecida al *clump* (Figura 3 en Anexo IV). Además de este cambio en la morfología, se observó un crecimiento celular mucho más lento.

Este cambio en la morfología del hongo responde a un cambio en el metabolismo, este se ve alterado. Esta perturbación debe de estar causada por el **efecto antifúngico** de los compuestos fenólicos y antioxidantes presentes en el APH^{40,41}, tal y como se ha comentado en el apartado 4.2.1, se ha demostrado que inhiben el crecimiento, demorándolo y reduciendo la producción. La concentración final de ácido fumárico se ve reducida, mientras que la de ácido málico aumenta, esto indica que el flujo de carbono hacia la ruta TCA reductiva se mantiene constante, sin embargo, los compuestos inhibitorios deben de estar causando alguna alteración en este ciclo que hace variar el perfil metabólico.

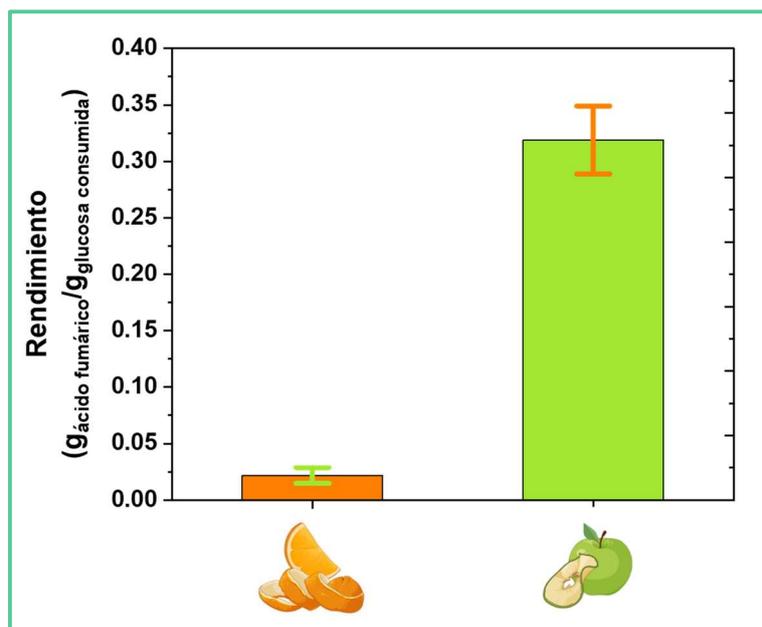


Figura 4. 8: Rendimientos de producción de ácido fumárico con los hidrolizados de los distintos residuos

Ambos ácidos siguen teniendo un régimen de producción no asociado a crecimiento, no obstante, se ha detectado un comportamiento anómalo: la producción de ambos ácidos es totalmente independiente de la concentración de azúcares, habiendo producción incluso cuando estos se han consumido completamente (Figura 4 en Anexo IV). Este comportamiento se ha atribuido a una **acumulación excesiva de algún metabolito intermedio** de la ruta TCA reductiva. Esta acumulación genera demora en la producción de los ácidos fumárico y málico, aun cuando ya no quedan azúcares, ya que la producción de sendos ácidos dependerá de la concentración de dicho intermedio.

Visto el comportamiento de ambos ácidos y conociendo el metabolismo productivo del hongo (Figura 1.11), parece razonable pensar que la inhibición está alterando, entre otras cosas, la actividad de la enzima fumarasa. Esta enzima es conocida por ser bastante sensible a cambios operacionales, pudiendo regularse la reversibilidad de la deshidratación de malato a fumarato, modificando condiciones de operación.

Dentro de las particularidades observadas en el uso de hidrolizados, destaca que se produce la desaparición de etanol, como se ha indicado previamente, esta desaparición es debida a la ausencia de fuentes de carbono a excepción del propio

etanol, por lo que este es transportado al interior celular y consumido para generar ATP mediante el TCA. En principio, se esperaría que no apareciera en el uso de hidrolizados, si únicamente fuera dependiente de la concentración de azúcares; sin embargo, ante la presencia de los compuestos inhibidores, este efecto se ha vuelto a manifestar, generando etanol como reserva energética y consumiéndolo cuando es requerido, al acabarse los azúcares, de manera que el mantenimiento celular se basa en este consumo.

Por último, se ha observado que en la fermentación de APH el consumo de azúcares, o al menos el de fructosa se ve alterado respecto al uso del medio análogo, ya que ambos azúcares se consumen a la vez y con una velocidad muy parecida. En medios sintéticos, la glucosa se consumía más rápido y la fructosa no llegaba a tener un consumo total, quedando siempre una cantidad remanente.

Al observar estos efectos inhibitorios, se propuso reducir las condiciones de estrés ejercido sobre el hongo, para al estar menos presionado, poder desarrollar mejor su metabolismo. Para ello, se modularon controladamente las condiciones limitantes de nitrógeno, observando que, un aumento de la concentración inicial de amonio provocaba un aumento de la concentración final de ácido fumárico (Figura 5 Anexo IV), por lo que se procedió al estudio del proceso en estas condiciones mejoradas.

Al aplicar estas condiciones menos restrictivas de nitrógeno, se observó como el rendimiento de ácido fumárico se veía incrementado, de 0,23 a 0,32 $\frac{\text{gÁcido fumárico}}{\text{gGlucosa consumida}}$ (Figura 6 en Anexo IV). Sin embargo, al observar la productividad específica se vio como es ligeramente menor (pasando de 0,17 a 0,14 $\frac{\text{gÁcido fumárico}}{(\text{gBiomasa} \cdot \text{h})}$). Por ello se dedujo que el aumento de la concentración final de ácido fumárico no era debido a una reducción en el estrés, si no que estaba relacionado con la concentración de biomasa; una mayor cantidad de fuente de nitrógeno en el medio lleva a una concentración mayor de biomasa, que, a pesar de ser menos productiva, es capaz de alcanzar un rendimiento en ácido fumárico mayor.

Respecto al ácido málico, su concentración se vio reducida, en pro del aumento de la concentración de ácido fumárico.

Al tener una mayor producción final de ácido fumárico, se determinó que estas condiciones de operación son más convenientes para el proceso.

4.3. Modelización cinética del proceso en matraz Erlenmeyer

Es destacable que, en la bibliografía sobre producción de ácido fumárico, no se encuentra ningún modelo cinético que trate de describir mediante ecuaciones las observaciones experimentales. Por ello, uno de los principales objetivos de esta Tesis Doctoral, como ya se ha apuntado, es la modelización cinética del proceso. Debido a la falta de información, en este trabajo se comenzó a modelizar desde el primer momento para ir construyendo, paso a paso, un modelo capaz de describir razonablemente el proceso.

En esta sección se recogen las distintas modelizaciones cinéticas llevadas a cabo en los experimentos en matraz Erlenmeyer. Los resultados analizados se encuentran detallados en las secciones correspondientes de las publicaciones 3 y 4. Al haberse realizado las modelizaciones a lo largo de distintas etapas del doctorado, puede observarse como el modelo cinético propuesto ha ido evolucionando, añadiendo particularidades encontradas en el proceso y siendo cada vez más descriptivo.

4.3.1. Modelización en experimentos basados en glucosa

En primer lugar, tras realizar los estudios descritos en el apartado 4.1.2, se propuso un primer modelo no estructurado, no segregado como primera aproximación a la modelización del bioproceso, dicho modelo (descrito en las ecuaciones 5-10 del Anexo II) se basa en el crecimiento de biomasa descrito por la ecuación logística. A raíz de esta modelización, se comenzó a observar la limitación del crecimiento debida a algún factor del proceso, como podría ser la dependencia de alguno de los sustratos empleados, tal y como se confirma más adelante.

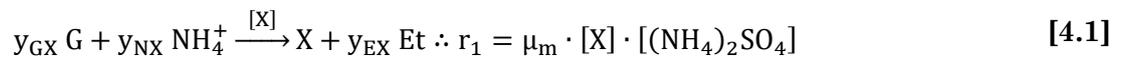
Además, explicaba la evolución de los distintos productos obtenidos de forma preliminar, pero observando ya ciertas tendencias que han sido confirmadas posteriormente, como el régimen no asociado a crecimiento del ácido fumárico.

Finalmente se observó como este primer modelo cinético explicaba de forma satisfactoria los fenómenos observados hasta ese momento; sin embargo, se requería una investigación más profunda del proceso y la observación más detallada de ciertos

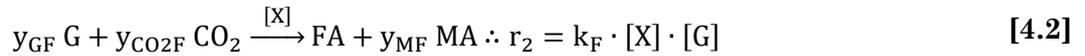
fenómenos; además de conseguir una mejora en el rendimiento productivo y la selectividad hacia ácido fumárico.

Posteriormente, tras todas las observaciones y estudios llevados a cabo en el apartado 4.1.3, una vez agrupados y conocidos todos los fenómenos y comportamientos presentes, se propuso un modelo cinético. Se trató de un modelo no estructurado, no segregado, basado en el esquema de reacción mostrado en las ecuaciones 4.1 y 4.2, donde se tienen dos reacciones diferentes:

Reacción 1: Crecimiento celular y producción de etanol asociada.



Reacción 2: Ruta TCA reductiva: Producción de ácidos fumárico y málico.



En la primera reacción (ecuación 4.1) se recogen los fenómenos de crecimiento microbiano, además de la producción de etanol, en régimen asociado a crecimiento. La reacción se describe por la ecuación de M'Kendrick y Pai, modificada para tener el amonio como sustrato limitante. A partir de esta ecuación se definen la velocidad de producción de etanol y las velocidades de consumo de glucosa y sulfato de amonio, por medio de rendimientos (ecuaciones 3, 4, 5 y 8 en Anexo III).

Por su parte, en la ecuación 4.2, se representa la ruta TCA reductiva (descrita en el apartado 1.5.1), esta ruta describe las producciones de fumarato y malato independientes al crecimiento del hongo y de su metabolismo general, tal y como su perfil productivo sugiere. Se ha considerado el ácido fumárico como el principal producto de esta reacción y el ácido málico ligado a ella por medio de un rendimiento, Y_{MF} (ecuación 7 en Anexo III). Siendo producidos de manera parecida por la misma ruta metabólica.

Es interesante observar como el etanol se produce a concentraciones altas (iniciales) de glucosa (efecto *Crabtree*), detiene su producción al acabar el crecimiento y comienza a desaparecer por un fenómeno atribuido inicialmente a evaporación. Este fenómeno se ha descrito basándose en la Ley de Henry de presiones parciales, dependiendo únicamente de la concentración de etanol presente en el medio de fermentación, con una constante cinética, k_E (ecuación 8 en Anexo III)

Tras la propuesta de este modelo cinético, se llevó a cabo su ajuste a los datos experimentales. Se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 4.9, así como el valor de cada uno de los parámetros cinéticos descritos en el modelo (Tabla 4 en Anexo III). Puede verse como el modelo propuesto parece capaz de predecir y simular el proceso fermentativo. Atendiendo a los parámetros de ajuste, el modelo es estadísticamente significativo, con buenos valores de los parámetros (Tabla 5 en Anexo III).

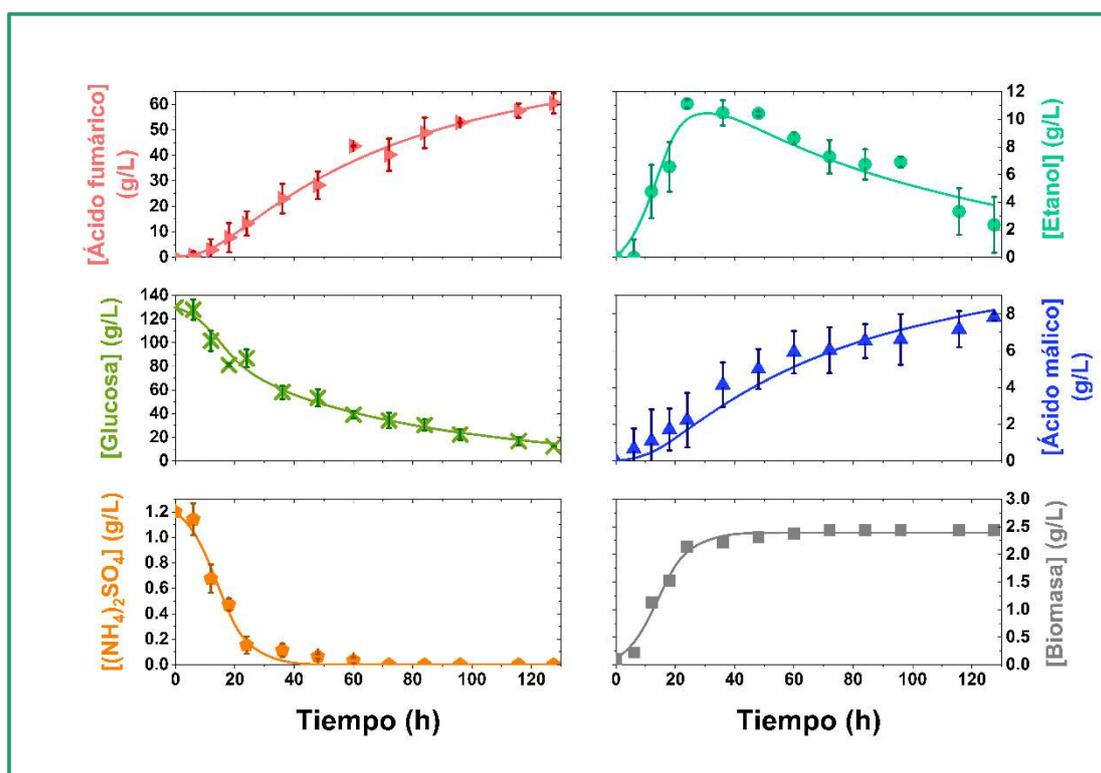
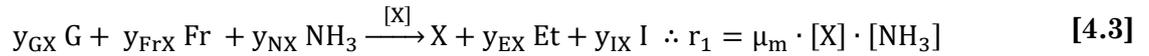


Figura 4. 9: Evolución de los diferentes componentes en el proceso de fermentación (puntos) y reproducción mediante el modelo cinético propuesto (líneas).

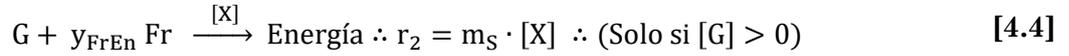
4.3.2. Modelización en experimentos con fructosa y APH

Para llevar a cabo la modelización cinética de los estudios realizados la sección 4.2, se planteó un nuevo modelo, basado en el empleado en el apartado anterior, pero con ciertas modificaciones, ya que, al observarse nuevos comportamientos con el uso de hidrolizados, el modelo debió adaptarse para incluirlos. Este nuevo modelo modificado se desarrolla a partir de un nuevo esquema de reacción:

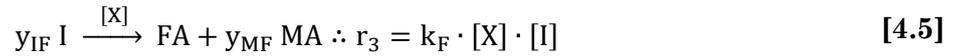
Reacción 1: Crecimiento celular y producciones asociadas.



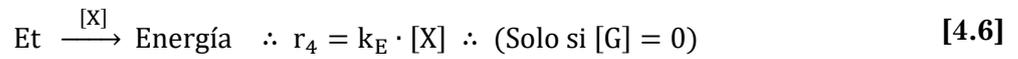
Reacción 2: Mantenimiento celular.



Reacción 3: Ruta TCA reductiva.



Reacción 4: Consumo del etanol generado por el efecto *Crabtree*.



Este modelo, al igual que el anterior, se basa en el crecimiento de biomasa con la ecuación de M'Kendrick y Pai modificada. Las modificaciones introducidas en este modelo respecto del anterior son:

- ❖ La inclusión de la reacción 2 (ecuación 4.4), que describe el mantenimiento celular, consumiendo azúcares para la respiración. Solo tiene lugar mientras hay glucosa en el medio.
- ❖ Se define un metabolito intermedio, producido en régimen asociado a crecimiento (ecuación 4.3), a partir del cual se producen los ácidos málico y fumárico (ecuación 4.5).
- ❖ Se introduce el consumo de etanol para mantenimiento celular, por medio de la reacción 4 (ecuación 4.6), en la que se consume el etanol generado por efecto *Crabtree* como reserva energética. Este proceso ocurre, en este caso, en ausencia o baja concentración de azúcares.

Observando los valores de los diversos parámetros cinéticos en el modelo (Tabla 3 en Anexo IV), así como el de los parámetros estadísticos (Tabla 4 en Anexo IV), se puede concluir que el modelo explica, simula y predice satisfactoriamente el proceso y el comportamiento del hongo en las situaciones estudiadas. Por otra parte, las diferencias encontradas entre experimentos pueden ser explicadas atendiendo a los valores de las constantes cinéticas.

Es de destacar la gran similitud en todos los parámetros cinéticos entre los experimentos llevados a cabo con medio sintético, teniendo resultados prácticamente iguales, a pesar de las diferencias entre ellos por la introducción de la fructosa en el proceso. Destaca el comportamiento de los rendimientos macroscópicos y constantes cinéticas relacionadas con el consumo de azúcares; como su combinación entre los distintos azúcares en el experimento con el medio análogo dan resultados muy parecidos a los del experimento que usa solo glucosa como fuente de carbono, indicando que los flujos metabólicos de carbono están repartidos de manera idéntica en ambos experimentos.

En la Figura 4.10, se representa a modo de ejemplo, el modelo cinético ajustado al experimento final, con las condiciones más favorables para la producción. Observando estos resultados, se hace patente la existencia de la inhibición en el uso del APH como medio de fermentación. El valor de μ_m se ve reducido en estos experimentos, si bien es verdad que la reducción en el experimento final es debida sobre todo a la modificación de la concentración de fuente de nitrógeno.

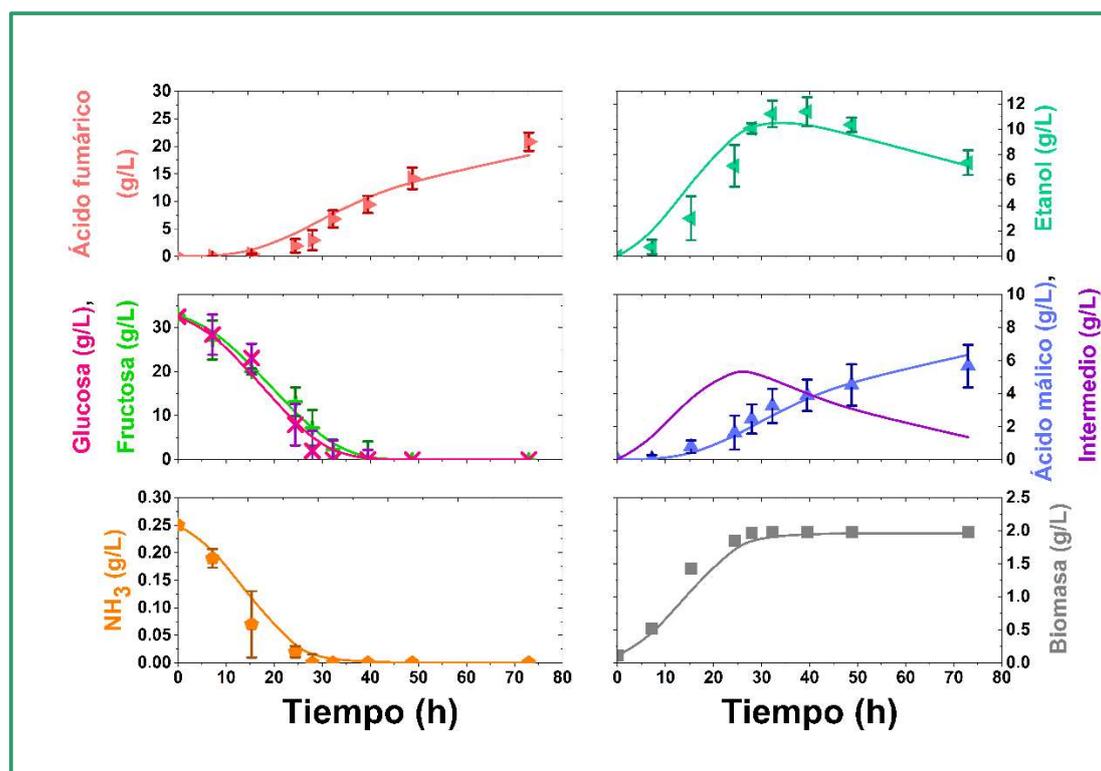


Figura 4. 10: Reproducción de los datos experimentales del realizado con APH obtenida mediante el ajuste del modelo cinético.

Por último, debe destacarse el metabolito intermedio, que tiene un comportamiento como el que se esperaba de él *a priori*, con un aumento de su concentración mientras se produce el crecimiento celular, para posteriormente comenzar a decrecer, debido a su consumo para transformarse en los productos finales. La acumulación de este compuesto parece ser mucho mayor cuando se usa el APH. Considerando este comportamiento y las evoluciones de los parámetros k_F e Y_{MF} , todo parece indicar que la inhibición provocada por los compuestos presentes en el APH actúa directamente sobre la enzima fumarasa. Este hecho podría apuntar a que el metabolito intermedio introducido en el esquema de reacción del modelo fuera malato intracelular

4.4. Estudios en biorreactor

Siguiendo la línea del desarrollo del proceso, la siguiente etapa es el escalado a mayores volúmenes y dispositivos más parecidos a los empleados en la industria. Este cambio está motivado por dos razones: la primera es para estudiar la implantación, en etapas muy tempranas, del proceso a nivel industrial; por otro lado, la posibilidad de generar un conocimiento más profundo del proceso, controlando variables que hasta ahora no podían medirse ni tenerse en cuenta, como la cantidad de oxígeno disuelta en el medio.

Es bastante llamativo que el proceso estudiado, a pesar de ser aerobio, no cuente con ningún estudio ni información concerniente al consumo de oxígeno por parte del hongo y como esto afecta a la producción. Por esta razón se ha empleado la implantación del proceso en biorreactor para realizar dicho estudio, por medio de un seguimiento del consumo de oxígeno a lo largo del proceso. Este estudio se llevó a cabo en un reactor de pequeño volumen (0,5 L, utilizando un volumen de trabajo de 200 mL), como se especifica en la sección 3.2.1 del capítulo de Materiales y Métodos de la presente Memoria.

Para abordar este estudio, en primer lugar, se realizó la determinación de una correlación empírica para relacionar la transferencia de oxígeno con la agitación y el caudal de aire empleados. Posteriormente, se realizaron experimentos de producción de ácido fumárico en el biorreactor a diferentes valores de $k_L a$ y, a partir de estos resultados, se llevó a cabo la determinación del consumo de oxígeno y se observó su influencia en el proceso.

Los resultados mostrados y discutidos en esta sección conforman una de las partes no publicadas de la Tesis Doctoral, si bien, se espera su próxima publicación, ya que los correspondientes artículos se encuentran en proceso de escritura.

4.4.1. Correlación empírica de $k_L \cdot a$ con las variables

Para la determinación de la citada correlación empírica, se empleó el método dinámico de desorción de oxígeno con nitrógeno (apartado 3.3.6)^{108,109}. En la Tabla 4.3 se recogen los valores del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L \cdot a$), obtenidos experimentalmente, en función de las variables estudiadas: agitación (entre 200 y 800 r.p.m.) y caudal de aire (entre 0,5 y 2 vvm).

Tabla 4. 3: Valores de $k_L \cdot a$ obtenidos en los diferentes experimentos realizados variando la agitación y el caudal de aire.

	$k_L \cdot a$ (s ⁻¹)					
	200 r.p.m.	300 r.p.m.	400 r.p.m.	500 r.p.m.	600 r.p.m.	800 r.p.m.
0,50 vvm	–	0,0042	0,0061	0,0079	0,0095	0,0131
0,75 vvm	0,0034	0,0044	0,0065	0,0094	0,013	0,0133
1,00 vvm	0,0043	0,0052	0,0075	0,0107	0,0132	0,0150
2,00 vvm	0,0056	0,0067	0,0076	0,0117	0,0150	0,0200

Con los datos experimentales obtenidos se planteó obtener una correlación empírica según la ecuación 4.7, en la que se emplea como variable la velocidad superficial de paso del gas (V_s , en m/s, teniendo en cuenta que el diámetro interno del biorreactor es de 7,1 cm) y la agitación (N, en r.p.s.)¹¹⁰.

$$k_L \cdot a = C \cdot N^\alpha \cdot V_s^\beta \quad [4.7]$$

Se comprobó que los valores experimentales obtenidos, respondían a la ecuación 4.7 mediante la linealidad del logaritmo de los valores de $k_L \cdot a$ frente a los logaritmos de cada una de las variables estudiadas (manteniendo constante la otra variable), como se expone en las Figuras 4.13 a (caudal de aire constante) y b (agitación constante).

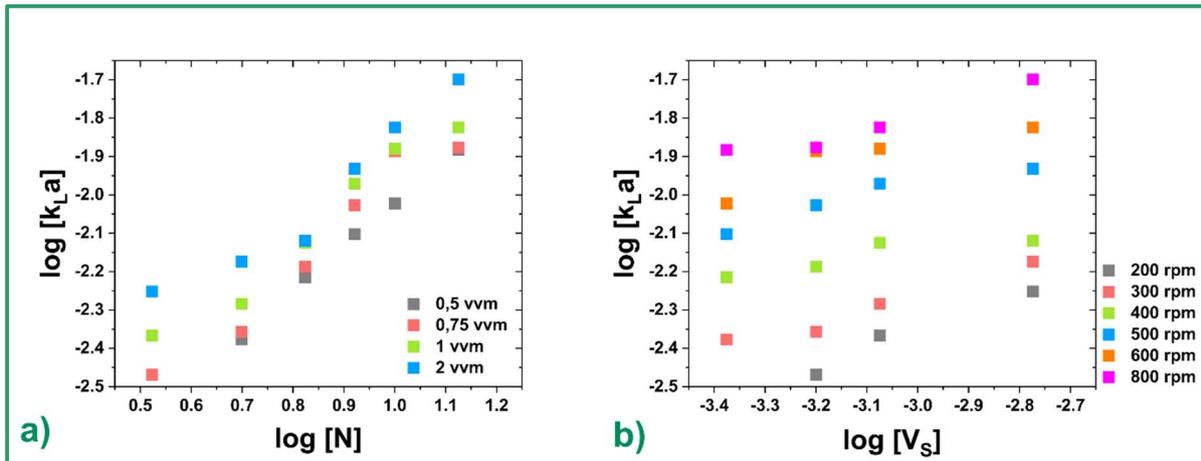


Figura 4. 11: Influencia del caudal de aire (a) y agitación (b) sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.

Para la determinación de los parámetros de la ecuación 4.7, se llevó a cabo un ajuste lineal múltiple de todos los datos experimentales, aplicando logaritmos para linealizar la correlación (ecuación 4.8). En la Tabla 4.4 se recogen los valores de los parámetros obtenidos del ajuste, así como los parámetros estadísticos del mismo. Obteniendo finalmente la correlación, expresada en la ecuación 4.9.

$$\log[k_L \cdot a] = \log[C] + \alpha \cdot \log[N] + \beta \cdot \log[V_S] \tag{4.8}$$

Tabla 4. 4: Parámetros de la ecuación 4.8 ajustada a los datos experimentales (Tabla 4.3).

Ln C	α	β	F Fisher	F ₉₅	SSR
-2,24 ± 0,18	1,17 ± 0,07	0,28 ± 0,06	128,1	8,81	0,025

$$k_L \cdot a = 5,74 \cdot 10^{-3} \cdot N^{1,17} \cdot V_S^{0,28} \tag{4.9}$$

Por último, se comprobó la reproducción de los datos experimentales frente a los obtenidos por la ecuación 4.9 (Figura 4.12) observando una buena correlación y reproducibilidad de los resultados.

Una vez determinada la correlación empírica, se planteó la experimentación en biorreactor para el estudio de la influencia de la transferencia de oxígeno (o su consumo) en el proceso de producción de ácido fumárico con *R. arrhizus*, que se expone en el siguiente apartado.

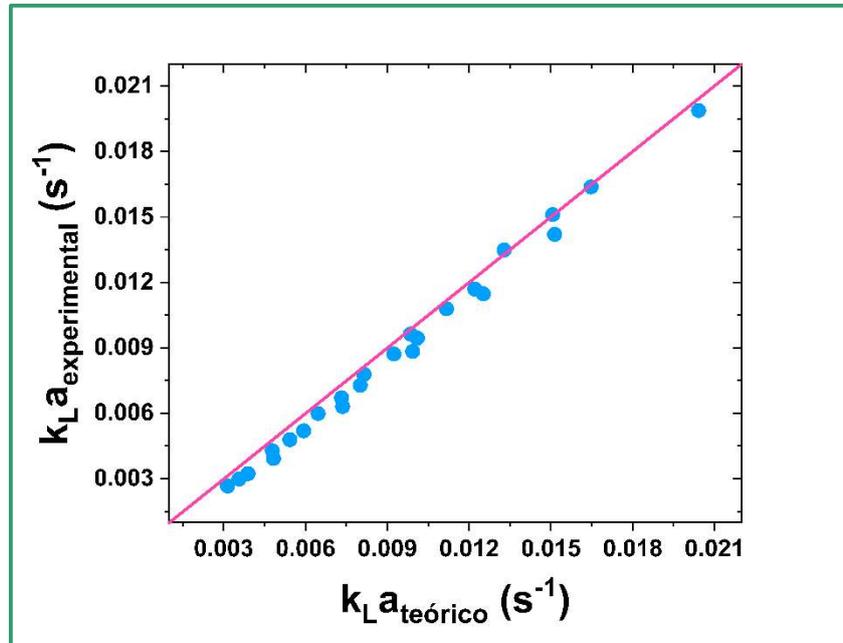


Figura 4. 12: Reproducción de los datos experimentales de $k_{L}a$ por la ecuación 4.9.

4.4.2. Producción de ácido fumárico en biorreactor

Conocida la transferencia de oxígeno en función de las condiciones de operación, se estudió la influencia de esta sobre la producción de ácido fumárico. En la Tabla 4.5 se muestran los experimentos llevados a cabo, con sus condiciones de operación y el valor de $k_{L}a$ correspondiente, calculado con la correlación obtenida (ecuación 4.9). Todos estos experimentos se han llevado a cabo con el mismo medio de cultivo, compuesto de 50 g/L de glucosa y 0,08 g/L de amonio, teniendo condiciones limitantes de nitrógeno; al ser el sustrato limitante, controla el crecimiento (al igual que en los estudios anteriores), ocasionando una concentración final de biomasa prácticamente igual en todos los experimentos ($\approx 0,7 \text{ g}_{\text{Biomasa}}/\text{L}$).

Tabla 4. 5: Experimentos de producción de ácido fumárico realizados en biorreactor.

Experimento	Agitación (r.p.m.)	Q_{aire} (vvm)	$k_L \cdot a$ (s^{-1})
1	400	0	0,0000
2	300	1	0,0052
3	400	0,5	0,0060
4	600	2	0,0142
5	700	1,5	0,0157
6	800	2	0,0199

El primer efecto que se observó en la implantación del proceso en el biorreactor fue la pérdida del control sobre la morfología, la biomasa se adhería sobre las distintas superficies y artefactos existentes en el interior del biorreactor, creciendo de manera apelmazada y aglutinando distintos micelios que se iban agregando por colisión, desarrollando una morfología tipo *clump* (Figura 4.13).

Este cambio en la morfología podría suponer ciertas desventajas en el proceso respecto a la morfología en pellet, que se tenía en las fermentaciones en matraz Erlenmeyer, obteniendo una menor producción de ácido fumárico en el proceso. No obstante, el uso del biorreactor como sistema de fermentación, puede suponer una oportunidad de mejora del proceso, o al menos de generación de mayor conocimiento sobre él, al controlar y estudiar nuevas variables, no disponibles hasta ahora.



Figura 4. 13: Morfología obtenida en los experimentos en biorreactor.

A pesar de este cambio de morfología, el crecimiento del hongo siguió presentando el mismo comportamiento observado hasta el momento, ligado al consumo de fuente de nitrógeno. En la Figura 4.14 se observan, respectivamente, las evoluciones de la biomasa (a) y del ácido fumárico (b) a lo largo del proceso. En la Figura 4.14a puede observarse como el crecimiento del hongo no se ve afectado por las condiciones de aireación, ya que los resultados finales obtenidos en todos los experimentos son muy parecidos, con tendencias similares en la evolución de la biomasa, debido a que el crecimiento está controlado por el nutriente limitante fijado en el proceso, la fuente de nitrógeno.

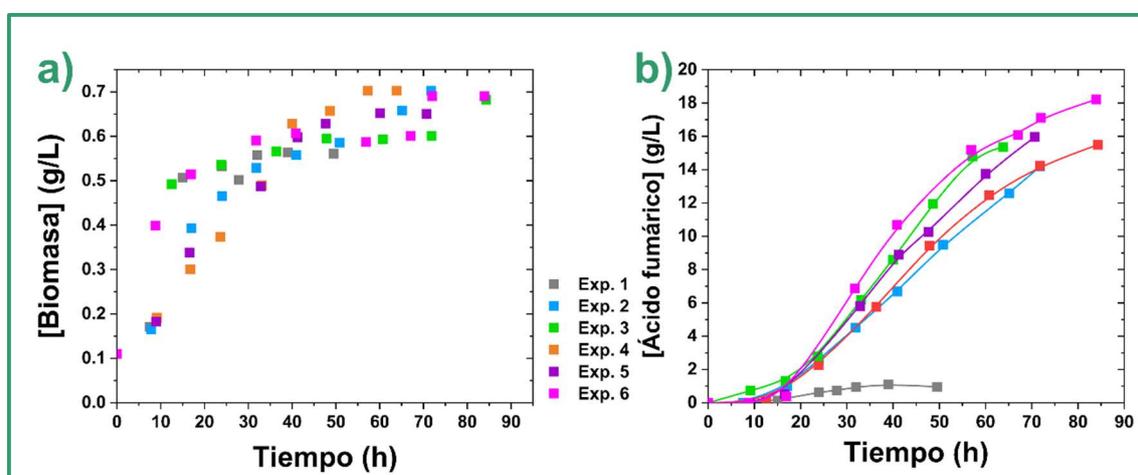


Figura 4. 14: Resultados experimentales de la evolución de biomasa (a) y ácido fumárico (b) en los diferentes experimentos realizados en biorreactor.

Sin embargo, la disponibilidad de oxígeno por parte del microorganismo afecta en gran medida a la producción de ácido fumárico, como puede observarse en la Figura 4.14b. Destaca la necesidad de aporte de oxígeno para tener una producción significativa, ya que la concentración de ácido fumárico obtenida en el experimento 1 es ínfima. Además, queda patente que cuanto mayor es el coeficiente de transferencia de oxígeno, mayor es la velocidad de producción de ácido fumárico.

A la vista de estos resultados, se han calculado distintos parámetros productivos de la fermentación, con el fin de encontrar tendencias y efectos que provoca la disponibilidad de oxígeno (distintos valores de $kl \cdot a$) sobre el proceso. En la Tabla 4.6 se recogen los valores de dichos parámetros en cada experimento, cabe destacar que la transferencia de oxígeno no presenta una influencia destacada sobre la concentración obtenida de ácido fumárico, por lo que tampoco se observa influencia

sobre el rendimiento. No obstante, en el experimento 6, donde existe mayor transferencia de oxígeno, se consigue una mayor producción y rendimiento. Tampoco se detecta una gran influencia en los valores obtenidos de productividad.

Sin embargo, en lo que respecta a la selectividad (considerada como la concentración de ácido fumárico alcanzada, respecto a la concentración total de productos obtenidos), queda patente que una mayor disponibilidad de oxígeno por parte de las células provoca una mejora en la selectividad hacia ácido fumárico: De un valor del 65,2% con un $k_L \cdot a$ de $0,0052 \text{ s}^{-1}$, se llega a alcanzar un 79,4% con un valor del coeficiente de transferencia de oxígeno de $0,0199 \text{ s}^{-1}$. Cabe destacar que, en matraz Erlenmeyer, en un experimento similar (1^{er} experimento del apartado 4.2.2) con un medio análogo con 60 g/L de glucosa y 0,14 g/L de amonio a 200 r.p.m., se obtuvo una selectividad del 64%, por lo que queda confirmada la influencia de la transferencia de oxígeno en la selectividad hacia la producción de ácido fumárico.

Para tratar de explicar esta observación, se procedió a calcular la velocidad específica de consumo de oxígeno, mediante el siguiente procedimiento de cálculo^{103,111}: empleando los datos experimentales de oxígeno disuelto en el medio de fermentación, y considerando el valor de $k_L \cdot a$ obtenido en cada experimento (Tabla 4.6), se determinó la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR), según la ecuación 4.10^{108,110}.

$$\text{OTR} = k_L \cdot a \cdot ([\text{O}_2]^* - [\text{O}_2]) \quad [4.10]$$

$$\frac{d[\text{O}_2]}{dt} = \text{OTR} - \text{OUR} \quad [4.11]$$

Tabla 4. 6: Parámetros productivos de la fermentación en diferentes condiciones de transferencia de oxígeno.

Exp.	$k_L \cdot a \text{ (s}^{-1}\text{)}$	[Ácido fumárico] (g/L)	Rendimiento (%)	Productividad (g/L.h)	Selectividad (%)
1	0,0000	1,11	2,22	0,028	30,0
2	0,0052	14,19	28,4	0,198	65,2
3	0,0060	15,49	31,0	0,184	70,0
4	0,0142	15,37	30,7	0,241	72,3
5	0,0157	15,96	31,9	0,226	73,7
6	0,0199	18,21	36,4	0,217	79,4

Tras esto, se procedió al cálculo de la velocidad de evolución del oxígeno, por medio de la derivación numérica de los valores de oxígeno disuelto obtenidos experimentalmente (los mismos que se utilizaron para el cálculo de la OTR). Con estos valores, por medio de la ecuación 4.11 se obtuvieron los valores de la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) a lo largo del proceso, expuestos en la Figura 4.15a¹⁰⁸. Los valores obtenidos para OTR y OUR son muy parecidos, esto es debido a que los valores de la velocidad de evolución del oxígeno (calculada por derivación numérica) son muy bajos, como es habitual en estos procesos^{103,111}, ya que esta evolución se produce lentamente. En la figura pueden distinguirse dos tendencias en los experimentos, relacionada con los niveles de los valores de $k_L \cdot a$: Por un lado, los experimentos 2 y 3, con unas condiciones más restrictivas de oxígeno, tienen un consumo menor. Por su parte, en los experimentos 4, 5 y 6 donde la transferencia de oxígeno se da en mayor magnitud, tienen un consumo más elevado.

Estos resultados indican que cuando se emplea un valor de $k_L \cdot a$ inferior a $0,01 \text{ s}^{-1}$, el consumo de oxígeno está limitado por su transporte, mientras que cuando se supera este valor, el microorganismo no presenta limitaciones para el consumo. Destaca, como se ha comentado anteriormente, que la mayor disponibilidad de oxígeno provoca que el flujo de carbono se dirija en mayor medida hacia la formación de ácido fumárico (Tabla 4.6).

Una vez determinados los valores de la OUR, se puede calcular la velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O_2}), según la ecuación 4.12, conociendo la concentración de biomasa a lo largo del tiempo. Como se ha señalado anteriormente, esta biomasa es cuantificada por estequiometría, a partir de los datos experimentales de la concentración de fuente de nitrógeno¹⁰⁸.

$$\text{OUR} = q_{O_2} \cdot [X] \quad [4.12]$$

En la Figura 4.15b se representan los valores de la citada velocidad específica de consumo a lo largo del tiempo en los diversos experimentos llevados a cabo. Como cabría esperar, en esta figura, de nuevo, se observan dos grupos de resultados equivalentes: aquellos con un coeficiente de transferencia de oxígeno menor de $0,01 \text{ s}^{-1}$ (experimentos 1 y 2), y aquellos con un valor superior (experimentos 3, 4 y 5).

Puede observarse como el valor de esta velocidad específica aumenta conforme se produce el crecimiento del microorganismo, y como llegada la fase estacionaria, pasa por su valor máximo y comienza a decrecer. Si bien este descenso

en el valor es más acusado en los experimentos con mayores valores de $k_L \cdot a$, siendo más suave a bajos niveles de transferencia de oxígeno.

Por otro lado, se buscó la determinación experimental de la OUR. Para ello se llevó a cabo el denominado método dinámico (descrito en la sección 3.3), en las condiciones del experimento 3. El aporte de aire al biorreactor fue interrumpido puntualmente y se midió la evolución de la concentración de oxígeno en diferentes tiempos de la fase de crecimiento del hongo (9,3; 17,5 y 27,1 h), correspondientes con la mitad y el final de la fase exponencial, así como con la fase estacionaria, respectivamente^{108,109}.

En la Figura 4.16 se recogen los datos experimentales obtenidos de evolución de oxígeno para la determinación de OUR. En primer lugar, es importante observar el lento consumo de oxígeno registrado por parte del hongo (el tiempo está en unidades de minutos). También es destacable que la tendencia de consumo del oxígeno no es lineal, lo que podría indicar el acoplamiento de otro posible fenómeno asociado al consumo, posiblemente la presencia de fenómenos difusionales en el interior de los *clumps*.

Además, es importante señalar que los valores de OUR obtenidos mediante este procedimiento experimental, son dos órdenes de magnitud inferiores a los calculados a partir de los datos experimentales de oxígeno disuelto, por medio del valor de $k_L \cdot a$. Debido al tiempo disponible para la finalización de esta Tesis Doctoral no se pudo profundizar en este aspecto, lo que queda pendiente para una futura publicación.

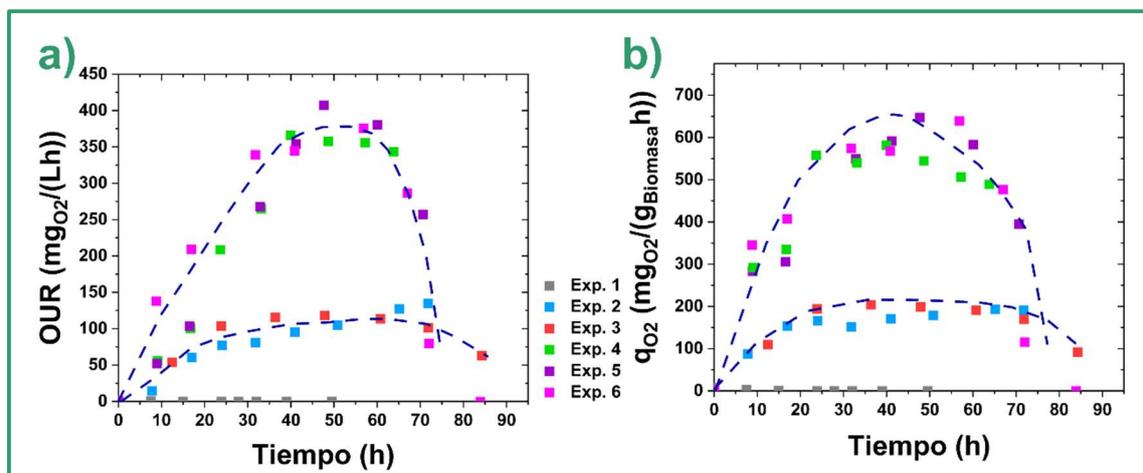


Figura 4. 15: Valores de la velocidad de consumo (a) y de la velocidad específica de consumo de oxígeno con el tiempo en los experimentos realizados en este estudio.

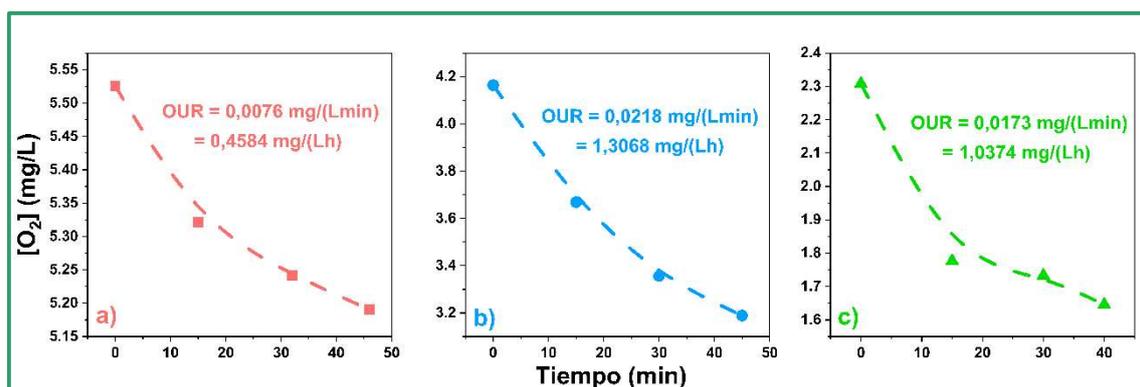


Figura 4. 16: Evolución del oxígeno disuelto en los experimentos realizados para la determinación experimental de OUR en las condiciones del experimento 3. a) 9,3 h; b) 17,9 h; c) 27,1 h.

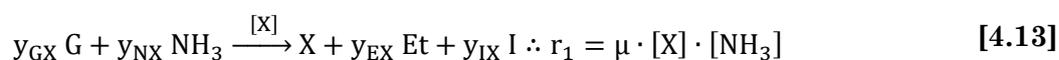
4.4.3. Modelización cinética en biorreactor.

De forma análoga a como se ha llevado a cabo en las diferentes publicaciones y secciones de la presente Tesis Doctoral, los experimentos realizados en el biorreactor se han modelizado cinéticamente. Para ello, se ha ajustado el modelo propuesto anteriormente, y aplicado a los experimentos realizados en matraz Erlenmeyer (recogido en las ecuaciones 5–16 del Anexo IV), a los datos experimentales de los ensayos enunciados en la Tabla 4.5.

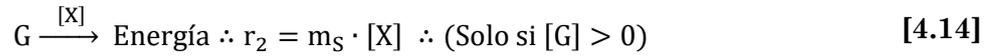
Una vez más, este modelo ha sido modificado para adaptarlo a las particularidades del presente estudio, se ha eliminado la presencia de fructosa (por no haberse utilizado como fuente de carbono). Por lo tanto, el modelo cinético empleado (en forma de esquema de reacción y ecuaciones cinéticas) se recoge en las ecuaciones 4.13–4.16. Este modelo ha sido ajustado a los experimentos del 2 al 6. El experimento 1 no ha sido modelizado porque presenta una clara limitación por la transferencia de oxígeno, lo que le confiere una fenomenología distinta al resto.

El modelo, por tanto, se basa en el siguiente esquema de reacción:

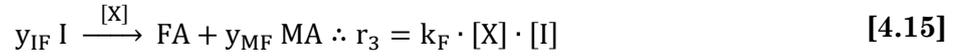
Reacción 1: Crecimiento celular y producciones asociadas.



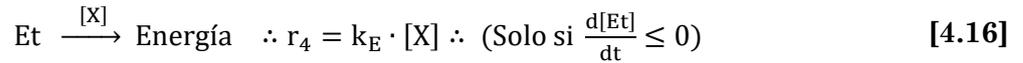
Reacción 2: Mantenimiento celular.



Reacción 3: Ruta TCA reductiva.



Reacción 4: Consumo del etanol generado por el efecto *Crabtree*.



En la Tabla 4.7 se recogen los valores de los parámetros estadísticos, que se han empleado a lo largo del presente trabajo, obtenidos en los ajustes al citado modelo, pudiéndose observar el buen ajuste conseguido para todos los experimentos. Asimismo, en las Tabla 4.8 y 4.9, se presentan los valores de los parámetros del modelo obtenidos por ajuste estadístico empleando el software Aspen Custom Modeller® v11. Asimismo, en las Figuras 4.18 a 4.22 se recoge la reproducción de los datos experimentales que se consigue empleando el modelo propuesto, pudiendo concluir que los resultados de predicción son muy buenos.

Tabla 4. 7: Parámetros estadísticos de ajuste de los experimentos modelizados.

Parámetro	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6
RMSE	0,12	0,11	0,09	0,10	0,07
F ₉₅	1,19·10 ⁵	7,78·10 ⁴	1,70·10 ⁵	9,13·10 ⁴	2,26·10 ⁵
%VE	85,98	98,04	98,30	98,78	99,25

A partir de los datos obtenidos de los diferentes parámetros del modelo cinético ajustado, se puede decir que, al igual que se ha observado en los parámetros productivos (Tabla 4.6) los valores de los parámetros cinéticos obtenidos no tienen una gran variabilidad. Como ya se comentó, el crecimiento de biomasa no tiene una tendencia definida por efecto de la cantidad de oxígeno disponible, como puede observarse en los valores de μ_m , que tienen valores parecidos en el mismo orden de magnitud, sin tener una tendencia clara. Este efecto de la velocidad de crecimiento

se ve reflejado en el valor de otros parámetros cinéticos que afectan a velocidades de producción relacionadas con la concentración de biomasa, como son los parámetros k_F o Y_{MF} , relacionados con las producciones de ácido fumárico y málico, se observa que al igual que los parámetros productivos, tienen valores similares, dentro de un intervalo de confianza. Además, el parámetro Y_{MF} está relacionado con la selectividad del proceso, con una cierta tendencia a disminuir al aumentar el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.

Tabla 4. 8: Parámetros cinéticos del modelo obtenidos por ajuste estadístico a los datos de los experimentos de la Tabla 4.6.

Exp.	μ_m $\left(\frac{L}{g_{NH_3} \cdot h}\right)$	k_F $\left(\frac{L \cdot g_{FA}}{g_X \cdot g_G \cdot h}\right)$	k_E $\left(\frac{g_{Et}}{g_X \cdot h}\right)$	ms $\left(\frac{g_G}{g_X \cdot h}\right)$
2	0,937 ± 0,049	0,080 ± 0,018	0,031 ± 0,007	1,104 ± 0,111
3	1,175 ± 0,053	0,063 ± 0,010	0,078 ± 0,019	0,700 ± 0,213
4	0,983 ± 0,054	0,102 ± 0,011	0,106 ± 0,020	1,057 ± 0,311
5	0,943 ± 0,060	0,107 ± 0,020	0,119 ± 0,026	0,674 ± 0,339
6	1,119 ± 0,015	0,072 ± 0,005	0,253 ± 0 019	1,715 ± 0,372

Tabla 4. 9: Parámetros cinéticos pseudoestequiométricos del modelo obtenidos por ajuste estadístico a los datos de los experimentos de la Tabla 4.6.

Exp.	Y_{MF} $\left(\frac{g_{MA}}{g_{FA}}\right)$	Y_{EX} $\left(\frac{g_{Et}}{g_X}\right)$	Y_{GX} $\left(\frac{g_G}{g_X}\right)$	Y_{IX} $\left(\frac{g_I}{g_X}\right)$	Y_{IF} $\left(\frac{g_I}{g_{FA}}\right)$
2	0,434 ± 0,032	5,29 ± 0,16	21,6 ± 5,2	50,3 ± 11,9	2,38 ± 0,66
3	0,279 ± 0,018	8,48 ± 0,41	33,1 ± 11,6	39,9 ± 6,8	1,69 ± 0,36
4	0,305 ± 0,016	6,43 ± 0,40	31,6 ± 12,2	39,8 ± 5,6	1,51 ± 0,28
5	0,317 ± 0,019	8,20 ± 0,63	46,1 ± 15,1	34,7 ± 4,2	1,35 ± 0,21
6	0,239 ± 0,011	6,38 ± 0,29	18,9 ± 13,5	37,1 ± 13,5	1,17 ± 0,15

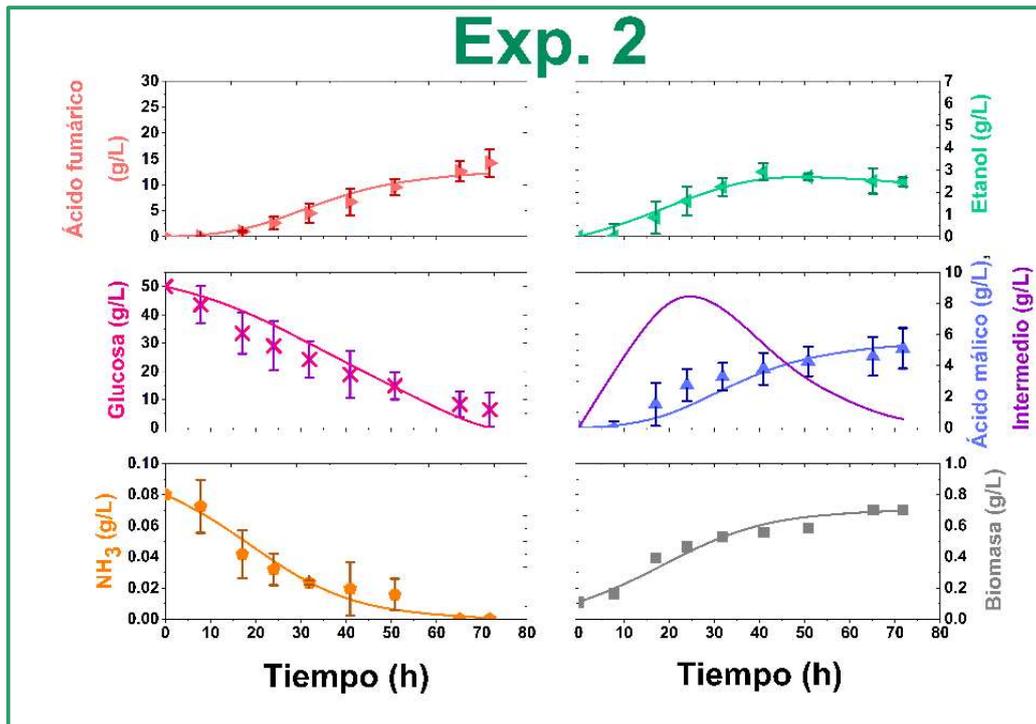


Figura 4. 17: Reproducción de los datos experimentales del experimento 2 obtenida mediante el ajuste del modelo cinético considerando el consumo de oxígeno en el esquema de reacción.

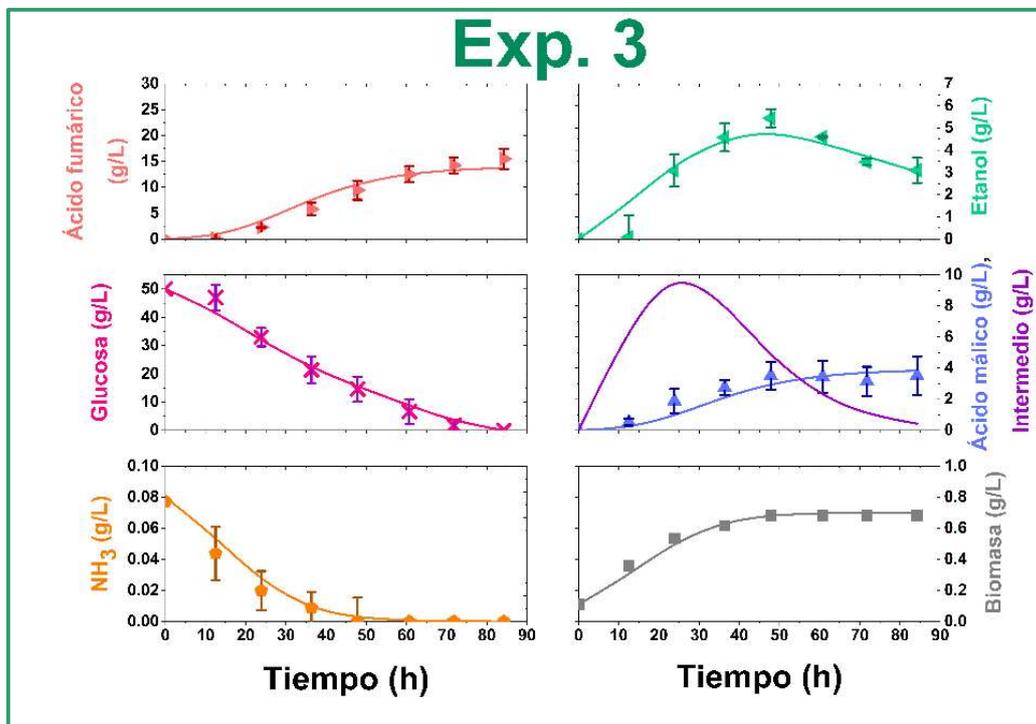


Figura 4. 18: Reproducción de los datos experimentales del experimento 3 obtenida mediante el ajuste del modelo cinético considerando el consumo de oxígeno en el esquema de reacción.

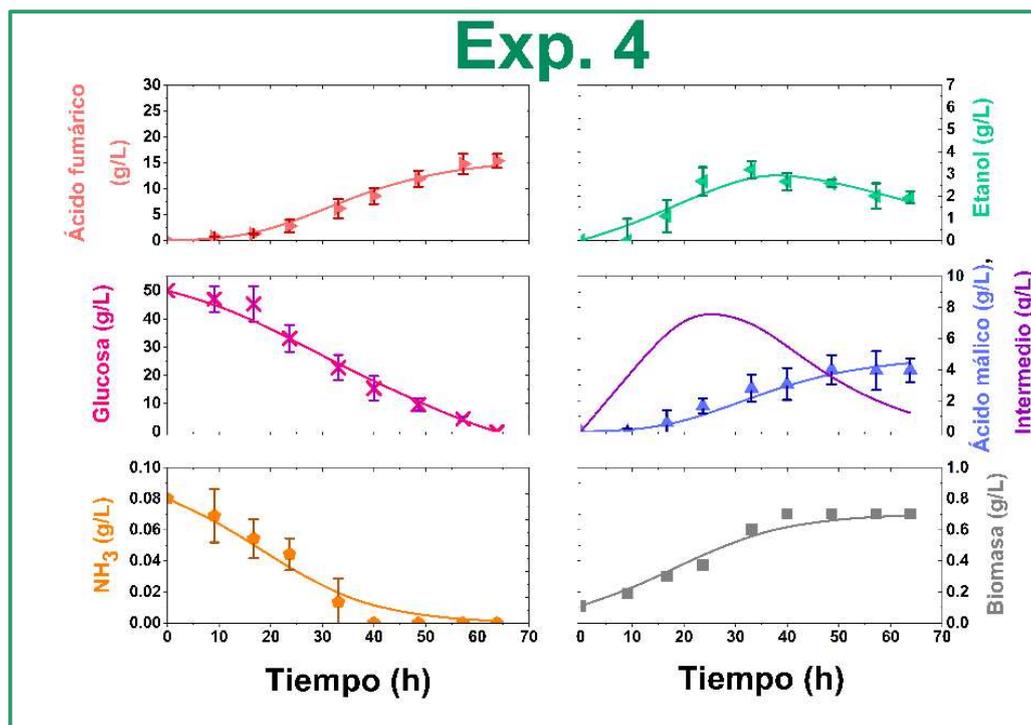


Figura 4. 19: Reproducción de los datos experimentales del experimento 4 obtenida mediante el ajuste del modelo cinético considerando el consumo de oxígeno en el esquema de reacción.

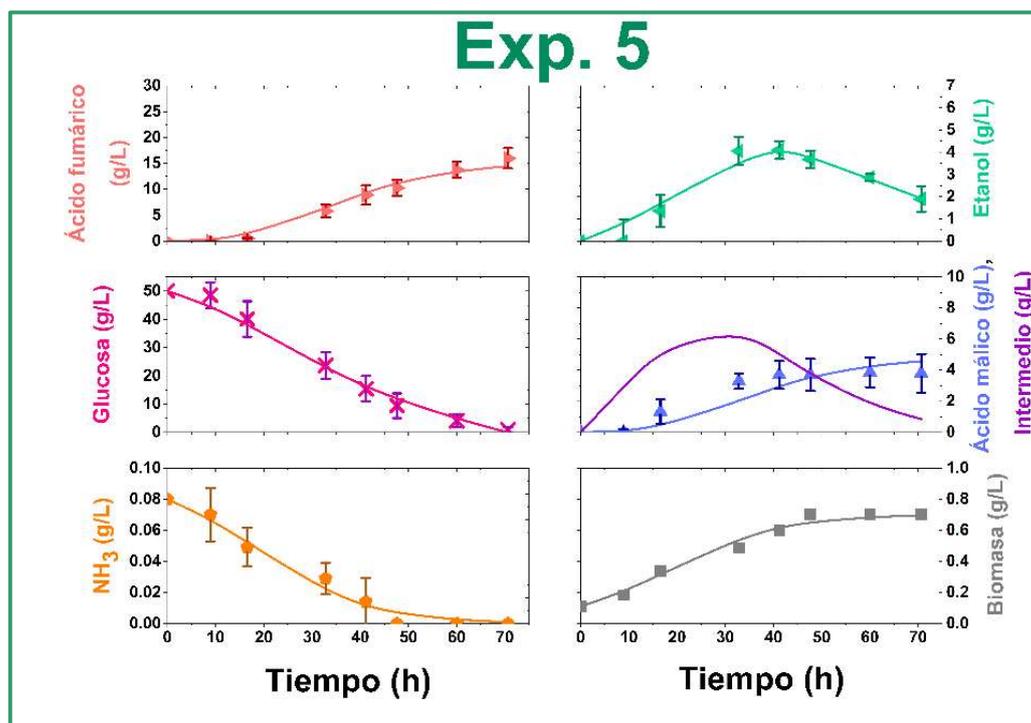


Figura 4. 20: Reproducción de los datos experimentales del experimento 5 obtenida mediante el ajuste del modelo cinético considerando el consumo de oxígeno en el esquema de reacción.

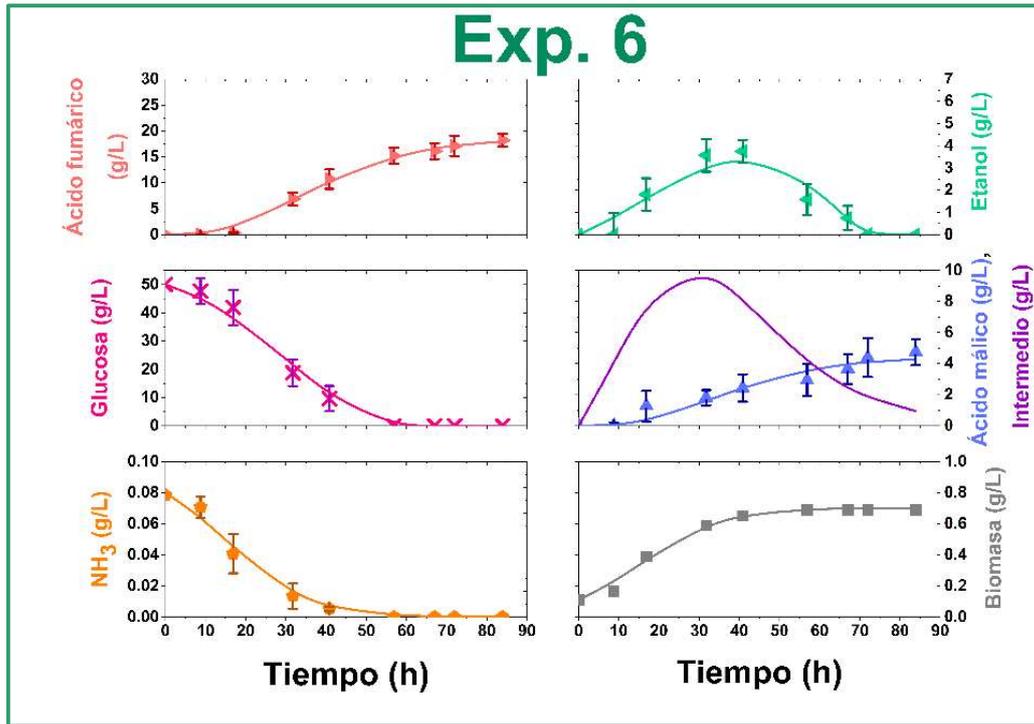
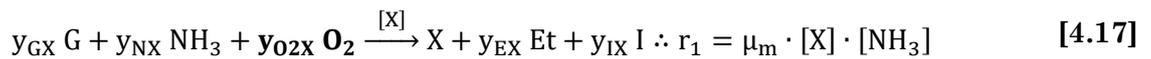


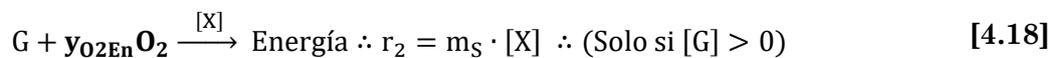
Figura 4. 21: Reproducción de los datos experimentales del experimento 6 obtenida mediante el ajuste del modelo cinético considerando el consumo de oxígeno en el esquema de reacción.

Tras este primer ajuste, se ha vuelto a modificar el modelo cinético para introducir el oxígeno, de manera que quede completa la modelización del proceso y sea capaz de explicar y simular todos los fenómenos que tienen lugar en él. Se ha completado el esquema de reacción, descrito en las ecuaciones 4.17–4.20, introduciendo el oxígeno como sustrato en todas las reacciones, excepto en la reacción 3 (ecuación 4.19), ya que esta reacción solo contempla los últimos pasos de la ruta TCA reductiva, donde no interviene el oxígeno, simplemente describe reacciones enzimáticas no dependientes de oxígeno^{4,28,75} y el transporte al exterior de los productos, también independiente del oxígeno^{87,112}.

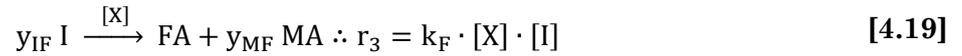
Reacción 1: Crecimiento celular y producciones asociadas.



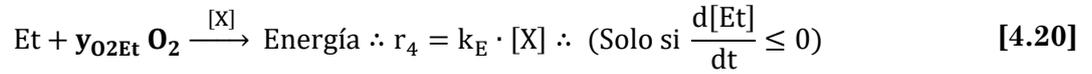
Reacción 2: Mantenimiento celular.



Reacción 3: Ruta TCA reductiva.



Reacción 4: Consumo del etanol generado por el efecto *Crabtree*.



A partir de ese conjunto de ecuaciones, se obtiene la velocidad de evolución del oxígeno en la fase líquida, expresado en la ecuación 4.21, pudiendo ajustarse la evolución del oxígeno disuelto con el tiempo en los experimentos realizados.

$$\frac{d[O_{2(l)}]}{dt} = k_L \cdot a \cdot ([O_2^*] - [O_2]) - Y_{O2X} \cdot r_1 - Y_{O2G} \cdot r_2 - Y_{O2Et} \cdot r_4 \quad [4.21]$$

De la observación de las ecuaciones 4.21 y 4.11, puede deducirse la ecuación 4.22, donde se define la OUR como la suma de todos los procesos que consumen oxígeno en nuestro sistema. Por analogía de esta última ecuación con la ecuación 4.12, se obtiene la definición de q_{O2} como la combinación de los parámetros cinéticos relacionados con el consumo de oxígeno en el modelo propuesto (ecuación 4.23).

$$OUR = (Y_{O2X} \cdot \mu_m \cdot [NH_3] + Y_{O2G} \cdot m_S + Y_{O2Et} \cdot k_E) \cdot [X] \quad [4.22]$$

$$q_{O2} = (Y_{O2X} \cdot \mu_m \cdot [NH_3] + Y_{O2G} \cdot m_S + Y_{O2Et} \cdot k_E) \quad [4.23]$$

Puede observarse como según la ecuación 4.22, al acabar el crecimiento celular predice que la OUR debería ser constante durante el resto del proceso, sin embargo, en la Figura 4.14a puede verse claramente como OUR no se queda constante, sino que, al acabar el crecimiento celular, pasa por un máximo para luego decrecer conforme avanza el proceso.

Debido a este fenómeno, se planteó la hipótesis de que, una vez finalizado el crecimiento celular, la biomasa viable en el proceso no se corresponde con toda la biomasa medida indirectamente por consumo de nitrógeno¹¹³. Esto podría ser debido a la acumulación excesiva de cristales de fumarato en el seno del micelio (Figura 4.5), que comprometan la viabilidad celular, al ejercer algún tipo de toxicidad sobre el hongo¹¹⁴, además de constituir una resistencia a la difusión de oxígeno (como se ha señalado anteriormente en la determinación de OUR de forma experimental).

Por otra parte, la propia morfología del hongo puede suponer un impedimento para la transferencia de oxígeno, ya que como se ha comentado anteriormente, la implantación del proceso en el biorreactor ha conllevado una pérdida del control sobre la morfología. Esta nueva morfología obviamente dificulta la difusión de oxígeno y nutrientes, lo que provoca la muerte celular en las capas más interiores de los *clump*^{113,114}. Por esta razón, se ha modificado el modelo cinético, de manera que una vez alcanzada la fase estacionaria de desarrollo la biomasa comienza a perder viabilidad conforme avanza el tiempo (ecuación 4.24). De esta manera, el modelo contempla esta disminución de biomasa viable, que se usará para el ajuste de la ecuación 4.21 a los resultados experimentales.

$$\frac{d[X]}{dt} = -k_d \cdot t \therefore (\text{Solo si } [NH_3] = 0) \quad [4.24]$$

En la Tabla 4.10 se presentan los valores de los parámetros estadísticos y en la Tabla 4.11 los valores de los parámetros del modelo obtenidos del ajuste de las ecuaciones [4.14] a [4.21] y [4.24] a los datos del experimento 6, que es el que mejor produce ácido fumárico.

Comparando los valores de los parámetros recogidos en las Tablas 4.8 y 4.9 del ajuste del experimento 6 con las recogidas en la Tabla 4.11, se puede observar que los valores son prácticamente iguales, si se tienen en cuenta los intervalos de confianza obtenidos del ajuste.

En la Figura 4.23 se representa la reproducción de los datos experimentales obtenida de dicho ajuste, en la que, de nuevo, se comprueba la buena reproducción de los datos experimentales obtenida mediante el ajuste realizado del modelo propuesto.

Tabla 4. 10: Parámetros estadísticos del ajuste del experimento 6 al modelo cinético con O₂.

Parámetro	RMSE	F ₉₅	%VE
Valor	0,19	2,13·10 ⁴	99,19

Tabla 4. 11: Parámetros cinéticos del ajuste del experimento 6 al modelo con O₂.

Parámetro	Valor	Unidades
μ_m	$1,119 \pm 0,015$	$\left(\frac{L}{g_{NH_3} \cdot h}\right)$
k_F	$(7,190 \pm 1,290) \cdot 10^{-2}$	$\left(\frac{L \cdot g_{FA}}{g_X \cdot g_I \cdot h}\right)$
k_E	$(3,665 \pm 0,693) \cdot 10^{-1}$	$\left(\frac{g_{Et}}{g_X \cdot h}\right)$
m_S	$1,716 \pm 0,969$	$\left(\frac{g_G}{g_X \cdot h}\right)$
Y_{MF}	$(2,387 \pm 0,302) \cdot 10^{-1}$	$\left(\frac{g_{MA}}{g_{FA}}\right)$
Y_{EX}	$6,609 \pm 0,791$	$\left(\frac{g_{Et}}{g_X}\right)$
Y_{GX}	$18,869 \pm 6,891$	$\left(\frac{g_G}{g_X}\right)$
Y_{IX}	$37,08 \pm 9,27$	$\left(\frac{g_I}{g_X}\right)$
Y_{IF}	$1,167 \pm 0,390$	$\left(\frac{g_I}{g_{FA}}\right)$
k_d	$(3,270 \pm 0,060) \cdot 10^{-4}$	$\left(\frac{g_X}{L \cdot h^2}\right)$
Y_{O_2X}	$(5,889 \pm 2,880) \cdot 10^{-1}$	$\left(\frac{g_{O_2}}{g_X}\right)$
Y_{O_2En}	$(3,110 \pm 0,075) \cdot 10^{-1}$	$\left(\frac{g_{O_2}}{g_G}\right)$
Y_{O_2Et}	$1,740 \pm 0,033$	$\left(\frac{g_{O_2}}{g_{Et}}\right)$

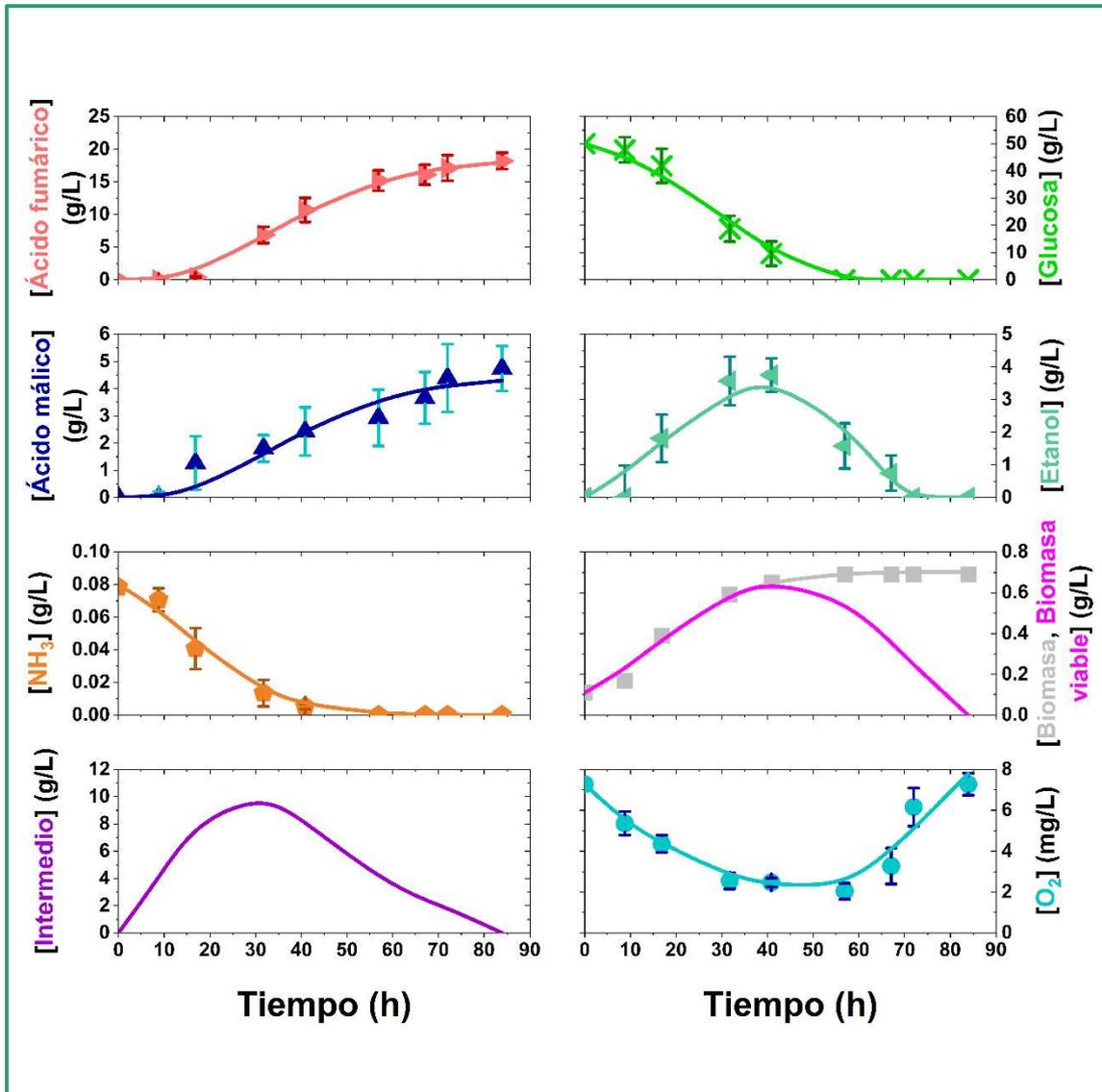


Figura 4. 22: Reproducción de los datos experimentales del experimento 6 obtenida mediante el ajuste del modelo cinético considerando el consumo de oxígeno en el esquema de reacción.

5. Conclusiones

“A nadie le vino la cordura antes que la insensatez”

Lucio Anneo Séneca

5.1. Producción en matraz Erlenmeyer

Morfología y etapas previas

- ❖ La morfología más adecuada para llevar a cabo el proceso fermentativo de producción de ácido fumárico es en *pellets* dispersos de pequeño tamaño; esta morfología se consigue por medio de la inoculación de una concentración inicial de 10^9 esporas/L. Para llevar a cabo el correcto desarrollo de esta morfología, esta primera etapa de inóculo debe realizarse a $34\text{ }^\circ\text{C}$ y 200 r.p.m. en matraces Erlenmeyer de 100 mL con 20 mL de medio B.
- ❖ Solamente debe llevarse a cabo una etapa previa. Si estas etapas previas no tienen lugar, la morfología del hongo no se desarrolla correctamente, afectando al estado metabólico en el que se produce la fase de producción, lo que lleva a un bajo rendimiento. Por el contrario, si se realiza más de una etapa previa, el hongo parece alcanzar un estado de letargo metabólico, posiblemente por el daño sufrido a valores demasiado bajos de pH.
- ❖ La duración de la etapa de inóculo debe ser de 12 h, tiempo en el que se alcanza una adecuada concentración de biomasa y que coincide con la mitad de la fase de crecimiento exponencial. Una duración superior de la misma hace que el estado del hongo no sea adecuado, debido a la continuada caída del valor del pH, que parece causar inhibición.
- ❖ El CaCO_3 es necesario en el medio de fermentación para que se produzca ácido fumárico. Si no se añade, sería necesaria otra fuente de CO_2 , otra base para neutralizar los ácidos producidos y, probablemente, un soporte particulado para facilitar el crecimiento del hongo.
- ❖ El cambio de etapa a la producción debe de hacerse con un 10% (v/v) de caldo de inóculo tras las 12 h de crecimiento sobre el medio de producción, teniéndose una concentración inicial de biomasa de 0,154 g/L.

Mejoras en el medio de cultivo

- ❖ La reducción del contenido de CaCO_3 en el medio de fermentación elimina problemas de solidificación causados por la precipitación excesiva de fumarato de calcio, sin comprometer la producción final de ácido fumárico
- ❖ La distribución del tamaño de partículas, así como el diámetro medio y la forma de estas en el CaCO_3 , son factores clave para tener en cuenta en el

proceso, influyendo en gran medida en el desarrollo de la morfología. Además, tienen un efecto directo sobre la producción de ácido fumárico.

- ❖ Eliminar del medio de producción el contenido en ácido tartárico y CSL lleva consigo un cambio en el perfil metabólico del hongo, aumentando la selectividad hacia el ácido fumárico. El contenido en otros ácidos orgánicos, como el málico, se ve reducido o prácticamente eliminado en el caso del ácido succínico.
- ❖ Las condiciones limitantes de nitrógeno fomentan la producción de ácido fumárico. Sin embargo, un exceso en esta restricción supone la pérdida de morfología en el hongo, con su consecuente reducción en la productividad.
- ❖ A lo largo del proceso, se produce precipitación de cristales de ácido fumárico en el seno de las hifas y en la superficie micelar, lo que observa un aparente crecimiento diaúxico, esto hace inviable la cuantificación de biomasa por peso seco. La cuantificación indirecta de biomasa por medida de amonio consumido permitió una mejor medida de la biomasa fúngica, al menos hasta el comienzo de la fase estacionaria.

5.2. Adaptación y uso de hidrolizados de residuos agroalimentarios

Hidrólisis enzimática

- ❖ Los hidrolizados de fruta son prometedores candidatos para usar como sustrato en procesos fermentativos, ya que disponen una adecuada concentración de azúcares que permite alcanzar concentraciones viables de ácido fumárico.
- ❖ Los hidrolizados presentan un contenido relevante en ciertos compuestos potencialmente tóxicos para los microorganismos, por lo que se espera cierta inhibición en su uso como medios de fermentación.

Uso de medios análogos

- ❖ La producción de ácido fumárico con *R. arrhizus* NRRL 1526 puede darse a partir de mezclas de glucosa y fructosa, teniendo buenos rendimientos de producción, siendo incluso mejores que con el uso exclusivo de glucosa.

- ❖ Los hidrolizados de los residuos de fruta pueden ser sustratos adecuados para el proceso, ya que, con los medios simulados, se han alcanzado concentraciones y productividades de ácido fumárico adecuadas para el desarrollo del proceso.
- ❖ La desaparición de etanol observada, una vez consumidos los azúcares, se debe al consumo del mismo por parte del microorganismo. Este consumo se hace en el contexto de asegurar el mantenimiento celular del hongo. La producción de este etanol se debe por tanto al efecto *Crabtree*.

Uso de hidrolizados como medio de fermentación

- ❖ El OPWH no es un sustrato adecuado para la producción de ácido fumárico, ya que la concentración obtenida en la fermentación del mismo puede considerarse residual.
- ❖ EL APH es un candidato prometedor como sustrato para desarrollar un proceso fermentativo de producción de ácido fumárico, ya que permite alcanzar rendimientos y concentraciones finales adecuadas y viables para el proceso. Sin embargo, presenta ciertos problemas de toxicidad.
- ❖ Modulando la cantidad de fuente de nitrógeno, y con ello la cantidad de biomasa generada, puede mejorarse la concentración final de ácido fumárico obtenida de la fermentación de APH.

5.3. Modelización cinética en matraz

Erlenmeyer

Modelización basada en glucosa

- ❖ Un modelo cinético no estructurado, no segregado es capaz de describir y simular el proceso de manera eficiente.
- ❖ El crecimiento de biomasa se ve limitado por la fuente de nitrógeno, siendo correctamente descrito por la ecuación de M'Kendrick y Pai modificada.
- ❖ La producción de los ácidos fumárico y málico se da en un régimen no asociado a crecimiento.
- ❖ El etanol posee un régimen de producción asociado a crecimiento.

Modelización basada en mezclas con fructosa y APH

- ❖ El consumo de etanol se da en el contexto de su uso como fuente de carbono alternativa para asegurar el mantenimiento celular.
- ❖ La producción de los ácidos fumárico y málico no depende de la concentración de azúcares presentes en el medio, sino de la concentración de un metabolito intermedio.
- ❖ El metabolito intermedio se acumula de forma excesiva debido a la inhibición causada por la presencia de ciertas sustancias en el APH.
- ❖ El modelo propuesto es capaz de explicar, predecir y simular los datos experimentales de manera acertada.

5.4. Estudios en biorreactor

Correlación empírica de $k_L a$

- ❖ La correlación empírica obtenida en este trabajo para el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en función de las variables (agitación y caudal de aire), predice adecuadamente la transferencia de oxígeno en el biorreactor empleado.

Influencia del $k_L a$ sobre la producción de ácido fumárico

- ❖ La implantación del proceso en biorreactor provoca la pérdida de control sobre la morfología del hongo.
- ❖ La transferencia de oxígeno no parece tener un efecto aparente sobre el desarrollo y crecimiento de la biomasa. En la producción de ácido fumárico no se da tampoco esta influencia sobre la producción final, si bien si existe una influencia positiva sobre la velocidad de producción.
- ❖ El ácido fumárico se produce de forma más selectiva en condiciones no limitantes de oxígeno disuelto en el proceso.
- ❖ Se precisa de una investigación más exhaustiva en la medida directa de OUR para generar un conocimiento más profundo del proceso.

Modelización cinética en biorreactor

- ❖ El modelo propuesto a lo largo de la Tesis describe satisfactoriamente el proceso tanto en matraz Erlenmeyer como en biorreactor. Los valores de los distintos parámetros cinéticos varían en función de las particularidades de cada experimento con tendencias razonables.
- ❖ La hipótesis planteada sobre la pérdida de viabilidad de la biomasa explica razonablemente los resultados experimentales obtenidos.
- ❖ El modelo modificado incluyendo la evolución de oxígeno se ajusta adecuadamente a los resultados del experimento modelizado.

6. Bibliografía

“Esperando, el nudo se deshace y la fruta madura”

Federico García Lorca

1. Nanda, S., Rana, R., Sarangi, P. K., Dalai, A. K. & Kozinski, J. A. A broad introduction to first-, second-, and third-generation biofuels. *Recent Adv. Biofuels Bioenergy Util.* 1–25 (2018) doi:10.1007/978-981-13-1307-3_1.
2. Das, R. K., Brar, S. K. & Verma, M. *Fumaric Acid. Platform Chemical Biorefinery* (Elsevier Inc., 2016). doi:10.1016/b978-0-12-802980-0.00008-0.
3. Parajuli, R. *et al.* Biorefining in the prevailing energy and materials crisis: A review of sustainable pathways for biorefinery value chains and sustainability assessment methodologies. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **43**, 244–263 (2015).
4. Martin-Dominguez, V., Estevez, J., De Borja Ojembarrena, F., Santos, V. E. & Ladero, M. Fumaric acid production: A biorefinery perspective. *Fermentation* **4**, (2018).
5. Moncada B, J., Aristizábal M, V. & Cardona A, C. A. Design strategies for sustainable biorefineries. *Biochem. Eng. J.* **116**, 122–134 (2016).
6. Batten, S. Climate Change and the Macro-Economy: A Critical Review. *SSRN Electron. J.* (2018) doi:10.2139/ssrn.3104554.
7. Esteban, J. & Ladero, M. Food waste as a source of value-added chemicals and materials: a biorefinery perspective. *Int. J. Food Sci. Technol.* **53**, 1095–1108 (2018).
8. Moral-Zamorano, M. *et al.* Concentration effect over thermoresponse derived from organometallic compounds of functionalized poly(N-isopropylacrylamide-co-dopamine methacrylamide). *Polymers (Basel)*. **13**, (2021).
9. Deng, Z., Jiang, Y., Chen, K., Gao, F. & Liu, X. Petroleum Depletion Property and Microbial Community Shift After Bioremediation Using *Bacillus halotolerans* T-04 and *Bacillus cereus* 1-1. *Front. Microbiol.* **11**, 1–9 (2020).
10. Choi, S., Song, C. W., Shin, J. H. & Lee, S. Y. Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives. *Metab. Eng.* **28**, 223–239 (2015).
11. Pörtner, H. *et al.* *Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability Working Group II Contribution to the IPCC Sixth Assessment Report Citations to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [to the Sixth Assessment Report of the .* (2022). doi:10.1017/9781009325844.CITATIONS.
12. Masiá, P. *et al.* Bioremediation as a promising strategy for microplastics removal in wastewater treatment plants. *Mar. Pollut. Bull.* **156**, (2020).
13. Loureiro, M. L., Loomis, J. B. & Vázquez, M. X. Economic Valuation of Environmental Damages due to the Prestige Oil Spill in Spain. *Environ. Resour. Econ.* **44**, 537–553 (2009).
14. Data.GISS: GISS Surface Temperature Analysis (GISTEMP v4). <https://data.giss.nasa.gov/gistemp/>.
15. GitHub - owid/co2-data: Data on CO2 and greenhouse gas emissions by Our World in Data. <https://github.com/owid/co2-data>.
16. Mat Aron, N. S. *et al.* Sustainability of the four generations of biofuels – A review. *Int. J. Energy Res.* **44**, 9266–9282 (2020).

17. McGinn, S. M., Beauchemin, K. A., Coates, T. & Colombatto, D. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *J. Anim. Sci.* **82**, 3346–3356 (2004).
18. Geng, Y. & Doberstein, B. Developing the circular economy in China: Challenges and opportunities for achieving ‘leapfrog development’. *Int. J. Sustain. Dev. World Ecol.* **15**, 231–239 (2008).
19. Haas, W., Krausmann, F., Wiedenhofer, D. & Heinz, M. How Circular is the Global Economy? An Assessment of Material Flows, Waste Production, and Recycling in the European Union and the World in 2005. (2015) doi:10.1111/jiec.12244.
20. Edjabou, M. E., Takou, V., Boldrin, A., Petersen, C. & Astrup, T. F. The influence of recycling schemes on the composition and generation of municipal solid waste. *J. Clean. Prod.* **295**, 126439 (2021).
21. Das, R. K., Brar, S. K. & Verma, M. Potential use of pulp and paper solid waste for the bio-production of fumaric acid through submerged and solid state fermentation. *J. Clean. Prod.* **112**, 4435–4444 (2016).
22. Objetivos y metas de desarrollo sostenible - Desarrollo Sostenible. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>.
23. Patra, J. K., Das, G. & Shin, H. S. Microbial Biotechnology. *Microb. Biotechnol.* **2**, 1–537 (2018).
24. Portada - Desarrollo Sostenible. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/>.
25. El-Enshasy, H. A. Filamentous Fungal Cultures-Process Characteristics, Products, and Applications. *Bioprocess. Value-Added Prod. from Renew. Resour.* 225–261 (2007) doi:10.1016/B978-044452114-9/50010-4.
26. Hosseinpour Tehrani, H. *et al.* Integrated strain- And process design enable production of 220 g L⁻¹ itaconic acid with *Ustilago maydis*. *Biotechnol. Biofuels* **12**, 1–11 (2019).
27. Mojica, F. J. M. & Montoliu, L. On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. *Trends Microbiol.* **24**, 811–820 (2016).
28. Xu, Q., Li, S., Huang, H. & Wen, J. Key technologies for the industrial production of fumaric acid by fermentation. *Biotechnol. Adv.* **30**, 1685–1696 (2012).
29. Garcia-Montalvo, J. *et al.* Extraction of Antioxidants from Grape and Apple Pomace : Solvent Selection and Process Kinetics. *Appl. Sci.* (2022).
30. Arias, A., Feijoo, G. & Moreira, M. T. Exploring the potential of antioxidants from fruits and vegetables and strategies for their recovery. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **77**, 102974 (2022).
31. de la Torre, I. *et al.* Utilisation/upgrading of orange peel waste from a biological biorefinery perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 5975–5991 (2019).
32. Jiménez-Quero, A. *et al.* Itaconic and fumaric acid production from biomass

- hydrolysates by *Aspergillus* strains. *J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 1557–1565 (2016).
33. Sharma, P. *et al.* Sustainable processing of food waste for production of bio-based products for circular bioeconomy. *Bioresour. Technol.* **325**, 124684 (2021).
 34. Martin-Dominguez, V., Bouzas-Santiso, L., Martinez-Peinado, N., Santos, V. E. & Ladero, M. Kinetic Modelling of the Coproduction Process of Fumaric and Malic Acids by *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526. *Processes* **8**, (2020).
 35. Straathof, A. J. J. Transformation of biomass into commodity chemicals using enzymes or cells. *Chem. Rev.* **114**, 1871–1908 (2014).
 36. Hopson, C. *et al.* A new approach for the use of cellulose-rich solids from biorefinery in the formulation of gel-like materials. *Ind. Crops Prod.* **186**, 115230 (2022).
 37. Liakou, V. *et al.* Valorisation of fruit and vegetable waste from open markets for the production of 2,3-butanediol. *Food Bioprod. Process.* **108**, 27–36 (2018).
 38. Perussello, C. A., Zhang, Z., Marzocchella, A. & Tiwari, B. K. Valorization of Apple Pomace by Extraction of Valuable Compounds. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **16**, 776–796 (2017).
 39. Liu, H. *et al.* Preparation of hydrolytic liquid from dried distiller's grains with solubles and fumaric acid fermentation by *Rhizopus arrhizus* RH 7-13. *J. Environ. Manage.* **201**, 172–176 (2017).
 40. Rana, B. K., Singh, U. P. & Taneja, V. Antifungal activity and kinetics of inhibition by essential oil isolated from leaves of *Aegle marmelos*. *J. Ethnopharmacol.* **57**, 29–34 (1997).
 41. Grande-Tovar, C. D., Chaves-Lopez, C., Serio, A., Rossi, C. & Paparella, A. Chitosan coatings enriched with essential oils: Effects on fungi involve in fruit decay and mechanisms of action. *Trends Food Sci. Technol.* **78**, 61–71 (2018).
 42. Tsen, H. Y. & Tsai, S. Y. Comparison of the kinetics and factors affecting the stabilities of chitin-immobilized naringinases from two fungal sources. *J. Ferment. Technol.* **66**, 193–198 (1988).
 43. Kuenz, A. & Krull, S. Biotechnological production of itaconic acid—things you have to know. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 3901–3914 (2018).
 44. Ozturk, B., Parkinson, C. & Gonzalez-Miquel, M. Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents. *Sep. Purif. Technol.* **206**, 1–13 (2018).
 45. Cañada-Barcala, A. *et al.* Sustainable Production of Furfural in Biphasic Reactors Using Terpenoids and Hydrophobic Eutectic Solvents. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **9**, 10266–10275 (2021).
 46. Krull, S., Eidt, L., Hevekerl, A., Kuenz, A. & Prüße, U. Itaconic acid production from wheat chaff by *Aspergillus terreus*. *Process Biochem.* **63**, 169–176 (2017).
 47. Roa Engel, C. A., Straathof, A. J. J., Zijlmans, T. W., Van Gulik, W. M. & Van Der Wielen, L. A. M. Fumaric acid production by fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**, 379–389 (2008).

48. Werpy, T. & Petersen, G. Top Value Added Chemicals from Biomass Volume I—Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas Energy Efficiency and Renewable Energy. *Top Value Added Chem. from Biomass* (2004).
49. Liu, H. *et al.* Co-fermentation of a mixture of glucose and xylose to fumaric acid by *Rhizopus arrhizus* RH 7-13-9#. *Bioresour. Technol.* **233**, 30–33 (2017).
50. Nieboer, C., de Hoop, D., Langendijk, P. N. J., van Loenen, A. C. & Gubbels, J. Fumaric acid therapy in psoriasis: A double-blind comparison between fumaric acid compound therapy and monotherapy with dimethylfumaric acid ester. *Dermatologica* **181**, 33–37 (1990).
51. Weißert, R. Multiple Sklerose-Risiken und Nutzen der neuen antiinflammatorischen Substanzen. *J. für Neurol. Neurochir. und Psychiatr.* **16**, 95–101 (2014).
52. Fumaric Acid Market Size & Share Analysis Report, 2022. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/fumaric-acid-market>.
53. Fumaric Acid Market | 2022 - 27 | Industry Share, Size, Growth - Mordor Intelligence. <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/fumaric-acid-market#faqs>.
54. E297 - Ácido Fumárico • ADITIVOS ALIMENTARIOS. <https://www.aditivos-alimentarios.com/2016/01/E297.html>.
55. Liu, H. *et al.* Food Waste Fermentation to Fumaric Acid by *Rhizopus arrhizus* RH7-13. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **180**, 1524–1533 (2016).
56. Naude, A. & Nicol, W. Fumaric acid fermentation with immobilised *Rhizopus oryzae*: Quantifying time-dependent variations in catabolic flux. *Process Biochem.* **56**, 8–20 (2017).
57. Fumaric Acid Market | 2022 - 27 | Industry Share, Size, Growth - Mordor Intelligence. <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/fumaric-acid-market#faqs>.
58. CFR - Code of Federal Regulations Title 21. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=172.350&SearchTerm=fumaric acid>.
59. Zhang, K., Yang, S. T., Chalmers, J. J. & Wood, D. Fumaric Acid Fermentation by *Rhizopus oryzae* with Integrated Separation Technologies. 1–210 (2012).
60. Liu, H. *et al.* Production of fumaric acid by immobilized *Rhizopus arrhizus* RH 7-13-9# on loofah fiber in a stirred-tank reactor. *Bioresour. Technol.* **244**, 929–933 (2017).
61. Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D. & Branduardi, P. Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends Biotechnol.* **26**, 100–108 (2008).
62. Abraham, A. *et al.* Fumaric acid production from sugarcane trash hydrolysate using *Rhizopus oryzae* NIIST 1. *Indian J. Exp. Biol.* **58**, 548–556 (2020).
63. Adrio, J. L. & Demain, A. L. Fungal biotechnology. *Int. Microbiol.* **6**, 191–199 (2003).

64. Aspartic Acid Market Size, Share & Trends Report, 2022. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/aspartic-acid-market>.
65. Zhang, Y. *et al.* The Forest Sector in China: Towards a market economy. *World For. Soc. Environ.* (1999).
66. Wang, J. & Nie, Y. Chinese rosin intra-industry trade research. *J. Comput. Theor. Nanosci.* **13**, 6034–6042 (2016).
67. Rhodes, R. A., Moyer, A. J., Smith, M. L. & Kelley, S. E. Production of fumaric acid by *Rhizopus arrhizus*. *Appl. Microbiol.* **7**, 74–80 (1959).
68. Rhodes, R. A. *et al.* Production of Fumaric Acid in 20-Liter Fermentors. *Appl. Microbiol.* **10**, 9–15 (1962).
69. Ling, L. & Ng, T. Fermentation process for carboxylic acids. *US Pat.* 4,877,731 1–6 (1989).
70. Cavani, F., Luciani, S., Degli Esposti, E., Cortelli, C. & Leanza, R. Surface dynamics of a vanadyl pyrophosphate catalyst for n-butane oxidation to maleic anhydride: An in situ Raman and reactivity study of the effect of the P/V atomic ratio. *Chem. A Eur. J.* (2010).
71. Pavarelli, G. *et al.* A New Process for Maleic Anhydride Synthesis from a Renewable Building Block: The Gas-Phase Oxidehydration of Bio-1-butanol. *ChemSusChem* **8**, 2250–2259 (2015).
72. Magalhães Júnior, A. I. *et al.* Challenges in the production of second-generation organic acids (potential monomers for application in biopolymers). *Biomass and Bioenergy* **149**, (2021).
73. Ding, Y., Li, S., Dou, C., Yu, Y. & He, H. Production of fumaric acid by *Rhizopus oryzae*: Role of carbon-nitrogen ratio. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **164**, 1461–1467 (2011).
74. Kato, Y., Yamagishi, J. & Asano, Y. Maleate cis-trans isomerase from *Arthrobacter* sp. TPU 5446. *J. Ferment. Bioeng.* **80**, 610–612 (1995).
75. Ichikawa, S., Iino, T., Sato, S., Nakahara, T. & Mukataka, S. Improvement of production rate and yield of fumaric acid from maleic acid by heat treatment of *Pseudomonas alcaligenes* strain XD-1. *Biochem. Eng. J.* **13**, 7–13 (2003).
76. Song, P., Li, S., Ding, Y., Xu, Q. & Huang, H. Expression and characterization of fumarase (FUMR) from *Rhizopus oryzae*. *Fungal Biol.* **115**, 49–53 (2011).
77. Zhang, K., Zhang, B. & Yang, S.-T. Production of Citric, Itaconic, Fumaric, and Malic Acids in Filamentous Fungal Fermentations. *Bioprocess. Technol. Biorefinery Sustain. Prod. Fuels, Chem. Polym.* 375–398 (2013) doi:10.1002/9781118642047.ch20.
78. Liu, H., Wang, W., Deng, L., Wang, F. & Tan, T. High production of fumaric acid from xylose by newly selected strain *Rhizopus arrhizus* RH 7-13-9#. *Bioresour. Technol.* **186**, 348–350 (2015).
79. Mueller, G. M. & Schmit, J. P. Fungal biodiversity: What do we know? What can we predict? *Biodivers. Conserv.* **16**, 1–5 (2007).
80. Troiano, D., Orsat, V. & Dumont, M. J. Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **117**, 109472 (2020).

81. Moore, D., Robson, G. D. & Trinci, A. P. J. *21st Century Guidebook to Fungi*. (Cambridge University Press).
82. Ahnan-Winarno, A. D., Cordeiro, L., Winarno, F. G., Gibbons, J. & Xiao, H. Tempeh: A semicentennial review on its health benefits fermentation, safety, processing, sustainability, and affordability. *Compr. Rev. food Sci. food Saf.* (2020).
83. Ferreira, J. A., Lennartsson, P. R., Edebo, L. & Taherzadeh, M. J. Zygomycetes-based biorefinery: Present status and future prospects. *Bioresour. Technol.* **135**, 523–532 (2013).
84. Zhang, K., Yu, C. & Yang, S. T. Effects of soybean meal hydrolysate as the nitrogen source on seed culture morphology and fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*. *Process Biochem.* **50**, 173–179 (2015).
85. Jiménez-Quero, A. *et al.* Fungal fermentation of lignocellulosic biomass for itaconic and fumaric acid production. *J. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 1–8 (2017).
86. Wakai, S. *et al.* Future insights in fungal metabolic engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **115**, 49–53 (2017).
87. Côte-Real, M., Leão, C. & van Uden, N. Transport of l(-)-malic acid and other dicarboxylic acids in the yeast *Candida sphaerica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 551–555 (1989).
88. Xu, Q., Li, S., Huang, H. & Wen, J. Key technologies for the industrial production of fumaric acid by fermentation. *Biotechnol. Adv.* **30**, 1685–1696 (2012).
89. Zhou, Z., Du, G., Hua, Z., Zhou, J. & Chen, J. Optimization of fumaric acid production by *Rhizopus delemar* based on the morphology formation. *Bioresour. Technol.* **102**, 9345–9349 (2011).
90. Papadaki, A. *et al.* Biotechnological production of fumaric acid: The effect of morphology of *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582. *Fermentation* **3**, (2017).
91. Naude, A. & Nicol, W. Improved continuous fumaric acid production with immobilised *Rhizopus oryzae* by implementation of a revised nitrogen control strategy. *N. Biotechnol.* **44**, 13–22 (2018).
92. Roa Engel, C. A., Van Gulik, W. M., Marang, L., Van der Wielen, L. A. M. & Straathof, A. J. J. Development of a low pH fermentation strategy for fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*. *Enzyme Microb. Technol.* **48**, 39–47 (2011).
93. Fu, Y., Xu, Q., Li, S., Huang, H. & Chen, Y. A novel multi-stage preculture strategy of *Rhizopus oryzae* ME-F12 for fumaric acid production in a stirred-tank reactor. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 1871–1876 (2009).
94. Mondala, A. H. Direct fungal fermentation of lignocellulosic biomass into itaconic, fumaric, and malic acids: current and future prospects. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 487–506 (2015).
95. Martín-Dominguez, V. *et al.* Production of Fumaric Acid by *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526: A Simple Production Medium and the Kinetic Modelling of the Bioprocess. *Fermentation* **8**, 64, (2022).

96. Eidt, L. Nutzung nachwachsender Rohstoffe für die biotechnologische Produktion von Fumarsäure. (Technical University of Braunschweig, 2021).
97. Rodríguez Porcel, E. M., Casas López, J. L., Sánchez Pérez, J. A., Fernández Sevilla, J. M. & Chisti, Y. Effects of pellet morphology on broth rheology in fermentations of *Aspergillus terreus*. *Biochem. Eng. J.* **26**, 139–144 (2005).
98. de la Torre, I. *et al.* Study on the effects of several operational variables on the enzymatic batch saccharification of orange solid waste. *Bioresour. Technol.* **245**, 906–915 (2017).
99. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
100. Ribeiro, L. F. *et al.* Profile of bioactive compounds from grape pomace (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1007**, 72–80 (2015).
101. Ripoll, V., Rodríguez, A., Ladero, M. & Santos, V. E. High 2,3-butanediol production from glycerol by *Raoultella terrigena* CECT 4519. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **43**, 685–692 (2020).
102. de la Morena, S., Acedos, M. G., Santos, V. E. & Garcia-Ochoa, F. Dihydroxyacetone production from glycerol using *Gluconobacter oxydans*: Study of medium composition and operational conditions in shaken flasks. *Biotechnol. Prog.* 1–9 (2019) doi:10.1002/btpr.2803.
103. Rodriguez, A., Escobar, S., Gomez, E., Santos, V. E. & Garcia-Ochoa, F. Behavior of several *pseudomonas putida* strains growth under different agitation and oxygen supply conditions. *Biotechnol. Prog.* **34**, 900–909 (2018).
104. Swart, R. M., Roux, F., Naude, A., Jongh, N. W. De & Nicol, W. Fumarate production with *Rhizopus oryzae*: utilising the Crabtree effect to minimise ethanol by - product formation. *Biotechnol. Biofuels* 1–10 (2020) doi:10.1186/s13068-020-1664-8.
105. Fu, Y. Q. *et al.* Enhancement of fumaric acid production by *Rhizopus oryzae* using a two-stage dissolved oxygen control strategy. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **162**, 1031–1038 (2010).
106. Swart, R. M., Ronoh, D. K., Brink, H. & Nicol, W. Continuous Production of Fumaric Acid with Immobilised *Rhizopus oryzae*: The Role of pH and Urea Addition. *Catalysts* **12**, (2022).
107. Swart, R. M., Brink, H. & Nicol, W. *Rhizopus oryzae* for Fumaric Acid Production: Optimising the Use of a Synthetic Lignocellulosic Hydrolysate. (2022).
108. Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., Santos, V. E. & Merchuk, J. C. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochem. Eng. J.* **49**, 289–307 (2010).
109. Garcia-Ochoa, F., Gomez, E. & Santos, V. E. Fluid dynamic conditions and oxygen availability effects on microbial cultures in STBR: An overview. *Biochem. Eng. J.* **164**, 107803 (2020).
110. Garcia-Ochoa, F. & Gomez, E. Oxygen Transfer Rate Determination:

- Chemical, Physical and Biological Methods. *Encycl. Ind. Biotechnol.* (2010) doi:10.1002/9780470054581.eib467.
111. de la Morena, S., Santos, V. E. & Garcia-Ochoa, F. Influence of oxygen transfer and uptake rates on dihydroxyacetone production from glycerol by *Gluconobacter oxydans* in resting cells operation. *Biochem. Eng. J.* **147**, 20–28 (2019).
 112. Zhang, B. & Yang, S. T. Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae*: Effects of overexpressing fumR gene on cell growth and fumaric acid biosynthesis from glucose. *Process Biochem.* **47**, 2159–2165 (2012).
 113. Veiter, L., Kager, J. & Herwig, C. Optimal process design space to ensure maximum viability and productivity in *Penicillium chrysogenum* pellets during fed-batch cultivations through morphological and physiological control. *Microb. Cell Fact.* **19**, 1–14 (2020).
 114. Veiter, L. & Herwig, C. The filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* analysed via flow cytometry—a fast and statistically sound insight into morphology and viability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 6725–6735 (2019).

ANEXOS

Anexo I

Título: Fumaric acid production: A biorefinery perspective.

Autores: Víctor Martín-Domínguez, Juliana Estevez, Francisco de Borja Ojembarrena, Victoria E. Santos y Miguel Ladero.

Revista: *Fermentation* (2018). 4, 33.

DOI: 10.3390/fermentation4020033.

Review

Fumaric Acid Production: A Biorefinery Perspective

Victor Martin-Dominguez, Juliana Estevez, Francisco de Borja Ojembarrena, Victoria E. Santos 
and Miguel Ladero * 

Chemical Engineering and Materials Department, Chemistry College, Complutense University, 28040 Madrid, Spain; vmdominguez@ucm.es (V.M.-D.); juliaest@ucm.es (J.E.); frojemba@ucm.es (F.d.B.O.); vesantos@ucm.es (V.E.S.)

* Correspondence: mladerog@ucm.es; Tel.: +34-91-394-4164

Received: 21 March 2018; Accepted: 4 May 2018; Published: 7 May 2018



Abstract: The increasing scarcity of fossil raw materials, together with the need to develop new processes and technology based on renewable sources, and the need to dispose of an increasing amount of biomass-derived waste, have boosted the concept of biorefineries. Both 1G and 2G biorefineries are focused on the obtention of biofuels, chemicals, materials, food and feed from biomass, a renewable resource. Fumaric acid, and most compounds involved in the Krebs cycle, are considered key platform chemicals, not only for being acidulants and additives in the food industry, but also for their prospective use as monomers. This review is focused on the biotechnological processes based on fungi, mainly of the *Rhizopus* genus, whose main product is fumaric acid, on the process conditions, the bioreactors and modes of operation and on the purification of the acid once it is produced.

Keywords: biorefinery; fumaric acid; waste valorization; bioprocess; bioreactor

1. Introduction

In these first years of the XXI century, increasing concerns on the availability of fossil resources for material and energy supply are surging due to the reduction of reserves, with an increasing technological challenge to obtain such resources (a good number of petroleum fields are working on secondary recovery conditions, while several tertiary recovery technologies are under development, like enhanced oil recovery and unconventional oil and gas recovery by using microbial surfactants and nanoparticles, for example) [1,2]. Apart from the political and economic strains that primary and secondary recovery resources (thus, relatively cheap resources) are creating in an insatiable world, this search for the last petroleum fields and the last drop of each of these fields comes hand in hand with the search for renewable and alternative energy and material resources. In this aspect, air and water movements can be utilized to the advantage of Humanity to create enough electricity [3]. On the other hand, biomass could be thought of as a renewable and almost endless source for the material needs of Humanity, as well as fuel for combustion engines (more than 100,000 million tons are created each year through photosynthesis) [4]. The confluence of the petroleum concept of refinery and the excess of renewable resources due to biomass have created the idea of a biorefinery as a complex net of processes of various natures (mechanical, thermal, chemical and biochemical) applied to biomass to create a plethora of energy vectors, chemicals, food and feed to foster Humanity. Due to the renewable nature of biomass, the possibility to develop sustainable processes is within our reach, but this could only happen if all activities are analyzed beforehand to ensure a low environmental impact, an acceptable economic feasibility and the adequate covering of social needs. To this end, global analyses like Life Cycle Assessment (LCA) and Life Cycle Costing seem to be essential management tools, while process development, integration, intensification and computer-aided design will be the engineering tools

of utmost importance in this new sustainability age [5,6]. As the petrochemical industry is based on simple platform chemicals such as ethylene or propylene, biorefineries should be based on their own range of chemical intermediates. The US Department of Energy (DOE) identified, in 2010 and 2014, several of them, mainly polyols, such as sorbitol, and monosaccharides, such as glycerol and glucose, but also several dicarboxylic acids, such as succinic and fumaric acid, and hydroxyacids, such as lactic acid [7]. For the polymer industry, bio-based classical monomers, like bio-ethylene, are an opportunity to resume its activity using biomass-based classical monomers [8], and dicarboxylic acids and hydroxyacids are an opportunity to develop new biodegradable polymers that reduce the impact on the environment, while ensuring a good technical performance and economic feasibility. This has been proved for lactic and succinic acids and it is under development for fumaric and itaconic acids [9,10].

Fumaric acid or (E)-2-butanodioic acid is a *trans*-C4 dicarboxylic acid, while maleic acid is its *cis*-counterpart. This acid presents a high boiling point due to its being a *trans*-acid, an aspect that permits a close intermolecular interaction. This same feature results in low water solubility, as compared to maleic acid. Some important physical constants of the acid are reported elsewhere [11,12].

Nowadays, fumaric acid is produced through petrochemical routes via isomerization of maleic acid that, in turn, is obtained by the hydrolysis of maleic anhydride. Worldwide, this latter compound was produced in excess of 3,400,000 tons in 2014 (estimated CAGR- or Compound Annual Growth Rate- from 2017 to 2021 is fixed at 6.8%), while fumaric acid global production was 225,200 tons in 2012, with an estimated production of about 300,000 tons for 2018 and about 346 ktons by 2020, at an estimated CAGR of 5.9% from 2014 to 2020 [13]. In both cases, as can be seen, moderate growth is forecast in the years to come, mainly due to the food industry increasing the demand for natural acidulants and flavoring agents for foods and beverages, and, in general, to the increasing demands from end use industries.

Figure 1 compiles global consumption of fumaric acid in 2016 considering its main application fields and the global regions and countries, in terms of tons consumed per year [14].

The most usual application, due to its relatively low price (FOB price: 1280–1700 USD/ton), is as an acidulant, preservative and flavoring agent in food and feed. Being a relatively strong acid, its buffering capacity at pH 3.0 is high, so only a small amount is needed to preserve acidity in foods near 4.5. On the other hand, this acid is a precursor for the production of other acids, like L-aspartic (2013 global production: 37,400 tones; 2021 CAGR 2021 *circa* 6%) and L-malic acid (2016 global production: 162,100 tones; CAGR2020 of 5.16%), that are also used in beverages, health drinks, and cosmetics [15,16].

While the second application by volume is in the paper and pulp industries, as an acid sizing agent, a progressive change to alkaline processing of wood to paper in North America and Europe is slightly reducing the importance of fumaric acid in this regard. Nonetheless, rosin Diels-Alder adducts with fumaric acid and maleic anhydride are common tackifiers in the paper industry and, regarding the rosin market, it is interesting to point out that China accounts for more than 90% of high-quality rosin global production (gum rosin).

Very close, in terms of tonnage, to this application is the consumption of fumaric acid to produce unsaturated polyester resins (UPEs). As in the previous case, the presence of an intermediate double C=C bond together with the two carboxylic acid moieties in the first and fourth carbon atoms permit the addition and condensation of polymerization reactions in the case of fumaric acid, giving rise to a plethora of possibilities. On the other hand, its *trans*-nature creates polymers that trend to be very compact due to multiple intermolecular interactions, so their mechanical and thermal properties are far better than those of the maleic acid-anhydride counterpart (albeit these latter ones are preferred for applications needing low-cost polymers) [11]. Together with succinic and itaconic acid, fumaric acid is a promising bio-derived C4 monomer for the production of UPEs, a family of polymers with wide applications as coatings, insulating materials, drug delivery systems and biomedical applications

(tissue engineering) [17,18]. Based on a similar reactivity, fumaric acid is used to modify natural polymers, like chitosan, to render films for the preservation of foods [19].

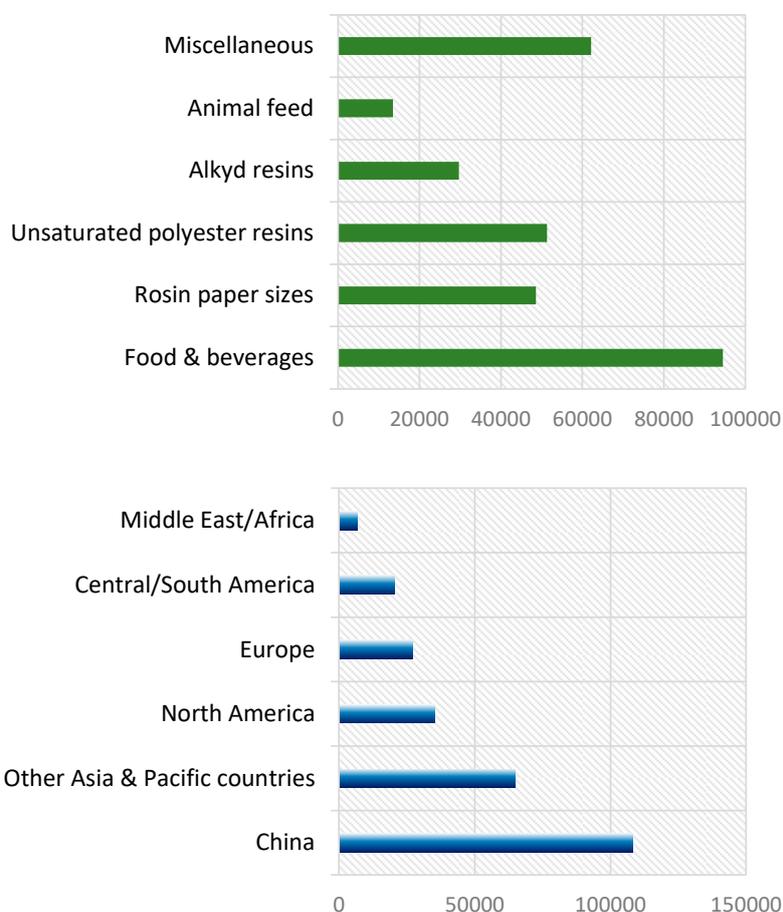


Figure 1. Fumaric acid consumption regarding its applications (in the upper graph) and countries/world regions (in the lower graph) [14].

Another application in the polymer industry that involves a high amount of fumaric acid is the production of alkyd resins, mainly in the Asia & Pacific region. These thermoplastic polymers are obtained by the condensation of polyols and polyacids (or their anhydrides) and subsequently modified with long fatty acids and oils, being one of the main monomers, in conjunction with phthalic anhydride, isophthalic acid, maleic anhydride, and many others. The main applications of these resins are in the coating industry [20].

In the last years, a growing concern about Climate Change has become evident; methane is a gas with a heating power more than four times that of CO₂ and an immense annual production, though much inferior. This fact, together with the need to care for the health and well-being of cattle and poultry, has introduced additives like fumaric acid in feed formulations [11,21]. Fumaric acid acts as a hydrogen sink in the rumen of cattle, thus reducing reductive conditions and avoiding reactions that end up in methane built-up, and increasing feed efficiency [22]. Curiously, Fumaric acid effects on pH in the rumen are not clear after several studies [23].

Finally, fumaric acid, and in particular, its esters (methyl, ethyl, propylfumarates), are finding very important applications: in dermatology (psoriasis), as anticarcinogenic and neuroprotecting agents, in multiple sclerosis and to mitigate inflammatory cardiac conditions, among other biomedical applications. The timely review of Das et al. compiles and discusses all these applications, while a profound review on psoriasis was recently written by Smith [24,25].

2. Production Processes

Fumaric acid is produced via biotechnological processes at a mass yield around 88% starting from glucose. However, with the advent of crude oil as the main carbon source in the industry at the end of World War II, fermentative processes were abandoned in favor of petrochemical routes through maleic anhydride and maleic acid, with a mass yield of about 112% [21]. In view of increasing concerns about oil availability, higher demands due to the Asia-Pacific region economic growth and increasing prices due to the implementation of enhanced recovery technologies, petrochemical prices are increasing, creating an adequate framework to consider once again biomass-based processes. On the other hand, environmental concerns and the need to dispose of huge quantities of biomass derived from human activities open the door to recover bioprocesses as the one that end up in the production of fumaric acid. Moreover, new knowledge on genetic engineering plus advanced process integration and intensification approaches should result in better yields from low-cost biomass resources and, what could be more important, better productivities.

Although petrochemical routes are not sustainable by nature, as they are based on a non-renewable raw material, they can be considered as benchmarks or references from the economic point of view. Nowadays, fumaric acid is produced by thermal or catalytic irreversible isomerization from maleic acid at 150 °C, which, in turn, is obtained from its anhydride by heating in presence of water. Maleic anhydride, on its part, is obtained from n-butane or from benzene, in both cases via catalytic oxidative processes [11,21]. The most modern process starts from n-butane, using vanadyl pyrophosphate $(VO)_2P_2O_5$ as a catalyst [26].

A possibility that can be developed from petrochemical or biomass resources is the dehydration of 1-butanol, an alcohol that is one of the products of the ABE fermentation [27] or that can be derived from propylene. The produced butenes are further oxidized to maleic anhydride. To this purpose, the same $(VO)_2P_2O_5$ is used as a complex catalyst, with mixed acid and redox sites [28].

2.1. Enzymatic Processes

Production via catalytic routes needs relatively high temperatures that result in inefficient conversion due to the formation of byproducts [21]. Biocatalysis approaches using enzymes reduce the thermal effect on isomerization of *cis-* to *trans*-groups and *vice versa*, as they work at very moderate temperatures [29]. Several microorganisms of the genus *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* and *Proteus* are able to synthesize maleate *cis-trans* isomerase at activities from 80 to 200 UI·L⁻¹. However, the enzymes from *Pseudomonas alcaligenes* and *Arthrobacter* sp. strain TPU 5446 are the most promising. The highest activity for the *Arthrobacter* enzyme is obtained with 0.5–1% maleic acid and 1% yeast extract. For *Pseudomonas alcaligenes*, the most interesting strain is XD-1.

As solvents, aromatics can be used with *Pseudomonas* species. If toluene is employed, up to 30 g·L⁻¹ fumaric acid is produced, together with high amounts of L-malic acid (10.6 g·L⁻¹). A moderate temperature of 45 °C favors fumaric acid built-up, up to 7 g·L⁻¹·h⁻¹ in 6 h. Further processing yields higher amounts of L-malic acid, reducing the concentration of fumaric acid.

To increase the yield of fumaric acid when using whole-cells, the thermal inactivation of fumarase was analyzed, as this enzyme transforms fumaric acid into L-malic acid. The relevant enzyme for the isomerization, *cis-trans* maleate isomerase, is more robust. In addition, thermal treatments enhance mass transfer across the cell membrane. Under these conditions, fumaric acid production from maleic acid by whole-cells gives a high yield of the target acid: 95% [30].

2.2. Fermentative Pathways

Before the advent of petrochemical processes, fumaric acid was produced in the USA by fermentative processes with the fungus *Rhizopus arrhizus* [11,21]. These processes have several stages: sporulation, mycelium or inoculum built-up and production. A scheme of the operations is presented in the next figure, depending on the base used for neutralization:

Once obtained, fumaric acid should be purified. This step depends on the basic agent used during neutralization: if Na_2CO_3 is used, the broth is filtered and acidified with H_2SO_4 to recover the fumaric acid needles; however, if CaCO_3 is employed, heating is needed before acidification to dissolve calcium fumarate [11,21].

Focusing on the fermentation step itself, there are several biochemical pathways that yield fumaric acid. One of them is pyruvate reductive carboxylation, being the pyruvate produced from monosaccharides, usually glucose, through the common glycolysis metabolism: The Embden–Meyerhof–Parnas pathway [9,11]. Another classical route in which fumaric acid is involved is the Krebs cycle [31]. This cycle includes reactions in which the oxalacetate interacts with Acetyl-CoA to form citric acid. In turn, citric acid undergoes two decarboxylation steps and other transformations to generate, again, oxalacetates: fumaric acid is one of the intermediates in such reactions [31,32]. The reductive pathway of the Krebs cycle is the main source of fumaric acid and involves fixation of CO_2 from a C3 acid to a C4 acid (pyruvate to oxalacetate). All steps can be observed in Figure 2.

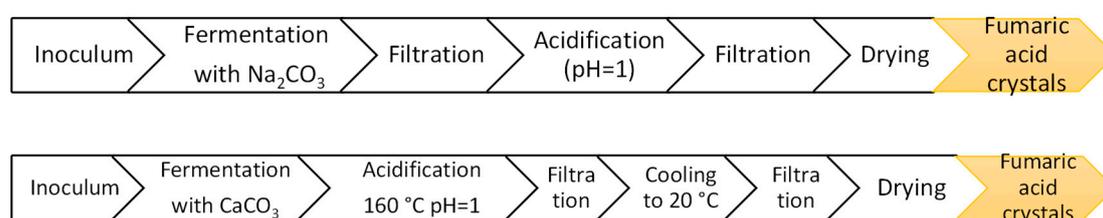


Figure 2. Operations during the fermentation process to fumaric acid depending on the basic neutralization reagent (Na_2CO_3 or CaCO_3).

C4 acids, as fumaric acids, tend to accumulate when nitrogen is lacking, though processes that involve microorganism growth, CO_2 fixation and glucose metabolism keep working [21]. Moreover, glycolysis is also linked to aminoacid metabolism, and this fact has resulted in the enhancement of fumaric acid production by mutant strains of *Rhizopus oryzae*. In any case, the only fumaric acid that is excreted by the fungi is produced in the reductive pathway.

In the synthesis of fumaric acid, there are three main enzymes: pyruvate carboxylase (in cytoplasm), malate dehydrogenase and fumarase (both in the cytosol and in the mitochondria). The first one catalyzes the carboxylation from pyruvate to oxalacetate with the aid of ATP and CO_2 , while maleate dehydrogenase induces the transformation of oxalacetate in malic acid, and fumarase isomerizes this latter acid to fumaric acid (but not the reverse reaction). This latter enzyme is particularly active under nitrogen stress conditions. The main pathways are shown in Figure 3.

Fermentation to fumaric acid is a process in which the type of microorganism employed, the conditions in which the operation is carried out, and the bioreactor selected are of utmost importance. In the next sections, these aspects will be commented on in depth.

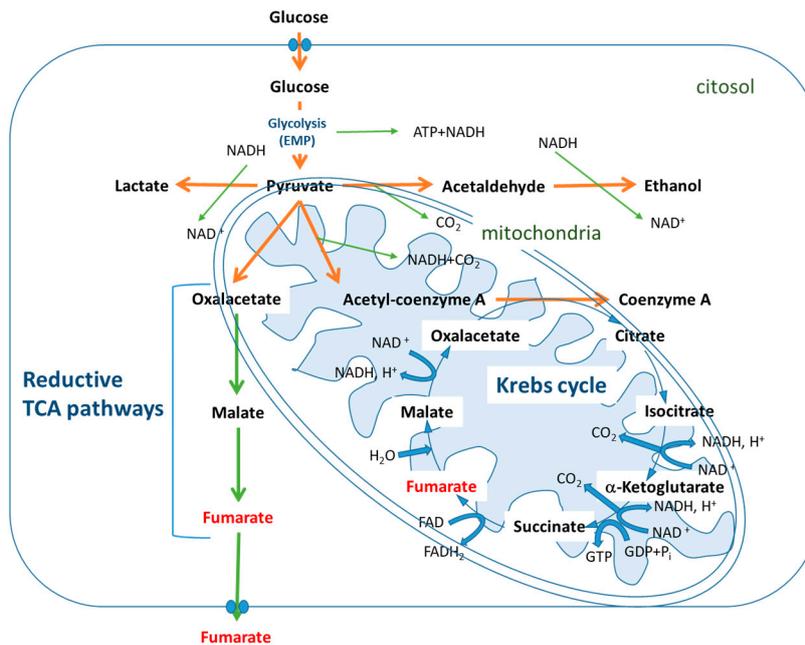


Figure 3. Pathways from glucose to fumaric acid (adapted from [31]).

3. Microorganisms

Filamentous fungi are the most employed microorganisms in fumaric acid production, in particular the genus *Rhizopus*, since their production yield is adequate and fungi of this genus provide the possibility of both aerobic or anaerobic fermentation, highlighting *R. arrhizus* and *R. oryzae* as the best producers.

Species from the genera *Mucor*, *Cunninghamella*, *Cirinella* and *Aspergillus* have also been studied as suitable fumaric acid producers [33].

Many other species could be used through genetic engineering strategies, introducing certain genes responsible for fumaric acid production, such as fumarase and fumarate dehydrogenase enzymes, across the huge number of possible host microorganisms, such as *E. coli* [34] or *Lactobacillus* species [21]. The host selection could be performed depending on the process specifications, for example, the used raw material.

However, sometimes fumaric acid natural producers are not able to achieve required yields or concentrations to implement a viable industrial process. In these cases, genetic improvement techniques can be used, obtaining microorganisms able to reach better production yields.

To improve *Rhizopus* species, several techniques have been used, e.g., random mutagenesis techniques, such as high energy irradiations (laser or UV) or the use of mutagens (N^+ or nitrosoguanidine).

Directed evolution is a more advanced technique than random mutagenesis, combining the promotion of variability in nucleic acids, through mutagenesis, for example, with a strong evolution pressure, such as the use of certain carbon sources.

3.1. Mutagenesis

Several studies have used random mutagenesis to improve different *R. oryzae* strains. The most common technique is high-energy radiation, applying two radiation stages, one with UV radiation, and the other with γ -rays, while selection is based on the diameter of the colony. *R. oryzae* RUR709 was developed from *R. oryzae* KTC 6946; this new mutant strain provides an increase of 88.81% in final fumaric acid concentration and 45.45% in productivity [35].

The application of the radiation influenced mutations, so a study about exposure time and irradiation power was done on *R. oryzae* ATCC 20344, optimizing the mutagenesis process which provided increases of 22.83% in final fumaric acid concentration [36].

These irradiation techniques, widely used, could be complemented with the addition of certain mutagens, such as nitrosoguanidine, combined with a selection pressure consisting of the presence of alkyl alcohol, to assure the survival of the cells without the alcohol dehydrogenase gene; strain MU-UN-8 was obtained, yielding fumaric acid concentrations 21.15% higher than the wild type strain: *R. oryzae* ME-F01 [37].

Nitrosoguanidine is not the only mutagen employed, N⁺ has successfully been used on *R. oryzae* ME-F12, obtaining increases of 28.22% in the final concentration [38].

In addition to random mutagenesis techniques, PCR mutagenesis has been applied, overexpressing *pyc* (pyruvate carboxylase) and *pepc* (phosphoenolpyruvate carboxylase) genes, using plasmids from PCR (*pyc* plasmids) and generated by *E. coli* (*pepc* plasmids), introduced to *R. oryzae* 99,880, obtaining 26% higher production when the *pyc* gene was overexpressed; however, the overexpression of the *pepc* gene decreased fumaric acid production [39].

3.2. Directed Evolution

Directed evolution is a technique widely used for generating different mutants from *Rhizopus* species to make them able to use different raw materials for producing fumaric acid.

Xylose is an alternative carbon source for *R. arrhizus*, which is not able to consume it properly, while this sugar is widely used in several biotechnological studies as suitable raw material, shaped similar to lignocellulosic biomass.

For using this lignocellulosic biomass as a raw material, directed evolution is used on *R. arrhizus* RH-7-13, consisting of growing spores, and pellets later, on different mediums with increasing concentrations of xylose, obtaining a final increase of 190% in final fumaric acid concentration compared with the initial strain [40].

Developing high performance production strains is another use for directed evolution techniques, combining random mutagenesis using UV radiation with high-throughput screening techniques: a strain able to produce 160% more fumaric acid than the wild type strain has been chosen [41].

4. Production Conditions

As mentioned previously, fumaric acid production can be carried out by many microorganisms, but optimization of the process depends on several variables, including operational conditions, broth composition and raw materials employed.

4.1. pH

pH is the most important condition in the production of acids by fermentation, and, in general, in biotechnological processes, due to its regulatory effect on microorganism activities.

In the last years, some publications have studied fumaric acid production at low values of pH [42,43], performing exhaustive research about low pH internal effects on *Rhizopus oryzae* cells, observing the changes in the composition of the fatty acids on the membranes and how the ATP concentration decreases [42], or the alteration of metabolism in response to acid stress [43].

At a 5-L bioreactor scale, using Na₂CO₃ as a neutralizing agent, fumaric acid production could be possible at pH 3 using a small quantity of citrate in the medium, which reduces the acid stress and increases the ATP concentration and fumaric acid production [42]. Under the same conditions, a metabolic study has revealed that carbon flux at low pH is altered due to the necessity of the cells to ensure cellular functions, such as essential amino acids and fatty acid production. To avoid the high demand of unsaturated fatty acids, the addition of 1% linolenic acid to the medium helps the cell to perform its basic functions and increases fumaric acid production [43].

pH is not the only factor that matters in fumaric acid production. The neutralizing agents usually employed are sodium and calcium carbonates, bicarbonates and hydroxides. After several decades of research, CaCO_3 is known to be the best agent, thus indicating that calcium is an ion that could result in enhancement of fumaric acid production [11]. This is probably due to the low solubility of calcium fumarate, that switches all equilibria in metabolism to the production of this compound, thus lowering the amount of other acids and alcohols. However, calcium fumarate needs high amounts of acid and thermal energy to be solubilized, and biomass cannot be reused as inoculum for further productive cycles.

Moreover, CaCO_3 particle size plays an important role. The use of micro-(CCMPs) and nanoparticles (CCNPs) resulted in high neutralization rates and high titers of fumaric acid (approx. $67 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), while nanoparticles increased FA productivity by 57%, up to $0.74 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, and permitted activity at lower viscosity [44]. In this same work, microwave heating proved to reduce the heating time needed for FA solubilization from 28 to 10 min.

4.2. Morphology

The control of the fungal morphology must be exhaustively studied because different morphologies direct metabolism to different products [45]. These morphologies are the result of different operating conditions, including final pH, nitrogen amount, agitation and inoculum mass. *Rhizopus* species can grow in three different morphologies: filamentous mycelium, pellet and clumps.

Filamentous mycelium is known to be the most productive morphology [46] but presents certain problems in industrial implementation because the formation of the mycelium dramatically increases the broth viscosity, causing operational problems [45]. A possible strategy could be to reduce the biomass amount while promoting this morphology and increasing specific productivity of fumaric acid, reducing the nitrogen source and, thus, creating a nitrogen stress situation [47]. For fumaric acid production, stress to cells seems to improve production, as observed when the phosphorus concentration in the broth is reduced [48].

The clump morphology must be avoided, because this kind of cell growth consists of only one big clump where the inner biomass is totally isolated from the medium, with a lack of nutrients and oxygen at the clump core that drives metabolism to ethanol and other fermentative by-products, while promoting the death of the inner biomass [45].

The pellet morphology is preferred for this industrial process, avoiding a high viscosity increase, while the pellet's size must be optimized to permit convenient mass transfer and avoid the existing problems in clumps.

To control fungal morphology, many conditions have been optimized, such as initial inoculum spore concentration or different nitrogen sources [45] or even the use of certain solid supports to develop the desired morphology [49].

The initial spore concentration in the inoculum affects the final morphology, resulting in dispersed mycelia at higher spore concentrations ($10^6 \text{ spores}\cdot\text{L}^{-1}$) and creating small pellets at low spore concentrations ($10^2 \text{ spores}\cdot\text{L}^{-1}$) [45].

Different nitrogen sources could impact the obtained morphology; ammonium sulphate is proven to have a key role in *R. arrhizus* metabolism, improving it at high concentrations of ammonium sulphate [46].

Soybean meal hydrolysate presents fine particles of insoluble proteins, which reduce the lag phase duration, so cell growth is faster, providing a very productive dispersed mycelium ($50.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), proving to be an effective nitrogen source to replace the industrial nitrogen sources [45].

The use of solid supports to develop morphology could be a solution for controlling morphology; the use of micro-nanoparticles gives a surface where spores can germinate and biomass can grow on the surface, preventing the problems of clumps and big pellet morphologies, and giving a direct particle size. These micro-nanoparticles could be used to supply certain micronutrients such as Fe^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} ions [49].

Fe_3O_4 seems to be the best support for the cell growth of *Rhizopus oryzae* 1526 and fumaric acid production, obtaining a 95.7% spore germination at 1000 mg/mL; on the other hand, MnO_2 is not recommended for supporting biomass, resulting in less than 10% germination [49].

Solid particle size seems to be a critical parameter. The use of nanoparticles of different materials, as support, causes several variations in morphology and fumaric acid production, as they considerably increase cation concentrations that induce stress-tolerance mechanisms, inhibiting growth and fumaric acid production. Thus, microparticles are best to support biomass growth [49].

4.3. Alternative Substrates

The composition of the culture medium depends on the microorganism requirements. In general, complex mediums are used when starting a process development, and these media are later complemented, simplified and optimized according to research and development [50].

Glucose is the most used carbon source, as it is readily metabolized by fungi. Its price is relatively low: 520–650 € per ton. Because cellulose is a glucose macropolymer and the main component of lignocellulosic biomass (125 USD/dry ton [51]; 40–50% *w/w*), its saccharification by enzymatic means should result in the production of enormous amounts of glucose, but biomass pretreatment, and enzyme production and adequate use, i.e., immobilization, recycling, process intensification are nowadays still under development to obtain economically competitive products in second-generation biorefinery facilities [52].

Apart from glucose, several substrates could be used in the search for new renewable raw materials to develop eco-friendly processes: carbon sources such as starch, xylose from lignocellulosic biomass, glycerol, etc. Metabolic profiling can aid to the identification and proper feeding of supplements that enhance the production of the acid, such as valine, leucine, sodium citrate, lactic acid, soybean oil or palmitic acid [50].

Alternative nitrogen sources have been analyzed in depth too, to find an alternative to classic nitrogen sources (ammonium salts, yeast extract, etc.). These alternative renewable nitrogen sources are treated biomass wastes such as corn steep liquor or soybean meal hydrolysate [45].

New renewable raw materials are very interesting from economic and environmental points of view, but they must be complemented and optimized to overcome their limitations, sometimes eliminating compounds, as phenolics and terpenes, with antimicrobial activity (via detoxifying processes). Complementation can be simple, such as the adjustment of the carbon-nitrogen ratio, observing how at lower ratios, the fumarase enzyme increases its activity and, with little complementation with urea, by-product formation decreases [47].

Optimization of one synthetic production medium has been achieved through the study of the metabolic profiles [50], analyzing intracellular key metabolites in corresponding pathways, obtaining a method to complement the medium during the production process, and applying this research to renewable raw materials [53].

It has been observed that complementing a synthetic medium with palmitic acid and soybean oil added at 32 h and sodium citrate, lactic acid, leucine and valine added at 48 h could increase fumaric acid production by 14% and decrease the production of by-products [50].

4.3.1. Xylose

Xylose is the main component, together with cellulose and lignin, of agrowaste and wood lignocellulosic biomass. It is present, together with mannose, in the hemicellulose fraction in corn stover, sugarcane bagasse, wheat straw, and several wood species (for example, *Pinus radiata* or *Eucalyptus*), being one of the most abundant monosaccharides on Earth (the lignocellulose content in biomass ranges from 12 to 27%) [54]. Being such an abundant simple sugar, it is crucial to find novel processes based on this carbon source.

Wild type *Rhizopus* species have several problems growing in a medium rich in xylose, so it is necessary to choose certain mutant strains from *Rhizopus* species or find new microorganisms, modified or not, able to grow and produce fumaric acid from xylose.

Concerning *Rhizopus* species, *Rhizopus arrhizus* RH 7-13-9# has been chosen by growing it in a medium rich in xylose. It has proved to be a good fumaric acid producer from xylose (73% yield) coming from hemicellulose [55]. Also, fermentation conditions have been optimized and it has been observed that a co-fermentation process, combining glucose and xylose, is able to reach higher fumaric acid concentrations ($46.68 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) than only xylose fermentation [56].

R. oryzae has also been studied in depth; transcriptome analysis has revealed that *R. oryzae* has different responses in the presence of glucose or xylose, suffering oxidative stress in xylose fermentation. This stress increases the carbon demand, making the growth and fumaric acid production more difficult [57].

The pulp and paper industry is the most important industry based on lignocellulosic materials; it produces an enormous amount of lignocellulosic wastes (11 million tons in the European Union [58]). After proper treatment, submerged fermentation has been studied, obtaining $23.47 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ with an optimum particle size [59]. Solid state fermentation has been performed too, directly over the solid waste, reaching 41.65 g of fumaric acid per kg of dry solid; electronic microscopy revealed proper fungal growth interacting with the solid [59].

Lignocellulosic raw materials must be pretreated for their use in submerged fermentation processes, but solid-state fermentation does not need those pretreatments; nevertheless, there is another possibility: simultaneous saccharification and fermentation processes (SSF). These processes reach higher yields than separate saccharification and fermentation processes (SHF); using corncob previously hydrolyzed and *R. oryzae*, simultaneous saccharification and fermentation improves biotechnological fumaric acid production (up to $41.32 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), compared to separate saccharification and fermentation ($19.13 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) [60].

Another way to use xylose as a carbon source from lignocellulosic materials involves the use of microorganisms other than *Rhizopus* species, such as *Aspergillus* species [33,61], which are known to be optimal itaconic acid producers and can produce fumaric acid too, optimizing the culture conditions, as itaconic acid is a secondary metabolite, while fumaric acid is a primary one [61].

4.3.2. Glycerol

Glycerol is the main by-product from the biodiesel production process: 10% of oil biomass turns into glycerol, which is considered a C3 building block in the biorefinery framework. Due to the great growth of the biodiesel industry in recent years, the production of glycerol has increased exponentially, being regarded as a waste in the absence of an adequate local-regional market [62].

Pure glycerol is a very useful raw material for several industries such as cosmetics or automotive industries. However, glycerol obtained from first-generation and the most common biodiesel industry is crude glycerol, with a low triol concentration, so it has to be purified to be useful for industrial purposes. Therefore, crude glycerol could become a waste to be disposed of, as its purification can be economically unfeasible depending on local/regional needs [62].

Due to the high costs of the crude glycerol purification process, the idea of using it as raw material in a biotechnological process seems appealing. It can be transformed by several bioprocesses to high and medium added-value products, such as fumaric or succinic acids, or diols.

Glycerol, however, is not a suitable carbon source for all microorganisms [63], and even microorganisms that use glycerol could need the addition of another carbon source, so co-fermentation processes with glycerol as a supplement have been studied [62].

Using *R. arrhizus* RH-07-13, which is a well-known fumaric acid producer able to consume glycerol, the production of fumaric acid in a co-fermentation process combining glucose and crude glycerol yielded $22.81 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of the acid, increasing the productivity in comparison to using only crude glycerol. In this case, a better conformation in smaller pellets was achieved using crude glycerol [62].

However, co-fermentation using crude glycerol provides a lower productivity of fumaric acid compared with only glucose fermentation, but the use of crude glycerol derived from the biodiesel industry increases the cost-effectiveness of the process and contributes to solve the problem of the treatment of crude glycerol as a waste [62].

As stated above, not all microorganism are able to consume glycerol. For this reason, some studies have used genetic engineering to solve this problem. Modifying a well-known succinic acid producer from a glycerol *E. coli* strain by deleting three fumarases, fumaric acid production was achieved, obtaining acetate as the main by-product. This acetate production was minimized by overexpressing PEP carboxylase, finally obtaining $41.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of fumaric acid in a fed-batch process [64].

Fungal species such as *R. oryzae*, an optimum fumaric acid producer, could be modified to use glycerol as a carbon source through adaptive evolution, obtaining the G80 strain, where novel mechanisms for fumaric acid overproduction from glycerol have been observed [63]. In this work, up to $25.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of the acid was obtained in an optimized fed-batch process.

4.3.3. Apple Wastes

The apple juice and cider industry produces about 12 MM tons of residues per year [65] in the typical apple juice making process, pressing the apples and later separation of liquid from solids; these solids are the apple pomace, which represents between 20% and 35% of the fruit weight. After the pressing stage, the juice must be clarified and, in this stage, another important waste in juice industry, apple pomace ultrafiltration sludge, is produced [66].

Apple pomace and apple pomace ultrafiltration sludge are ideal raw materials for the fermentation process, due to their high sugar content and the fact that they are wastes of the juice industry, so the raw material cost is reduced.

To develop a typical submerged fermentation process, apple pomace ultrafiltration sludge has been used with *R. oryzae* 1526. By optimizing the fermentation conditions and manipulating the content in sugars and solids in apple pomace ultrafiltration sludge, $25.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of fumaric acid was produced; the morphology was also optimized to use small pellets that reached the highest productivity [66].

On the other hand, direct use of apple pomace requires a process of solid state fermentation, carried out in plastic trays, obtained with *R. oryzae* 1526, after 14 days of fermentation; 52 g of acid per kg of solid was used. Through electron microscopy analysis, it was observed that the fungus utilized the apple pomace to drive its hyphal growth [66].

4.3.4. Brewery Wastewater

The brewing industry could be described as a high pollutant industry according to its water consumption, using between 4 and 7 L of water for each liter of beer produced. After the brewing process, all this used water must be biologically treated to reduce its high organic content, due to spent hops, yeasts and grains. This decontamination process causes great costs to breweries [67].

These brewery wastewaters have been used as substrates of a submerged fermentation process. With *R. oryzae* 1526 as a biocatalyst and appropriate fermentation conditions, $31.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ were obtained, which indicates that brewery wastewaters are a promising and cheap raw material for fumaric acid production [67].

4.3.5. Food Wastes

The high production of urban residues and trash is a real problem in our society. All this trash must be disposed of and kept safely in dumps, which represent an environmental risk, mainly due to the increasing amount of trash produced. According to the FAO, and including food residues that were mentioned previously, such as apple pomace (very rich in free glucose and fructose), and other fruit residues (like citric waste), up to 1.3 MM tons of food waste is dumped every year, i.e., 1/3 of all food produced [68].

One important fraction of trash is food waste, this fraction could be solid or liquid, and has a high content of water, proteins and carbohydrates. Its use as a substrate in fermentation processes, submerged or solid state, represents a promising advancement in urban waste treatment [60,69].

Adopting the proper treatment to improve food wastes as raw material and using *R. arrhizus* RH-07–13, 32.68 g·L⁻¹ were achieved from the liquid fraction of food wastes, with a higher yield than that obtained from glucose [69].

However, solid-state fermentation does not provide results as good as those from the liquid fraction (submerged fermentations). The solid food waste fraction requires complementation with glucose to obtain an adequate fermentation process, yielding 31.65 g·L⁻¹ of fumaric acid. This fact indicates that the solid fraction is suitable as a nitrogen and micronutrient source but not as a complex substrate; on the other hand, the liquid fraction is a perfect raw material to develop the fumaric acid production process [69].

5. Bioreactors

While the most usual bioreactor for fumaric acid production is the batch bioreactor (results presented in Tables 1 and 2), some results, in Table 3, are presented for other configurations: bubble reactors, biofilm bioreactors, fluidized beds and fixed beds for immobilized microorganisms. Productivities of batch reactors are in the range of 0.18–0.7 g L⁻¹ h⁻¹, with titers up to 121 g L⁻¹, and similar values are reached for other bioreactors. Coupling separation operations to bioreactors results in an enormous enhancement in productivity, i.e., 4.25 g L⁻¹ h⁻¹.

Considering the raw material, glucose renders the best results in terms of productivity, yield and titer, but glycerol, xylose and hydrolyzed molasses also lead to promising results.

5.1. Stirred Tanks

Stirred tanks are widely used in research and industry due to their ease of control and handling during operation and the fact that they have low operation costs at the industrial scale, providing the process with great capacity and reliability [70].

The laboratory studies carried out with this kind of bioreactor have used volumes between 2 and 7 L, using glucose as a main substrate for *Rhizopus* species. When working with medium to high viscosity broths, Rushton turbines permit an adequate agitation and mixing that result in an enhanced oxygen mass transfer that is key to the production of chemicals by fungi. In the case of fumaric acid, high concentrations of oxygen in the broth yield high titers of the acid, but low productivities, while the situation is the inverse at low DO values. A combination of high and low DO, in this order, permits high titers of fumaric acid and high glucose conversions [71].

Concentrations and yields reached are not very remarkable (30–40 g·L⁻¹), which shows slow production rates and a high substrate consumption for production [42]. The most important research using this type of bioreactor is a Dupont patent where 121 g·L⁻¹ were produced, achieving promising yields to develop an industrial process that is economically profitable [72].

5.2. Bubble Column

Bubble column reactors can enhance the oxygen supply to the biomass and can reach a very good agitation rate, optimizing the air flow. In these reactors, a high air flow results in high gas phase hold-up and enhance oxygen mass transfer, with small gas bubbles being mixed with the liquid phase by bigger and helicoidally moving bubbles. Under these conditions, for fixed gas phase speeds, bubble columns (and airlift bioreactors) yield higher titers and productivities of fumaric acid than in stirred batch reactors [21].

With a 10-L bubble column containing *R. oryzae*, lower initial concentrations of glucose were required to reach very similar results as obtained in a stirrer tank reactor, improving the yield of the process and even doubling the productivity [73].

These results suggest that, with optimal morphology, agitation and oxygen supply are very important conditions to be optimized to develop a suitable industrial production process.

5.3. Immobilized Biomass

Filamentous fungi are known to be the best fumaric acid producers, mainly *Rhizopus* species. However, fungal growth presents many operational problems, such as obtaining an appropriate morphology or having high viscosity in the medium due to the development of the mycelium.

To avoid these operational problems, immobilized biomass reactors are a good solution because immobilization provides a very permanent morphology, protects microorganisms from pH or product inhibition, helps to purify final products, and enables production for longer periods of time [74].

5.3.1. Stirred Tank with Immobilized Biomass

The simplest use of immobilized biomass is suspending the particles in a stirrer-tank reactor (slurry reactor). In this process, many natural solids used as supports where the immobilization of microorganisms has been studied, for example, eggshell [75] or loofah fiber [70]. Some synthetic supports have been tried as well: plastic or metal nets [76].

Table 1. Main results in batch (tank) bioreactors with overhead impellers.

Raw Material	Species	Broth Composition (ref)	Operational Conditions	Main Results
Glucose	<i>Rhizopus arrhizus</i>	130 g·L ⁻¹ glucose 80 g·L ⁻¹ Ca ²⁺ 1.8 g·L ⁻¹ NH ₄ ⁺ 0.3 g·L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 0.4 g·L ⁻¹ MgSO ₄ ·7 H ₂ O 0.044 g·L ⁻¹ ZnSO ₄ ·7 H ₂ O 0.0075 g·L ⁻¹ FeCl ₃ ·6 H ₂ O	Strain NRRL 1526 Changes in stirring speed V = 3 L T = 34 °C N = 200–800 rpm pH = 5–7 Q _{air} = 0.5 L·L ⁻¹ ·min ⁻¹ t = 6 day	Titer = 121 g·L ⁻¹ Productivity = 1.02 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ Yield = 0.37 g _{prod} ·g _{sust} ⁻¹ Reference [72]
		Several C/N ratios (140–200 gC·gN ⁻¹) 130 g·L ⁻¹ glucose 0.4 g·L ⁻¹ Yeast extract 0.4 g·L ⁻¹ MgSO ₄ ·7 H ₂ O 0.044 g·L ⁻¹ ZnSO ₄ ·7 H ₂ O 0.01 g·L ⁻¹ Fe tartrate 100 g·L ⁻¹ CaCO ₃ 15 mL CH ₃ OH 0.5 mL corn oil	Strain NRRL 1526 Phosphorus stress V = 3 L T = 32 °C N = 800 rpm pH = 5.5 Q _{air} = 1 L·L ⁻¹ ·min ⁻¹ t = 6–10 day	Titer = 40 g·L ⁻¹ Productivity = 0.46 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ Yield = 0.33 g _{prod} ·g _{sust} ⁻¹ Reference [48]
	<i>Rhizopus oryzae</i>	10% glucose 0.1% KH ₂ PO ₄ 0.05% MgSO ₄ ·7 H ₂ O 0.002% ZnSO ₄ ·7 H ₂ O 2.0% CaCO ₃ 0.5% corn steep liquor Varied nitrogen source	Strain RUR709 V = 5 L T = 35 °C N = 400 rpm Q _{air} = 1 L·L ⁻¹ ·min ⁻¹ t = 4 day	Titer = 32.1 g·L ⁻¹ Productivity = 0.32 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ Yield = 0.45 g _{prod} ·g _{sust} ⁻¹ Reference [35]
		<i>Rhizopus oryzae</i>	100 g·L ⁻¹ glucose 0.2 g·L ⁻¹ urea 0.6 g·L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 0.5 g·L ⁻¹ MgSO ₄ ·7 H ₂ O 0.11 g·L ⁻¹ ZnSO ₄ ·7 H ₂ O 0.0088 g·L ⁻¹ FeSO ₄ ·7 H ₂ O 50 g·L ⁻¹ CaCO ₃	Strain ME-F01 GMO (ME-UN-8) V = 5 L T = 35 °C N = 400 rpm pH = 5.5 Q _{air} = 0.5 L·L ⁻¹ ·min ⁻¹ t = 4 day
	100 g·L ⁻¹ glucose 2.0 g·L ⁻¹ urea 0.6 g·L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 0.5 g·L ⁻¹ MgSO ₄ ·7 H ₂ O 0.11 g·L ⁻¹ ZnSO ₄ ·7 H ₂ O 0.0088 g·L ⁻¹ FeSO ₄ ·7 H ₂ O 50 g·L ⁻¹ CaCO ₃		Strain ME-F12 Oxygen control (stage 1: 80% OD; stage 2: 30% OD) V = 7 L T = 35 °C t = 5 day	Titer = 56.2 g·L ⁻¹ Productivity = 0.7 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ Yield = 0.54 g _{prod} ·g _{sust} ⁻¹ Reference [71]

Table 1. Cont.

Glucose	<i>Rhizopus oryzae</i>	10 g·L ⁻¹ glucose 2.0 g·L ⁻¹ Urea 0.6 g·L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 0.25 g·L ⁻¹ MgSO ₄ ·7 H ₂ O 0.088 g·L ⁻¹ FeSO ₄ ·7 H ₂ O	Strain ATCC 20344 O ₂ and pH control V = 2 L T = 35 °C N = 600 rpm pH = 2.8–6.3 (pH ₀ = 3.2) Q _{air} = 0.5 L·L ⁻¹ ·min ⁻¹ t = 7 day	Titer = 30.2 g·L ⁻¹ Productivity = 0.18 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ Yield = 0.28 g _{prod} ·g _{sust} ⁻¹ Reference [21]
Manure	<i>Rhizopus oryzae</i>	100 g·L ⁻¹ glucose 0.6 g·L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 0.25 g·L ⁻¹ MgSO ₄ ·7 H ₂ O 0.088 g·L ⁻¹ ZnSO ₄ ·7 H ₂ O Fiber hydrolases	Strain ATCC 20344 pH control V = 1 L T = 30 °C N = 200 rpm pH = 5 Q _{air} = 1 L·L ⁻¹ ·min ⁻¹ t = 4 day	Titer = 31 g·L ⁻¹ Productivity = 0.31 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ Yield = 0.31 g _{prod} ·g _{sust} ⁻¹ Reference [78]

Table 2. Main results in batch shaken flasks (orbital stirring).

Raw Material	Species	Broth Composition	Operational Conditions	Main Results
Glucose	<i>Rhizopus nigricans</i>	50 g·L ⁻¹ glucose 2.0 g·L ⁻¹ (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5 g·L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 0.5 g·L ⁻¹ MgSO ₄ ·7 H ₂ O 0.01 g·L ⁻¹ CaCl ₂ 0.01 g·L ⁻¹ Fe ₂ (SO ₄) ₃	Strain 45 Isocitrate lyase extraction V = 0.25 L T = 28 °C pH = 7.0 t = 3.5 day	Titer = 20 g·L ⁻¹ Productivity = 0.25 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ Yield = 0.66 g _{prod} ·g _{sust} ⁻¹ Reference [79]
Glycerol	<i>Rhizopus arrhizus</i>	0–40 g·L ⁻¹ glucose 40–80 g·L ⁻¹ glycerol 0.3 g·L ⁻¹ peptone 1.55 g·L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 1.0 g·L ⁻¹ MgSO ₄ ·7 H ₂ O 0.0176 g·L ⁻¹ ZnSO ₄ ·7 H ₂ O 0.0005 g·L ⁻¹ FeSO ₄ ·7 H ₂ O 50 g·L ⁻¹ CaCO ₃	Strain RH-07-13 Crude glycerol alone (80 g·L ⁻¹) or Crude glycerol-glucose mixture (40 g·L ⁻¹ each) V = 0.25 L T = 30 °C N = 200 rpm pH = 5.5 t = 8 day	Titer = 22.8 g·L ⁻¹ Productivity = 0.16 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ Yield = 0.35 g _{prod} ·g _{sust} ⁻¹ Reference [62]
Hydrolyzed molasses	<i>Rhizopus oryzae</i>	107.1 g·L ⁻¹ sucrose 69.6 g·L ⁻¹ CaCO ₃ 1.34 g·L ⁻¹ (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.26 g·L ⁻¹ MgSO ₄ ·7 H ₂ O 0.53 g·L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 0.042 g·L ⁻¹ ZnSO ₄ ·7 H ₂ O 0.086 g·L ⁻¹ Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·H ₂ O 0.01 g·L ⁻¹ MnSO ₄ ·H ₂ O 0–150 mg·L ⁻¹ NiCl ₂ ·H ₂ O	Invertase for hydrolysis Ni ²⁺ effects T = 28 °C T = 6 day	Titer = 68 g·L ⁻¹ Productivity = 0.48 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ Yield = 0.64 g _{prod} ·g _{sust} ⁻¹ Reference [80]
Corn stover	<i>Rhizopus oryzae</i>	80 g·L ⁻¹ glu or xyl 0.2 g·L ⁻¹ urea 0.6 g·L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 0.5 g·L ⁻¹ MgSO ₄ ·7 H ₂ O 0.11 g·L ⁻¹ ZnSO ₄ ·7 H ₂ O 0.0088 g·L ⁻¹ FeSO ₄ ·7 H ₂ O 50 g·L ⁻¹ CaCO ₃	Strain ATC 20344 Diluted H ₂ SO ₄ acid CS pretreatment: Liquid phase rich in xylose Enzymatic Hydrolysis: Liquid phase rich in glucose V = 0.25 L T = 35 °C N = 200 rpm pH = 3.0 (pH ₀ = 4.0) t = 3.5–4.5 day	Titer = 27.79 g·L ⁻¹ Productivity = 0.33 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ Yield = 0.35 g _{prod} ·g _{sust} ⁻¹ Reference [81]
Xylose	<i>Rhizopus arrhizus</i>	80–100 g·L ⁻¹ xylose 0.4 g·L ⁻¹ urea 0.6 g·L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 0.5 g·L ⁻¹ MgSO ₄ ·7 H ₂ O 0.0018 g·L ⁻¹ ZnSO ₄ ·7 H ₂ O 0.0005 g·L ⁻¹ FeSO ₄ ·7 H ₂ O 45 g·L ⁻¹ CaCO ₃	Strain RH-07-13 GMO Adapted to several xylose concentrations (50–100 g·L ⁻¹) V = 0.25 L T = 32 °C N = 220 rpm pH = 5.5 t = 7 day	Titer = 38.48 g·L ⁻¹ Productivity = 0.23 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ Yield = 0.43 g _{prod} ·g _{sust} ⁻¹ Reference [40]

Table 2. Cont.

Hydrolyzed yucca bagasse and potato residue	<i>Rhizopus formosa</i>	Weight ratio 80:20 yucca bagasse: potato waste Weight C/N: 168 (C = cassava bagasse; N = KNO ₃) 0.15 g·L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 0.25 g·L ⁻¹ MgSO ₄ ·7 H ₂ O 0.04 g·L ⁻¹ ZnSO ₄ ·7 H ₂ O 20 g·L ⁻¹ CaCO ₃ 10 g·L ⁻¹ biotin 15 mL·L ⁻¹ CH ₃ OH	Strain MUCL 28422 Two stage raw material enzymatic hydrolysis T = 32 °C N = 200 rpm pH = 6.5	Titer = 21.28 g·L ⁻¹ Yield = 0.23 g _{prod} ·g _{sust} ⁻¹ Reference [38]
---	-------------------------	---	--	--

Table 3. Main results in batch special reactors.

Raw Material	Species	Broth Composition	Reactor Type and Operational Conditions	Main Results
Glucose	<i>Rhizopus oryzae</i>	95 g·L ⁻¹ glucose 0.3 g·L ⁻¹ urea 0.1 g·L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 0.05 g·L ⁻¹ MgSO ₄ ·7 H ₂ O 0.01 g·L ⁻¹ ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	Bubble column Strain ATCC 20344 Effects of basic agents (CaCO ₃ , Ca(OH) ₂ and NaHCO ₃) V = 10 L T = 32 °C pH = 5.5 Q _{air} = 1.5 L·L ⁻¹ ·min ⁻¹ t = 1.5 day	Titer = 37.2 g·L ⁻¹ Productivity = 1.03 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ Yield = 0.53 g _{prod} ·g _{sust} ⁻¹ Reference [73]
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	80 g·L ⁻¹ glucose 0.044 g·L ⁻¹ urea 0.6 g·L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 0.5 g·L ⁻¹ MgSO ₄ ·7 H ₂ O 0.002 g·L ⁻¹ ZnSO ₄ ·7 H ₂ O 60 g CaCO ₃ 6 mL soybean oil	Batch slurry reactor GMO strain RH-7-139# Effects of support (stainless steel, loofah fiber, sponge) V = 5 L, 5 g L ⁻¹ support T = 30 °C Q _{air} = 2.0 L·L ⁻¹ ·min ⁻¹ N = 300–500 rpm t = 120 h	Best N = 400 rpm Titer = 30.3 g·L ⁻¹ Productivity = 0.63 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ Yield = 0.211 g _{prod} ·g _{sust} ⁻¹ Reference [70]
Hydrolyzed molasses	<i>Rhizopus oryzae</i>	100 g·L ⁻¹ glucose 2.0 g·L ⁻¹ urea 0.6 g·L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 0.25 g·L ⁻¹ MgSO ₄ ·7 H ₂ O 0.088 g·L ⁻¹ ZnSO ₄ ·7 H ₂ O Base CaCO ₃	Rotating biofilm reactor Strain ATCC 20344 Compares RBC with batch reactor V = 2 L Biodisc surface: 750 cm ² T = 35 °C pH = 5 Q _{air} = 1.0 L·L ⁻¹ ·min ⁻¹ t = 20 h	Titer = 85.0 g·L ⁻¹ Productivity = 4.25 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ Theoretical yield = 0.91 g _{prod} ·g _{sust} ⁻¹ Reference [74]
Corn stover	<i>Rhizopus arrhizus</i>	50 g·L ⁻¹ glucose molasses 0.25 g·L ⁻¹ (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.4 g·L ⁻¹ yeast extract 0.45 g·L ⁻¹ corn oil 0.3 g·L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 0.4 g·L ⁻¹ MgSO ₄ ·7 H ₂ O 0.044 g·L ⁻¹ ZnSO ₄ ·7 H ₂ O 0.01 g·L ⁻¹ Fe tartrate	Fluidized bed reactor Strain NRRL 1526 Polyurethane immobilized microorganisms V = 0.25 L T = 32 °C pH = 6.0 Q _{air} = 3.0 L·L ⁻¹ ·min ⁻¹ t = 1–3 day	Titer = 17.5 g·L ⁻¹ Productivity = 0.36 g·L ⁻¹ ·h ⁻¹ Yield = 0.36 g _{prod} ·g _{sust} ⁻¹ Reference [77]

Using loofah fiber as a support, promising yields (0.21 g of fumaric acid per gram of glucose) and concentrations (30.3 g·L⁻¹ in the broth) were obtained, proving the potential use of loofah fiber to immobilize biomass in the fermentative fumaric acid production process [70].

5.3.2. Rotary Biofilm Contactor

The rotary biofilm contactor (RBC) or biodisc reactor is widely used in wastewater treatments due to its advantages such as a low required operation volume or its handling as a series of perfectly-stirred tank reactors. The immobilization is carried out by inoculating spores on the discs: a biofilm with a thickness smaller than 2 mm is developed. These bioreactors need a low turning speed to have a better contact between the biomass and the medium. High productivity rates have been achieved using a 2-L biodisc reactor coupled to an anion-exchange adsorption column that liberated hydroxyl ions, maintaining the pH at 4.5, thus avoiding high concentrations of byproducts due to metabolic switching. High productivities (4.25 g·L⁻¹·h⁻¹) and titers (85 g·L⁻¹) were obtained due to the combination

of production and adsorption (reactive adsorption), suggesting that fumaric acid inhibits its own production, and pH control is key to reach the best possible results [21,74].

5.3.3. Fluidized Bed

Using small polymer particles as support for the immobilization, fluidized beds could be used. This kind of reactor is very useful in catalytic industrial processes and in the oil & gas industry where is widely employed. However, the fluidized bed has proven as not very suitable for biotechnological processes, as low yields (35.56%) and final concentrations (12.3 g·L⁻¹) are obtained at very high operational costs [77].

In Tables 1–3, the run operations in several bioreactors are described, indicating operational conditions, broth composition, and main results (regarding acid titer, productivity and yield of substrate for this product). In Figure 4, schemes of the most promising bioreactors are shown.

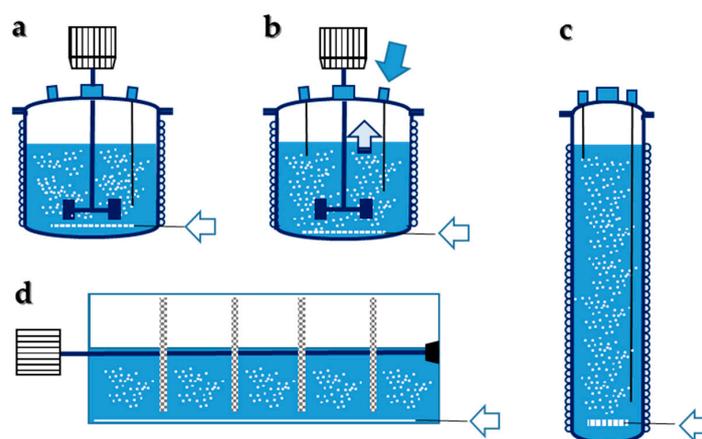


Figure 4. Different types of bioreactors for fumaric acid production: (a) Stirred tank -batch operation; (b) Stirred tank-fed-batch operation; (c) bubble-column reactor; (d) Rotary biofilm contactor.

5.4. Comparison

Different reactor types have been compared according to performance and cost effectiveness criteria; all types have been compared using the stirrer-tank reactor as a reference: (+) means a better result than the stirrer-tank reactor, (–) means a worse result and (=) means a similar result. In Tables 2–4, the run operations in several bioreactors are described, indicating operational conditions, medium composition, and main results (regarding acid titer, productivity and yield of substrate for this product).

Table 4. Reactors for fumaric acid bio-production as compared to the classical batch reactor: strengths and weaknesses.

Reactor	Final Concentration	Productivity	Yield	Production Costs
Bubble column	=	++	+	=
Biodisc	++	++++	++	–
Fluidized bed	–	–	=	–

As seen in the table, the best results are obtained when operating a stirrer-tank reactor, with or without immobilized biomass, and biodisc reactors, highlighting the results and procedures obtained from the Dupont patent, in terms of final concentration, and the results of the Rotating Disc Contactor (RDC) in terms of productivity.

When choosing the best possible reactor, one of the greatest problems, as stated before, is the high increase of the medium viscosity, which requires a great amount of energy to maintain correct homogenization and high mass transfer rates inside the reactor.

The reactors most adequate for this task at a lower energy input will probably have no direct mechanical agitation by impellers. Bubble columns, air lifts and fluidized beds, where a very acceptable turbulence level is provided, could permit an optimal control of viscosity and oxygen concentrations. To reduce the energy input even more, a good reactor is the rotary biodisc contactor (RBC), which provides an acceptable agitation level, a good gas-solid mass transfer, ensuring adequate oxygenation of the biomass, and a fast liquid-solid mass transfer.

Direct mechanical agitation not only involves high energy inputs but also high shear stress at the tips of the impellers (usually, Rushton turbines) commonly implemented in industrial bioreactors. This high shear stress results in hydrodynamic stress that is most deleterious to biomass integrity. Again, the absence of impellers and agitation by bubbles reduce this mechanical stress to the cells. This is also correct in the case of immobilizing the biomass on the disc of the RBC. In both cases, it is possible to keep an optimal metabolic stage of the biomass.

Immobilized biomass has also several advantages like the separation between biomass and the medium, avoiding possible inhibitions and controlling the metabolic state of the biomass that can be altered to reach better yields by choosing the appropriate immobilization method, support and conditions.

To sum up, rotary biodisc contactors are very promising reactors to host fumaric acid production process using filamentous fungi because of their characteristics related to immobilization and low energetic requirements, opening the door for reaching high yields with an adequate selectivity and thus reducing the presence of by-products. Productivities can also be dramatically enhanced by coupling the fermentation process in RBC with separation processes like adsorption on ion-exchange resins. In particular, a wise use of processing time is most relevant to biorefinery processes, and high productivities are sought, reaching, for example, more than $22 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for the case of lactic acid [82] and *circa* $3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for succinic acid [83]. Using productivity as the most relevant technical variable in a biorefinery process of this kind, RBC combined with adsorption results in a comparable productivity of $4.25 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, which compares well to the cases of lactic acid and succinic acid, rendering this fermentative process to fumaric acid the best one reported until now, with a productivity that is ten times higher than the average batch productivity [74]. The main variables and values of this process are presented in bold in Table 3.

6. Downstream Processing: Fumaric Acid Purification

After the production of fumaric acid in bioprocesses, its low solubility in water and its high polarity can be employed to separate it from other acids, salts, remaining carbohydrates and nitrogen compounds. The traditional purification process is quite complex and involves high operational costs (acidification, heating, filtration, drying) [11,21,84].

Extraction with amines, such as tridodecylamine (TDA), in the presence of ketones as diluents, provides a simple means for fumaric acid purification from watery broths, with maximum extraction productivities around 96% [85]. Low solubility of the acid permits its precipitation from the broth followed by a further polishing using adsorption with active carbon to yield a polymer-grade monomer [86]. In fact, adsorption can be applied to separate the acid from the broth, and, afterwards, acetone can desorb it with a high recovery yield (93%), while a subsequent water sweeping could enhance its purity to 98% [84]. This adsorption can be also performed using ion-exchange resins, like IRA-900; in fact, the use of intermittent in-situ removal of the acid from the broth coupling the bioprocess with the separation unit allowed for a 25% increase in fumaric acid yield and an even higher increase in productivity, as the acid is an inhibitor of its own production by fungi [87]. This mixing of operations in one operation unit (hybrid operation) to enhance final productivities and yields is commonly performed in the industry. In the case of fumaric acid, some more examples can be

encountered: for example, the reactive extraction of the acid with non-toxic solvents, with extraction efficiencies in excess of 92% [88], or the combination of membrane technologies, nanofiltration and bipolar electrodialysis, with reactive extraction, with a 90% efficiency [89]. In some cases, the separation of fumaric acid from other by-products, like acetic acid, presents a notable difficulty, and complex chromatographic techniques involving ion-exchange resins in simulated moving-beds schemes have been developed for the task, attaining high purity (99%) and recovery (99%) of the target acid [90].

7. Conclusions and Future Prospects

Nowadays, fossil resources, though impressive in mass even currently, are envisaged as non-sustainable due to them being non-renewable, their impending reduction in terms of mass and accessibility, and the pollution derived from their massive utilization. In this framework, biorefineries are conceptually considered as refineries whose resource is biomass, a renewable and accessible raw material whose variety reduces energy and resource dependence. Chemicals from biomass, as succinic or fumaric acid, are thus, platform chemicals that have the potential to complement and even replace petrochemicals as monomers in the polymer industry. However, although succinic acid is now known to have an adequate price (1.17 \$/kg) in comparison to its petrochemical counterpart (2.86 \$/kg) for the Myriant process [91], fumaric acid is only produced at the present time from benzene or from butanes. Using as reference the lonely LCA analysis performed for succinic acid and, in particular, for Myriant's process, it can be envisaged that bioprocesses to fumaric acid will be, in the worst scenario, as sustainable as the process of the reference is, with a worse use of raw materials (if compared to the petrochemical counterparts), but a much better use of energy and a high reduction in the global warming potential (GWP). By the end of the last century, costs for bio-based fumaric acid, even in the best case, almost doubled costs of fumaric acid obtained from benzene [92]. It is probable that the optimization of the rotary biofilm contactor coupled to adsorption, which quadruplicates productivity of the batch operation in stirred tanks, reaching equal or higher fumaric acid titer, should result in a notable reduction in operational costs. Further improvement of this process could result in operating adsorption under a simulated moving bed mode. Though CaCO_3 is known to enhance fumaric acid productivity, hybrid operation and the use of Na_2CO_3 should result in a process that resembles that of succinic acid, with low-cost fumaric acid as the end product.

Author Contributions: V.E.S. and M.L. thought on the general content of the review, retrieve and read the first references and wrote the general scheme. J.E. and F.d.B.O. wrote a first version of the review, V.M.-D. and M.L. added further contents and graphs, wrote the second version for publication and performed the needed changes during the revision process. All authors read and agree to the final revised version of the review.

Acknowledgments: This work was funded by MICINN under contracts CTQ-2013-45970-C2-1-R and PCIN-2013-021-C02-01.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the interpretation of literature; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

References

1. Safdel, M.; Anbaz, M.A.; Daryasafar, A.; Jamialahmadi, M. Microbial enhanced oil recovery, a critical review on worldwide implemented field trials in different countries. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2017**, *74*, 159–172. [[CrossRef](#)]
2. Sun, X.; Zhang, Y.; Chen, G.; Gai, Z. Application of Nanoparticles in Enhanced Oil Recovery: A Critical Review of Recent Progress. *Energies* **2017**, *10*, 345. [[CrossRef](#)]
3. Jacobson, M.Z.; Delucchi, M.A.; Bauer, Z.A.F.; Goodman, S.C.; Chapman, W.E.; Cameron, M.A.; Bozonnat, C.; Chobadi, L.; Clonts, H.A.; Enevoldsen, P.; et al. 100% Clean and Renewable Wind, Water, and Sunlight All-Sector Energy Roadmaps for 139 Countries of the World. *Joule* **2017**, *1*, 108–121. [[CrossRef](#)]
4. Manevski, K.; Lærke, P.E.; Jiao, X.; Santhome, S.; Jørgensen, U. Biomass productivity and radiation utilisation of innovative cropping systems for biorefinery. *Agric. For. Meteorol.* **2017**, *233*, 250–264. [[CrossRef](#)]

5. Corona, A.; Ambye-Jensen, M.; Vega, G.C.; Hauschild, M.Z.; Birkved, M. Techno-environmental assessment of the green biorefinery concept: Combining process simulation and life cycle assessment at an early design stage. *Sci. Total Environ.* **2018**, *635*, 100–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. El-Halwagi, M.M. *Sustainable Design Through Process Integration: Fundamentals and Applications to Industrial Pollution Prevention, Resource Conservation, and Profitability Enhancement*; Butterworth-Heinemann: Oxford, UK, 2017.
7. Choi, S.; Song, C.W.; Shin, J.H.; Lee, S.Y. Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives. *Metab. Eng.* **2015**, *28*, 223–239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Mohsenzadeh, A.; Zamani, A.; Taherzadeh, M.J. Bioethylene Production from Ethanol: A Review and Techno-economical Evaluation. *ChemBioEng Rev.* **2017**, *4*, 75–91. [[CrossRef](#)]
9. Lidén, G. Carboxylic Acid Production. *Fermentation* **2017**, *3*, 46. [[CrossRef](#)]
10. Straathof, A.J.J. Transformation of Biomass into Commodity Chemicals Using Enzymes or Cells. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 1871–1908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Das, R.K.; Brar, S.K.; Verma, M. Chapter 8—Fumaric acid: Production and application aspects. In *Platform Chemical Biorefinery*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 133–157. [[CrossRef](#)]
12. The National Institute of Standards and Technology (NIST). Fumaric Acid Properties. Available online: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=110-17-8> (accessed on 5 March 2018).
13. Insight, R. Fumaric Acid Market Size, Price Trends, Research Report 2020. Available online: <https://www.radiantinsights.com/research/fumaric-acid-market> (accessed on 5 March 2018).
14. Markit, I. Fumaric Acid: Chemical Economics Handbook. Available online: <https://ihsmarkit.com/products/fumaric-acid-chemical-economics-handbook.html> (accessed on 5 March 2018).
15. Research, G.V. Malic Acid Market Size, Share, Trend Analysis Report By End-use (Beverage, Confectionery, Personal Care & Cosmetics), By Region, Competitive Landscape, and Segment Forecasts, 2018–2024. Available online: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/malic-acid-market> (accessed on 5 March 2018).
16. Research, G.V. Aspartic Acid Market Analysis by Application (Feed Supplements, Medicine, Polyaspartic Acid, Aspartame, L-Alanine) and Segment Forecasts to 2022. Available online: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/aspartic-acid-market> (accessed on 5 March 2018).
17. Farmer, T.; Castle, R.; Clark, J.; Macquarrie, D. Synthesis of Unsaturated Polyester Resins from Various Bio-Derived Platform Molecules. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 14912–14932. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Diez-Pascual, A. Tissue Engineering Bionanocomposites Based on Poly(propylene fumarate). *Polymers* **2017**, *9*, 260. [[CrossRef](#)]
19. Khan, I.; Ullah, S.; Oh, D.-H. Chitosan grafted monomethyl fumaric acid as a potential food preservative. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *152*, 87–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Wang, L.; Guo, D.-G. Preparation and Performance of Poly(butyl fumarate)-Based Material for Potential Application in LED Encapsulation. *Materials* **2017**, *10*, 149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Roa Engel, C.A.; Straathof, A.J.J.; Zijlmans, T.W.; van Gulik, W.M.; van der Wielen, L.A.M. Fumaric acid production by fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *78*, 379–389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kamra, D. Production of Methane by the Livestock and its Mitigation Techniques. *Agric. Clim. Chang. Threats Strateg. Polic.* **2017**, *1*, 261.
23. Li, Z.; Liu, N.; Cao, Y.; Jin, C.; Li, F.; Cai, C.; Yao, J. Effects of fumaric acid supplementation on methane production and rumen fermentation in goats fed diets varying in forage and concentrate particle size. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2018**, *9*, 21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Das, R.K.; Brar, S.K.; Verma, M. Recent advances in the biomedical applications of fumaric acid and its ester derivatives: The multifaceted alternative therapeutics. *Pharmacol. Rep.* **2016**, *68*, 404–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Smith, D. Fumaric acid esters for psoriasis: A systematic review. *Ir. J. Med. Sci.* **2017**, *186*, 161–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Cavani, F.; Luciani, S.; Esposti, E.D.; Cortelli, C.; Leanza, R. Surface Dynamics of A Vanadyl Pyrophosphate Catalyst for n-Butane Oxidation to Maleic Anhydride: An In Situ Raman and Reactivity Study of the Effect of the P/V Atomic Ratio. *Chem. A Eur. J.* **2010**, *16*, 1646–1655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Chen, C.-T.; Liao, J.C. Frontiers in microbial 1-butanol and isobutanol production. *FEMS Microbiol. Lett.* **2016**, *363*, fnw020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Pavarelli, G.; Ochoa, J.V.; Caldarelli, A.; Puzzo, F.; Cavani, F.; Dubois, J.-L. A New Process for Maleic Anhydride Synthesis from a Renewable Building Block: The Gas-Phase Oxidehydration of Bio-1-butanol. *ChemSusChem* **2015**, *8*, 2250–2259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Kato, Y.; Yamagishi, J.; Asano, Y. Maleate *cis-trans* isomerase from *Arthrobacter* sp. TPU 5446. *J. Ferment. Bioeng.* **1995**, *80*, 610–612. [[CrossRef](#)]
30. Ichikawa, S.; Iino, T.; Sato, S.; Nakahara, T.; Mukataka, S. Improvement of production rate and yield of fumaric acid from maleic acid by heat treatment of *Pseudomonas alcaligenes* strain XD-1. *Biochem. Eng. J.* **2003**, *13*, 7–13. [[CrossRef](#)]
31. Xu, Q.; Li, S.; Huang, H.; Wen, J. Key technologies for the industrial production of fumaric acid by fermentation. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 1685–1696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Yang, L.; Lübeck, M.; Lübeck, P.S. *Aspergillus* as a versatile cell factory for organic acid production. *Fungal Biol. Rev.* **2017**, *31*, 33–49. [[CrossRef](#)]
33. Jiménez-Quero, A.; Pollet, E.; Zhao, M.; Marchioni, E.; Averous, L.; Phalip, V. Fungal Fermentation of Lignocellulosic Biomass for Itaconic and Fumaric Acid Production. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *27*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Zhang, T.; Wang, Z.; Deng, L.; Tan, T.; Wang, F.; Yan, Y. Pull-in urea cycle for the production of fumaric acid in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 5033–5044. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kang, S.W.; Lee, H.; Kim, D.; Lee, D.; Kim, S.; Chun, G.-T.; Lee, J.; Kim, S.W.; Park, C. Strain development and medium optimization for fumaric acid production. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2010**, *15*, 761–769. [[CrossRef](#)]
36. Yu, S.; Huang, D.; Wen, J.; Li, S.; Chen, Y.; Jia, X. Metabolic profiling of a *Rhizopus oryzae* fumaric acid production mutant generated by femtosecond laser irradiation. *Bioresour. Technol.* **2012**, *114*, 610–615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Fu, Y.-Q.; Xu, Q.; Li, S.; Chen, Y.; Huang, H. Strain improvement of *Rhizopus oryzae* for over-production of fumaric acid by reducing ethanol synthesis pathway. *Korean J. Chem. Eng.* **2010**, *27*, 183–186. [[CrossRef](#)]
38. Deng, Y.; Li, S.; Xu, Q.; Gao, M.; Huang, H. Production of fumaric acid by simultaneous saccharification and fermentation of starchy materials with 2-deoxyglucose-resistant mutant strains of *Rhizopus oryzae*. *Bioresour. Technol.* **2012**, *107*, 363–367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Zhang, B.; Yang, S.-T. Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae*: Effects of overexpressing *fumR* gene on cell growth and fumaric acid biosynthesis from glucose. *Process Biochem.* **2012**, *47*, 2159–2165. [[CrossRef](#)]
40. Wen, S.; Liu, L.; Nie, K.L.; Deng, L.; Tan, T.W.; Wang, F. Enhanced Fumaric Acid Production by Fermentation of Xylose Using a Modified Strain of *Rhizopus Arrhizus*. *BioResources* **2013**, *8*, 2186–2194. [[CrossRef](#)]
41. Huang, L.; Wei, P.; Zang, R.; Xu, Z.; Cen, P. High-throughput screening of high-yield colonies of *Rhizopus oryzae* for enhanced production of fumaric acid. *Ann. Microbiol.* **2010**, *60*, 287–292. [[CrossRef](#)]
42. Liu, Y.; Lv, C.; Xu, Q.; Li, S.; Huang, H.; Ouyang, P. Enhanced acid tolerance of *Rhizopus oryzae* during fumaric acid production. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2015**, *38*, 323–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Liu, Y.; Xu, Q.; Lv, C.; Yan, C.; Li, S.; Jiang, L.; Huang, H.; Ouyang, P. Study of Metabolic Profile of *Rhizopus oryzae* to Enhance Fumaric Acid Production Under Low pH Condition. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2015**, *177*, 1508–1519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Das, R.K.; Brar, S.K.; Verma, M. Application of calcium carbonate nanoparticles and microwave irradiation in submerged fermentation production and recovery of fumaric acid: A novel approach. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 25829–25836. [[CrossRef](#)]
45. Zhang, K.; Yu, C.; Yang, S.-T. Effects of soybean meal hydrolysate as the nitrogen source on seed culture morphology and fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*. *Process Biochem.* **2015**, *50*, 173–179. [[CrossRef](#)]
46. Papadaki, A.; Androutsopoulos, N.; Patsalou, M.; Koutinas, M.; Kopsahelis, N.; Castro, A.; Papanikolaou, S.; Koutinas, A. Biotechnological Production of Fumaric Acid: The Effect of Morphology of *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582. *Fermentation* **2017**, *3*, 33. [[CrossRef](#)]
47. Ding, Y.; Li, S.; Dou, C.; Yu, Y.; Huang, H. Production of Fumaric Acid by *Rhizopus oryzae*: Role of Carbon–Nitrogen Ratio. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2011**, *164*, 1461–1467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Riscaldati, E.; Moresi, M.; Federici, F.; Petruccioli, M. Direct ammonium fumarate production by *Rhizopus arrhizus* under phosphorous limitation. *Biotechnol. Lett.* **2000**, *22*, 1043–1047. [[CrossRef](#)]
49. Das, R.K.; Brar, S.K.; Verma, M. Effects of Different Metallic Nanoparticles on Germination and Morphology of the Fungus *Rhizopus oryzae* 1526 and Changes in the Production of Fumaric Acid. *BioNanoScience* **2015**, *5*, 217–226. [[CrossRef](#)]

50. Wang, G.; Huang, D.; Qi, H.; Wen, J.; Jia, X.; Chen, Y. Rational medium optimization based on comparative metabolic profiling analysis to improve fumaric acid production. *Bioresour. Technol.* **2013**, *137*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Alonso, D.M.; Hakim, S.H.; Zhou, S.; Won, W.; Hosseinaei, O.; Tao, J.; Garcia-Negron, V.; Motagamwala, A.H.; Mellmer, M.A.; Huang, K. Increasing the revenue from lignocellulosic biomass: Maximizing feedstock utilization. *Sci. Adv.* **2017**, *3*, e1603301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Biswas, R.; Uellendahl, H.; Ahring, B.K. Wet Explosion: A Universal and Efficient Pretreatment Process for Lignocellulosic Biorefineries. *BioEnergy Res.* **2015**, *8*, 1101–1116. [[CrossRef](#)]
53. Wang, Z.; Zheng, L.; Li, C.; Zhang, D.; Xiao, Y.; Guan, G.; Zhu, W. Modification of chitosan with monomethyl fumaric acid in an ionic liquid solution. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *117*, 973–979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Silva, D.D.V.d.; Mancilha, I.M.d.; Silva, S.S.d.; Felipe, M.d.G.d.A. Improvement of biotechnological xylitol production by glucose during culture of *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2007**, *50*, 207–215. [[CrossRef](#)]
55. Liu, H.; Wang, W.; Deng, L.; Wang, F.; Tan, T. High production of fumaric acid from xylose by newly selected strain *Rhizopus arrhizus* RH 7-13-9#. *Bioresour. Technol.* **2015**, *186*, 348–350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Liu, H.; Yue, X.; Jin, Y.; Wang, M.; Deng, L.; Wang, F.; Tan, T. Preparation of hydrolytic liquid from dried distiller's grains with solubles and fumaric acid fermentation by *Rhizopus arrhizus* RH 7-13. *J. Environ. Manag.* **2017**, *201*, 172–176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Xu, Q.; Liu, Y.; Li, S.; Jiang, L.; Huang, H.; Wen, J. Transcriptome analysis of *Rhizopus oryzae* in response to xylose during fumaric acid production. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2016**, *39*, 1267–1280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Monte, M.C.; Fuente, E.; Blanco, A.; Negro, C. Waste management from pulp and paper production in the European Union. *Waste Manag.* **2009**, *29*, 293–308. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Das, R.K.; Brar, S.K.; Verma, M. Potential use of pulp and paper solid waste for the bio-production of fumaric acid through submerged and solid state fermentation. *J. Clean. Prod.* **2016**, *112*, 4435–4444. [[CrossRef](#)]
60. Li, X.; Zhou, J.; Ouyang, S.; Ouyang, J.; Yong, Q. Fumaric Acid Production from Alkali-Pretreated Corn cob by Fed-Batch Simultaneous Saccharification and Fermentation Combined with Separated Hydrolysis and Fermentation at High Solids Loading. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2017**, *181*, 573–583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Jiménez-Quero, A.; Pollet, E.; Zhao, M.; Marchioni, E.; Averous, L.; Phalip, V. Itaconic and fumaric acid production from biomass hydrolysates by *Aspergillus* strains. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *26*, 1557–1565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Zhou, Y.; Nie, K.; Zhang, X.; Liu, S.; Wang, M.; Deng, L.; Wang, F.; Tan, T. Production of fumaric acid from biodiesel-derived crude glycerol by *Rhizopus arrhizus*. *Bioresour. Technol.* **2014**, *163*, 48–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Huang, D.; Wang, R.; Du, W.; Wang, G.; Xia, M. Activation of glycerol metabolic pathway by evolutionary engineering of *Rhizopus oryzae* to strengthen the fumaric acid biosynthesis from crude glycerol. *Bioresour. Technol.* **2015**, *196*, 263–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Li, N.; Zhang, B.; Wang, Z.; Tang, Y.-J.; Chen, T.; Zhao, X. Engineering *Escherichia coli* for fumaric acid production from glycerol. *Bioresour. Technol.* **2014**, *174*, 81–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Szymańska-Chargot, M.; Chylińska, M.; Gdula, K.; Kozioł, A.; Zdunek, A. Isolation and Characterization of Cellulose from Different Fruit and Vegetable Pomaces. *Polymers* **2017**, *9*, 495. [[CrossRef](#)]
66. Das, R.K.; Brar, S.K.; Verma, M. A fermentative approach towards optimizing directed biosynthesis of fumaric acid by *Rhizopus oryzae* 1526 utilizing apple industry waste biomass. *Fungal Biol.* **2015**, *119*, 1279–1290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Das, R.K.; Brar, S.K. Enhanced Fumaric Acid Production from Brewery Wastewater and Insight into the Morphology of *Rhizopus oryzae* 1526. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, *172*, 2974–2988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Esteban, J.; Ladero, M. Food waste as a source of value-added chemicals and materials: A biorefinery perspective. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2018**, *53*, 1095–1108. [[CrossRef](#)]
69. Liu, H.; Ma, J.; Wang, M.; Wang, W.; Deng, L.; Nie, K.; Yue, X.; Wang, F.; Tan, T. Food Waste Fermentation to Fumaric Acid by *Rhizopus arrhizus* RH7-13. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2016**, *180*, 1524–1533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Liu, H.; Zhao, S.; Jin, Y.; Yue, X.; Deng, L.; Wang, F.; Tan, T. Production of fumaric acid by immobilized *Rhizopus arrhizus* RH 7-13-9# on loofah fiber in a stirred-tank reactor. *Bioresour. Technol.* **2017**, *244*, 929–933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

71. Fu, Y.-Q.; Li, S.; Chen, Y.; Xu, Q.; Huang, H.; Sheng, X.-Y. Enhancement of Fumaric Acid Production by *Rhizopus oryzae* Using a Two-stage Dissolved Oxygen Control Strategy. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *162*, 1031–1038. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Ling, L.B.; Ng, T.K. Fermentation Process for Carboxylic Acids. U.S. Patent US4877731A, 31 October 1989.
73. Zhou, Y.; Du, J.; Tsao, G. Comparison of fumaric acid production by *Rhizopus oryzae* using different neutralizing agents. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2002**, *25*, 179–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Cao, N.; Du, J.; Gong, C.S.; Tsao, G.T. Simultaneous Production and Recovery of Fumaric Acid from Immobilized *Rhizopus oryzae* with a Rotary Biofilm Contactor and an Adsorption Column. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 2926–2931. [[PubMed](#)]
75. Das, R.K.; Brar, S.K.; Verma, M. Valorization of Egg Shell Biowaste and Brewery Wastewater for the Enhanced Production of Fumaric Acid. *Waste Biomass Valoriz.* **2015**, *6*, 535–546. [[CrossRef](#)]
76. Gu, C.; Zhou, Y.; Liu, L.; Tan, T.; Deng, L. Production of fumaric acid by immobilized *Rhizopus arrhizus* on net. *Bioresour. Technol.* **2013**, *131*, 303–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Petruccioli, M.; Angiani, E.; Federici, F. Semi-continuous fumaric acid production by *Rhizopus arrhizus* immobilized in polyurethane sponge. *Process Biochem.* **1996**, *31*, 463–469. [[CrossRef](#)]
78. Liao, W.; Liu, Y.; Frear, C.; Chen, S. Co-production of fumaric acid and chitin from a nitrogen-rich lignocellulosic material – dairy manure – using a pelletized filamentous fungus *Rhizopus oryzae* ATCC 20344. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 5859–5866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Romano, A.H.; Bright, M.M.; Scott, W.E. Mechanism of fumaric acid accumulation in *Rhizopus nigricans*. *J. Bacteriol.* **1967**, *93*, 600–604. [[PubMed](#)]
80. Lubowitz, H.R.; La, R.E.G. Fumaric Acid Fermentation Process. U.S. Patent US2861922A, 25 November 1958.
81. Xu, Q.; Li, S.; Fu, Y.; Tai, C.; Huang, H. Two-stage utilization of corn straw by *Rhizopus oryzae* for fumaric acid production. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 6262–6264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Tejayadi, S.; Cheryan, M. Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, *43*, 242–248. [[CrossRef](#)]
83. Wang, J.; Yang, L.; Wang, D.; Dong, L.; Chen, R. Enhanced succinic acid productivity by expression of mgtCB gene in *Escherichia coli* mutant. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *43*, 505–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Zhang, K.; Zhang, L.; Yang, S.-T. Fumaric Acid Recovery and Purification from Fermentation Broth by Activated Carbon Adsorption Followed with Desorption by Acetone. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2014**, *53*, 12802–12808. [[CrossRef](#)]
85. Gemici, A.; Uslu, H.; Gök, A.; Kirbaşlar, Ş.İ. Effect of Diluents on the Extraction of Fumaric Acid by Tridodecyl Amine (TDA). *J. Chem. Eng. Data* **2015**, *60*, 919–924. [[CrossRef](#)]
86. Figueira, D.; Cavalheiro, J.; Ferreira, B. Purification of Polymer-Grade Fumaric Acid from Fermented Spent Sulfite Liquor. *Fermentation* **2017**, *3*, 13. [[CrossRef](#)]
87. Zhang, K.; Yang, S.-T. In situ recovery of fumaric acid by intermittent adsorption with IRA-900 ion exchange resin for enhanced fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochem. Eng. J.* **2015**, *96*, 38–45. [[CrossRef](#)]
88. Uslu, H.; Gemici, A.; Gök, A.; Kirbaşlar, Ş.İ. Reactive Extraction of (E)-Butenedioic Acid (Fumaric Acid) by Nontoxic Diluents. *J. Chem. Eng. Data* **2014**, *59*, 3767–3772. [[CrossRef](#)]
89. Prochaska, K.; Staszak, K.; Woźniak-Budych, M.J.; Regel-Rosocka, M.; Adamczak, M.; Wiśniewski, M.; Staniewski, J. Nanofiltration, bipolar electrodialysis and reactive extraction hybrid system for separation of fumaric acid from fermentation broth. *Bioresour. Technol.* **2014**, *167*, 219–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Choi, J.-H.; Kang, M.-S.; Lee, C.-G.; Wang, N.-H.L.; Mun, S. Design of simulated moving bed for separation of fumaric acid with a little fronting phenomenon. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1491*, 75–86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Nghiem, N.; Kleff, S.; Schwegmann, S. Succinic Acid: Technology Development and Commercialization. *Fermentation* **2017**, *3*, 26. [[CrossRef](#)]
92. Gangl, I.C.; Weigand, W.A.; Keller, F.A. Economic comparison of calcium fumarate and sodium fumarate production by *Rhizopus arrhizus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1990**, *24*, 663–677. [[CrossRef](#)]



Anexo II

Título: Kinetic modelling of the coproduction process of fumaric and malic acids by *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526.

Autores: Víctor Martín-Domínguez, Laura Bouzas-Santiso, Nieves Martínez-Peinado, Victoria E. Santos y Miguel Ladero.

Revista: *Processes* (2020). 8, 188.

DOI: 10.3390/pr8020188.

Article

Kinetic Modelling of the Coproduction Process of Fumaric and Malic Acids by *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526

Victor Martin-Dominguez, Laura Bouzas-Santiso, Nieves Martinez-Peinado, Victoria E. Santos ^{ID} and Miguel Ladero * ^{ID}

Chemical Engineering and Materials Department, Chemistry College, Complutense University, 28040 Madrid, Spain; vmdominguez@ucm.es (V.M.-D.); labouzas@ucm.es (L.B.-S.); niemar01@ucm.es (N.M.-P.); vesantos@ucm.es (V.E.S.)

* Correspondence: mladerog@ucm.es; Tel.: +34-91-394-4164

Received: 22 December 2019; Accepted: 25 January 2020; Published: 5 February 2020



Abstract: The production of organic acids by biotechnological processes has experienced a notable impulse with the advent of first and second generation biorefineries and the need of searching for renewable and sustainable feedstock, such as biomass. Fumaric acid is a promising biomonomer for polyamide production and a well-known acidulant and preservative in food and feed industries. Malic acid is a well-known food acidulant with a high market share. The biotechnological Fumaric and Malic acid production via fungi of the *Rhizopus* genus is being explored nowadays as a process for the valorization of food and food-related waste to obtain food ingredients and key platform chemicals of the so-called biochemical biorefinery. In this work, a preliminary study is performed to find reproducible conditions for the production of the acids by *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526 by controlling fungi morphology and inoculum conditions. Afterwards, several production runs are performed to obtain biomass, glucose, and acid concentration data at different processing time values. Finally, an unstructured, unsegregated model including a logistic-type equation for biomass and potential-type equations for the substrate and the products is fitted to experimental data. We find that the production of the organic acids is mainly non-associated with fungal growth.

Keywords: biorefinery; fermentation; fumaric acid; malic acid; filamentous fungi; kinetic modelling

1. Introduction

Biorefinery as a concept is an answer to the increasing environmental awareness in society and the gradual depletion of fossil resources. The quest for sustainability is critical in view of the increment of the human population and the need for higher standards of living with a limited stock of resources [1,2].

First generation biorefineries are based on food crops as biomass raw material. Food is a very limited and ethically questionable source for the production of biofuels, chemicals, and biomaterials. Therefore, the development of second and third generation biorefineries, based on lignocellulosic biomass and marine (algae) biomass, seems to be based in almost inexhaustible resources, avoiding the food vs. chemicals/fuels controversy and paving the way towards circular, sustainable strategies for the creation of materials, chemicals, and fuels [3]. For the development of these processes, biotechnology includes a prominent set of technological concepts, tools, and strategies to establish new eco-friendly processes that are able to reach high titers of key chemicals and fuels to satisfy the great demand of contemporary society [4]. Industrial biotechnology processes are carried out by enzymes, microorganisms, or upper cells at moderate temperature, pH, and pressure conditions.

The increment of agriculture and food wastes is one of the key problems linked to an increasing human population and standard of living. Just considering food wastes, which are not as plentiful as

those of agriculture and forestry, more than 1300 million tons are produced worldwide each year [5]. These organic residues, usually rich in free sugars, polysaccharides, proteins, and fats, are amenable to biotechnological transformation into chemicals and fuels.

Fumaric acid is an ingredient and excipient in pharmaceutical and food products [6,7]. Its high acidity results in a very powerful yet non-toxic antimicrobial agent, as well as an acidulant that can substitute citric and lactic acids. This acid has a huge potential in the polymer industry as a viable substitute of petroleum-based monomers, providing biodegradable polymers with very interesting applications in industry [8]. Furthermore, fumaric acid is a food complement of cattle feed that reduces up to 70% of methane emissions, reaching a 10% global reduction of methane, due to humans [9]. In fact, fumaric acid has been designated by the US Department of Energy as one of the Top 12 value added chemicals to be obtained from biomass [10].

Fumaric acid production by a biotechnological process supposes a notable environmental and economic advantage because an actual production process consists of maleic acid isomerization using metallic catalysts and extensive temperature and pressure conditions. Maleic acid is obtained from its anhydride, a chemical whose production and use is very aggressive to the environment [9]. A possible alternative could be the use of enzymes to perform maleic acid isomerization, using maleic isomerase from the *Bacillus* or *Pseudomonas* genus; however, this process is currently being researched and entails certain control problems [8]. The use of a fermentative process is more attractive, as waste materials can be valorized at moderate process conditions, as presented in Figure 1 [11,12].

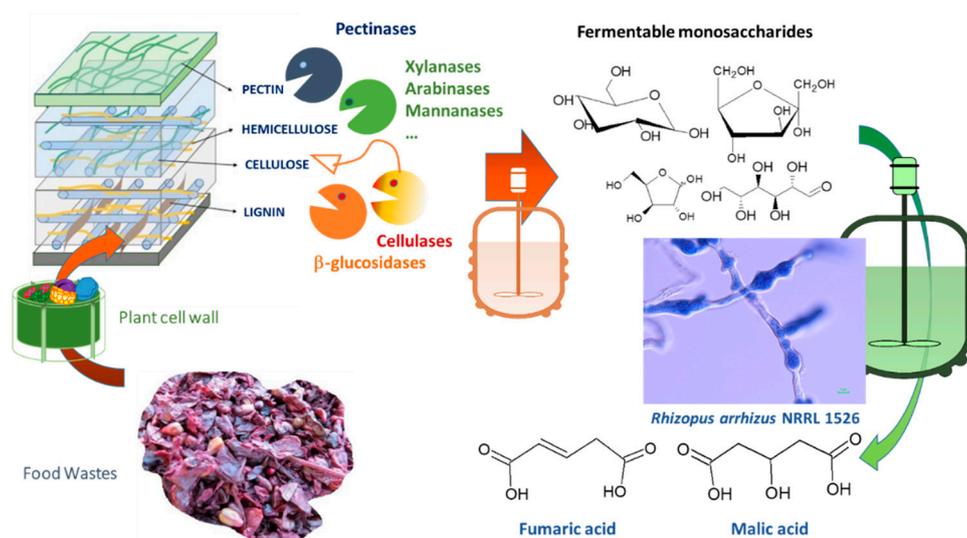


Figure 1. General process strategies from lignocellulosic biomass in food wastes to fumaric acid.

Glucose fermentation to fumaric acid was studied and partially developed in the 1940s [13,14], but it was abandoned, due to the great development of the petroleum-based industry after WWII. However, in the 1980s, a production method was patented by Dupont for producing different carboxylic acids by using bioprocesses [15]. These processes are always based on fungi from genus *Rhizopus*, which are known to be the best fumaric acid producers. These fungi produce fumaric acid via two different pathways: the TriCarboxylic Acids Cycle (TCA) or the Krebs cycle and the reductive TCA pathway. In the first case, fumaric acid is produced as an intermediate inside the mitochondria (and not released) [8,16]. Fumaric acid production heavily depends on the reductive TCA pathway that involves CO₂ fixation and releases the produced fumaric acid outside the cell [16]. Therefore, from an industrial perspective, this pathway must be favored by obtaining a proper fungus morphology, which is the result of an adequate production strategy [17].

Malic acid is a biomass-derived chemical that can be obtained by fumaric acid hydration using *Rhizopus oryzae* whole cells in anaerobic conditions [18]. This acid potential has been growing in the

last years, as its chelating properties render it very promising in the recovery of valuable metals from batteries [19], in the production of poly(malic acid) and copolymers for controlled drug release [20], and in the production of malic acid deep eutectic solvents [21], to name some examples of the emerging applications of this compound.

Most studies on fumaric acid of biotechnological origin focus on the development of an effective fermentative process for fumaric acid production at an industrial level. However, although kinetic models are of great interest to simulate and design industrial processes, during their scale-up and final production control, in the case of fumaric acid, there is, to the best of our knowledge, only a kinetic model study focused on immobilized *Rhizopus oryzae*, but none for the more common free or suspended fungus [22]. The kinetic Monod model proposed in this study is employed to determine yields of fumaric acid and by-products by understanding the evolution of the system through the different catabolic carbon fluxes proposed (fumaric acid production, respiration and ethanol production). In particular, a main objective of the study is to optimize pH and oxygen diffusion in order to maximize the desired carbon flux, the one that renders the highest possible yield of fumaric acid.

Therefore, the aim of the present work is to develop an initial kinetic model able to predict and simulate fumaric and malic acids production using *R. arrhizus* at flask scale. To obtain this kinetic model, experimental procedures and methods were developed to reach reproducible and reliable production data (including fumaric and malic acids, but also biomass, glucose, and any minor by-product). To this end, reaching a proper morphology to grow the fungus and tuning up the inoculum stages were critical.

2. Materials and Methods

2.1. Microorganism and Spore Production

Rhizopus arrhizus NRRL 1526 was kindly donated by the research group of Dr. Ulf Pruesse and Dr. Anja Kuenz from the Thünen Institute of Agricultural Technology (Braunschweig, Germany), within the framework of the FAPA (Fumaric Acid for Polymer Applications) project inside ERA-net ERA-IB2.

Spores were cultivated on agar plates with medium A [13] for 5 days at 28 °C, after sporulation, spores were extracted from fungal mycelium with a glycerol and saline (50%) solution. The final spore solution (containing approximately 30×10^7 spores/mL) was stored at -80 °C. This stock was the initial biological inoculum of every single experiment.

2.2. Culture Mediums

Sporulation stages have been carried out on agar plates using medium A defined by Rhodes in 1959 [13], and described in Table 1, this medium is indicated for promoting sporulation on fungi applying saline stress.

Inoculum previous stages were tested using medium B developed by Ling and Ng in 1989 [15]. This medium has been modified, removing their original content in CaCO_3 for preliminary experiments at free pH, and is also described in Table 1.

Finally, production stage experiments were performed using medium C, optimized by Ling and Ng [15] (the same as medium B), this medium is recommended for this production stage, due to its high content in glucose, and proper concentrations of nitrogen sources and micronutrients, as described in Table 1 as well.

2.3. Culture Conditions

All experiments were performed in 100 mL cotton-covered flasks containing 20 mL of medium (5:1 ratio), in aerobic conditions. Agitation was at 200 rpm to ensure a proper mixing and oxygen diffusion, while avoiding shear damage or stress to the fungus [23].

Before the production of the acids, previous inoculum stages were performed, reaching an adequate morphology in the first step; studies about temperature, number of stages, duration, and evolution were performed later. In these previous stages, pH evolution was free, while, on the other

hand, in production experiments, pH is controlled using CaCO_3 in the medium C (Table 1), observing a slightly decreasing pH during the fermentation process whose average value is 6, approximately.

After the selection of the previous stages' conditions, production stage experiments were carried out to obtain kinetic data that was subsequently employed to find the most adequate model, together with the values and errors of its relevant parameters.

Due to the morphological characteristics of the used fungus, which develops hyphae, biomass concentration cannot be measured by turbidity techniques, such as in bacterial bioprocesses [24–26], so biomass quantification must be done by dry weight cell determination. To this end, a working protocol called “one flask, one sample” was developed. In this working protocol, every single sample took along the culture in an independent flask, so the reproducibility of the sampling method and the experiments were deeply tested, and runs were conducted in triplicate.

Table 1. Culture media used [13,15].

Medium A		Medium B		Medium C
Component	Concentration (g/L)	Component	Concentration (g/L)	Concentration (g/L)
Glucose	4	Glucose	40	130
Urea	0.6	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4	1.8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4	0.4
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.088	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.044	0.44
K_2PO_4	0.4	K_2PO_4	1.6	0.3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0075	0.0075
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.00782	Tartaric acid	0.0084	0.0075
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.038	CaCO_3	—	50
Lactose $\times \text{H}_2\text{O}$	6.32	Corn steep liquor	0.5 mL/L	0.5 mL/L
KCl	0.4			
NaCl	40			
Agar-agar	30			
Peptone	1.6			
Corn steep liquor	1 mL/L			
Glycerol	10 mL/L			

2.4. Analytical Methods

Broth components, as glucose, fumaric acid, malic acid, and any other acids and by-products, were quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with a modular equipment (Jasco PU-2089. AS-2059. CO-2060. RI-2031 & MD-2015. Jasco MD-2015 & Jasco RI-2031, Tokyo, Japan) using, as the stationary phase, a Rezex ROA-Organic Acid H^+ column. Analytes were eluted with H_2SO_4 0.005 M at a 0.5 mL/min flow rate and at a column temperature of 60 °C. Fumaric acid was measured using a diode array detector (Jasco MD-2015, Tokyo, Japan) whose main wavelength was set as 236 nm, whereas the other components in the broth were quantified using a refractive index detector (Jasco RI-2031, Tokyo, Japan).

In all samples, a pH measurement was performed using a pH-meter Hanna Instruments HI 5521. Dry weight cell determination was carried out by filtering the mycelial biomass, using paper filters that were subsequently dried at 105 °C for 48 h.

2.5. Mathematic Methods

In the kinetic study, several models were fitted to the results obtained during fumaric acid production experiments. For this purpose, software Aspen Custom Modeler V10[®] (ACM) and OriginLab 2019[®] were used, employing mathematic methods as numeric integration by variable-step Euler method coupled with a nonlinear regression method based on the Levenberg–Marquardt Algorithm.

For kinetic modelling using this software, the proposed kinetic model (described in Section 3.4) is introduced by using ACM programming language, firstly defining the parameters and variables of the model to be fitted followed by the relevant equations; secondly, introducing experimental results in the ACM dataset and, thirdly, setting approximate initial values for the kinetic constants contained in the model. Finally, the program (attached as Supplementary Material) was run to obtain values and their standard errors for such kinetic constants, together with goodness-of-fit parameters.

To select the best kinetic model, typical physical and statistical criteria were applied. Goodness-of-fit statistical criteria were based on the Sum of Squared Residuals (SSR –Equation (1)-), from which the Fisher distribution parameter for 95% of confident (F_{95}) –Equation (2)- and the Root Mean Square Error (RMSE) –Equation (3)- can be computed. Both SSR and RMSE parameters are measures of the accumulative error between experimental data and the fitted model, so both should be minimal and are best if near or equal to zero. On the other hand, F_{95} is used to fit data to a Fisher–Snedecor distribution with 95% confidence. This parameter must be over a critical value (tabulated) for given numbers of data and model parameters to dismiss the null hypothesis, supporting in this way the correlation between the proposed model and experimental data.

$$SSR = \sum_{j=1}^{j=C} \sum_{i=1}^{i=N} (C_{ji \text{ exp}} - C_{ji \text{ calc}}) \quad (1)$$

$$F_{95} = \frac{\sum_{j=1}^{j=C} \sum_{n=1}^{n=N} \left(\frac{C_{jn, \text{calc}}}{K} \right)^2}{\sum_{j=1}^{j=C} \sum_{n=1}^{n=N} \left(\frac{SSR}{N-K} \right)} \quad (2)$$

$$F_{95} = \frac{\sum_{j=1}^{j=C} \sum_{n=1}^{n=N} \left(\frac{C_{jn, \text{calc}}}{K} \right)^2}{\sum_{j=1}^{j=C} \sum_{n=1}^{n=N} \left(\frac{SSR}{N-K} \right)} \quad (3)$$

The percentage of variation explained (VE) –Equation (4)- is another goodness-of-fit parameter and shows how good the model is at explaining the variability of obtained results with the independent experimental variable (time, in this case). A 100% supposes a perfect explanation by the model of the experimental change of concentrations with time.

$$VE(\%) = 100 \left(1 - \frac{\sum_{l=1}^L SSQ_l}{\sum_{l=1}^L SSQ_{\text{mean}_l}} \right) \quad (4)$$

3. Results and Discussion

3.1. Fungi Morphology Selection at the Inoculum Stage

The first step to develop a reproducible and consolidated production stage is to reach a proper morphology to obtain high and reproducible productions [17,27,28]. Several studies have been aimed at analyzing the effects of operational variables in the process, such as: fermentation volume, agitation rate, pH, culture temperature, presence of certain metals, addition of surfactants [29] or, even, the nitrogen source employed in the morphology developed by the fungus [12,27].

Higher fumaric acid production titers were obtained with dispersed mycelium morphology, but this morphology is not suitable for an industrial process, due to the technical problems related with broth viscosity that it entails [27]. Hence, the desired morphology at that scale would be pellets because it provides an acceptable fumaric acid titer, similar to that of mycelium morphology, while a low viscosity is ensured, facilitating biomass manipulation and reducing mechanical energy input [27]. In this study, we have found a proper initial spore concentration to develop small and dispersed pellets during the inoculum stage.

In Figure 2, the results obtained when using different values of spore concentration and the morphology reached with them are collected. It seems evident that a higher concentration of spores favors the pellet morphology, while, on the other hand, lower concentrations stimulate clump formation, favoring mycelium growth instead of nucleation, leading to small mycelia or pellets. Therefore, in the subsequent experiments, 10^9 spores/L will be the selected initial spore concentration for the inoculum stage, as it leads to the desired morphology: small and dispersed pellets.

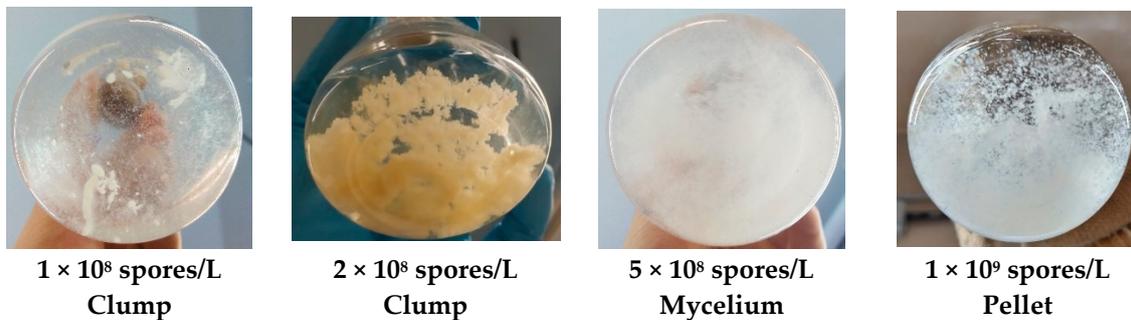


Figure 2. Different morphologies depending on initial spore concentration.

3.2. Temperature and pH Effect on Inoculum Biomass Growth

Once an adequate morphology was achieved, the growth of the fungus in the inoculum stage was studied. To start with, the operation temperature was selected by following the biomass growth with time at several temperatures, as can be seen in Figure 3. The best temperature for the fungus development, both in terms of biomass yield and productivity, seems to be 34 °C, when higher concentrations of biomass are gotten, while preserving the morphology reached on the previous set of experiments. Higher temperatures, as 36 °C, lead to lower initial biomass production and lower final biomass yields, suggesting a thermal deactivation of the biomass growth process.

Having selected the bioprocess temperature, the inoculum growth was analyzed by following the evolution of the biomass, the consumption of glucose and the production of fumaric acid concentration and pH. These results are displayed in Figure 4, only biomass and pH are represented, as fumaric acid was not found on the analyzed samples of this inoculum stage. If we consider the glucose concentration change during the bioprocess, it was only reduced from 40 to 35 g/L in the best of cases, so it could be considered almost constant.

These facts are probably due to the absence of pH control at this stage, with a possible inhibition of fumaric acid production. In general, low pH values not only avoid the production of fumaric acid, but also, when they are as low as pH 2 (at 15 h, approximately), biomass growth stops and glucose is no longer consumed.

To avoid possible damages to biomass due to low pH, this transferred biomass into the production stage must be in the early exponential growth phase and, thus, in a reasonably good physiological state. Therefore, the inoculum stage will last 12 h for all subsequent experiments. For all of them, the biomass inoculum will be 10% v/v of the operation volume (2 mL inoculation) [15].

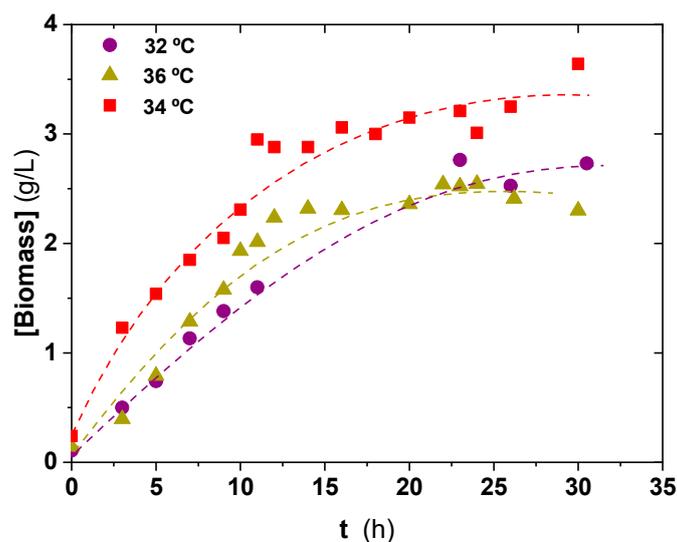


Figure 3. Biomass evolution with time showing *Rhizopus arrhizus* inoculum growth in medium B at several temperatures.

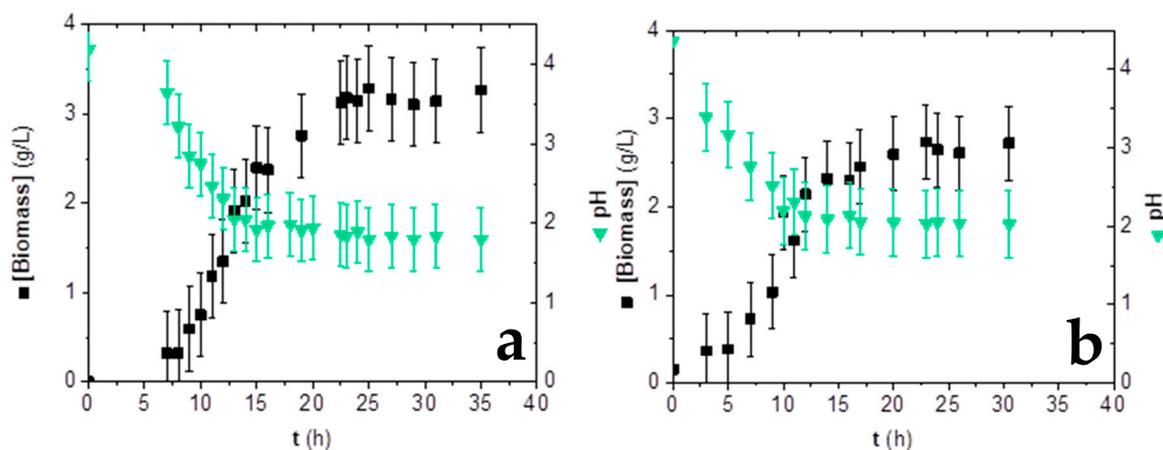


Figure 4. *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526 first (a) and second (b) inoculum stages growth at 34 °C and free pH evolution in medium B.

3.3. Influence of Inoculum Stages on Fumaric Acid Production

As can be deduced from the previous results, fumaric acid production is profoundly affected by pH. Two production runs were performed using conditions established in the previous experiments and using either medium C, as described in Section 2.2, or a modified medium C with no CaCO_3 content. In these runs, fumaric acid was only produced when CaCO_3 was present, avoiding a pH drop below 6. Once fumaric acid, as the main product, was obtained, the effect of certain parameters related to inoculum addition in the production stage were studied.

A first question to be answered concerns the number of previous stages that must be done previously to the production of the acid. On certain bacterial processes, it is known that the use of two previous stages (called inoculum and pre-inoculum) can be beneficial for reaching a proper metabolic state and, as a consequence, the desired product concentration is maximized [24–26]. In Figure 5, it can be seen how this procedure is not applicable to this fungal process. This could be explained by the lower initial biomass concentration in the production stage when using two inoculum phases instead of only one (0.154 g/L were inoculated in the production phase in this last case instead of 0.092 g/L inoculated to production flasks when using two in-series previous stages) (Figure 4b). This

loss of biomass in the second inoculum could be an effect of a certain metabolic lethargy, a possible consequence of the pH damage hypothesized in previous experiments.

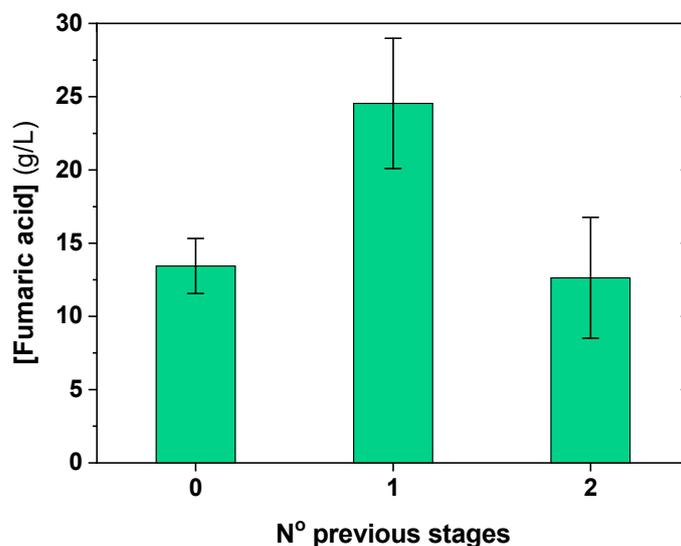


Figure 5. Number of previous stages determination.

A possible response to this progressive biomass productivity degradation, with an increasing number of growth stages for inoculum production, was to use biomass directly produced in Petri dishes with medium A (sporulation) to inoculate medium C containing flasks, so as to produce fumaric acid. In Figure 5, it can be perceived that this strategy did not work. Possibly, the fungus morphology was not well developed, so the biomass had not reached a metabolic state suitable for fumaric acid production in medium C.

When the proper number of previous stages was selected; the length of this previous stage could be determined. If comparing results in Figure 4a,b, the existence of a pH inhibition on the inoculum stage can be inferred, especially at pH values lower than 2. Therefore, a lengthy exposition of biomass to low pH values is detrimental to fumaric acid production and biomass should be separated before reaching such a low pH.

Inoculum time was set on 12 h for later production experiments because, at this time, the pH value is over 2 and the biomass, in the first exponential phase, has a proper concentration ready to be inoculated in the production stage. In these conditions, a promising fumaric acid concentration was reached within a five-day production process (Figure 6).

The last parameter studied was the initial biomass concentration on production stage. In Figure 7, the results of fumaric acid production at 5 days are available. It is evident that a high initial biomass inoculum does not necessarily mean a high fumaric acid titer, but it is just the opposite. More biomass in the inoculum means a slightly higher biomass at the end of the production stage, but a notably lower fumaric acid titer, suggesting a swift of the carbon flux towards the aerobic metabolism, reducing C consumption in the fermentative pathways.

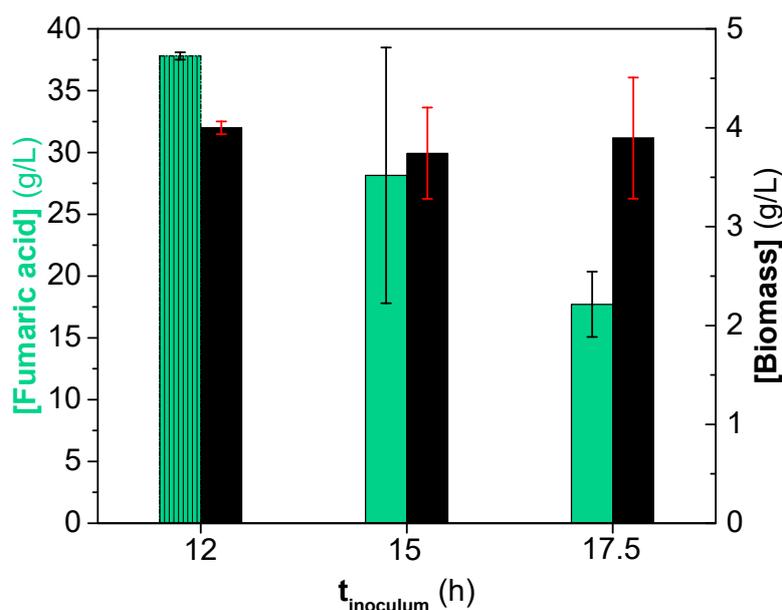


Figure 6. Inoculum age determination looking for fumaric acid production maximization by avoiding pH damage and biomass reduction.

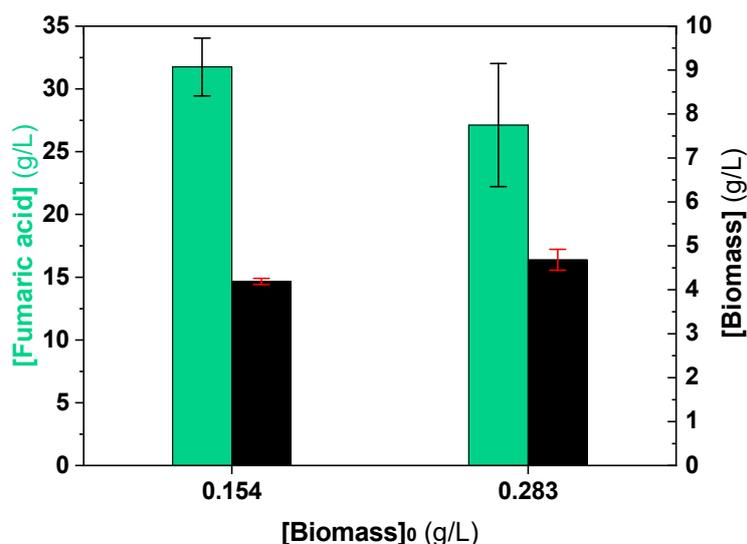


Figure 7. Results of fumaric acid (green) and biomass (black) concentrations using different initial biomass concentration during inoculation.

3.4. Kinetic Modelling

After selecting the proper working conditions to obtain an adequate inoculum, an experiment of fumaric acid production in medium C to obtain kinetic data was performed in triplicate. The concentrations of major components as glucose (the carbon source), fungal biomass (the biocatalyst), fumaric acid (the product of interest) and other acids, such as malic and succinic (the by-products), were followed by ion-exclusion HPLC and dry weight determination. Their evolution with the process time is displayed in Figure 8.

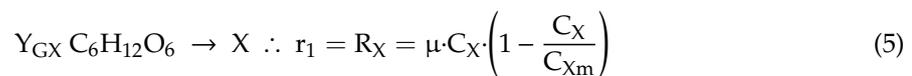
On the first hand, glucose, the carbon source, is totally consumed by the fungus in 5 days. However, *Rhizopus* only grows during the first 48 h, so the process is partially associated with biomass growth. Likewise, acid production happens during the whole process, though most of it is obtained within the biomass stationary phase (66% of all acid production, regardless of the acid considered).

Glucose is mainly consumed in the exponential or growth phase (66% of all glucose), so most of it is derived towards biomass growth or respiration (TCA cycle).

As in other studies [8,17,22], the presence of some by-products have been detected. The major by-product was identified as malic acid ($C_4H_6O_5$), as malic and fumaric acid concentrations are very similar [8]. Succinic acid ($C_4H_6O_4$) was identified as the minor by-product; its presence could be due to the release of this compound from the cytoplasm and from mitochondria, as a major component in the TCA cycle. No ethanol was present in this occasion, though it is observed in other works as a by-product that is produced during biomass growth and disappears in the stationary phase [17,22]. Apart from this, results are very similar to those obtained in other studies [8].

With this information, a simple unstructured unsegregated kinetic model was proposed defining the reaction rate of every reaction proposed on the network:

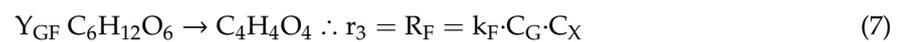
Biomass growth:



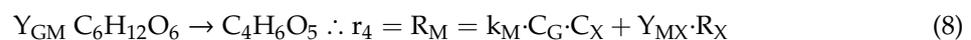
Maintenance:



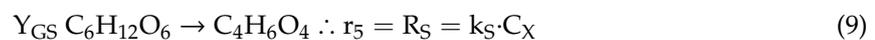
Fumaric acid production:



Malic acid production:



Succinic acid production:



Finally, combining the different rates the production or consumption reaction rates could be obtained. In the case of biomass growth and acids production, the reaction rates are the same as those described in Equations (5), (7)–(9), with the maintenance term being considered in Equation (6). For glucose consumption, the reaction rate is shown in Equation (10) obtained from combination of different production rates and the glucose consumption associated to maintenance (Equation 6):

Glucose consumption:

$$R_G = -Y_{GX} \cdot R_X - m_S \cdot C_X - Y_{GF} \cdot R_F - Y_{GM} \cdot R_M - Y_{GS} \cdot R_S \quad (10)$$

Biomass growth was described using a logistic equation (Equation (10)); the one that showed the best fit of a set of sigmoidal growth functions commonly used with microbial growth.

To define the partial reaction rates, a partially associated production of malic acid is supposed, due to its evolution along the exponential growth phase, having a high production rate at the beginning of the process, which is reduced when the microorganism arrives at the stationary state. According to the model, parameter Y_{MX} is defined as the dependence of malic acid formation associated with biomass growth.

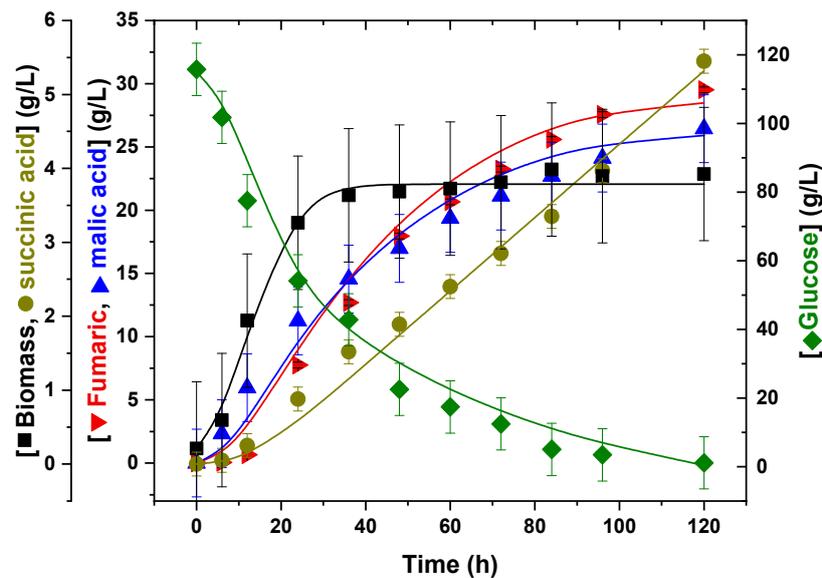


Figure 8. Evolution of biomass, glucose, and products during the production stage. Lines show the fit of the proposed kinetic model to all retrieved data.

As for fumaric and succinic acids, they are supposed to be produced in a non-associated fashion, as suggested by their temporal evolutions, shown in Figure 8, in which it can be seen that there is a lag time in the production of these acids and that the production rates are not affected by the different phases of microbial growth. Succinic acid production rates have been defined as only dependent on the biomass concentration because their production rate is almost constant along time once it starts to be produced, even if the glucose is almost consumed.

For fumaric and succinic acids production and for the non-associated component on malic acid production, reaction rate coefficients k_F , k_S , and k_M have been defined.

In addition, glucose consumption parameters linked to production of acids (biomass: Y_{GX} ; fumaric acid: Y_{GF} ; malic acid: Y_{GM} and succinic acid: Y_{GS}) are defined as the distributions of the carbon fluxes to different productions.

Using Aspen Custom Modeler V10[®] for fitting the model to obtained data, values for the parameters were obtained (Table 2), while the fitting results were represented in Figure 8. As shown in this figure, the model fits properly to the experimental results, a fact that is confirmed by the value of the different statistical parameters obtained after kinetic modelling.

Table 2. Kinetic parameters of proposed model.

Parameter	Units	Value		
C_{Xm}	$g_{biomass}/L$	3.79	±	0.35
m_S	h^{-1}	0.23	±	0.15
k_F	$L \cdot h^{-1} \cdot g_{biomass}^{-1}$	3.47×10^{-2}	±	8.43×10^{-3}
k_M	$g_{fumaric\ acid} \cdot L \cdot h^{-1} \cdot g_{glucose}^{-1} \cdot g_{biomass}^{-1}$	2.80×10^{-3}	±	1.25×10^{-3}
k_S	$g_{malic\ acid} \cdot L \cdot h^{-1} \cdot g_{glucose}^{-1} \cdot g_{biomass}^{-1}$	2.29×10^{-3}	±	1.81×10^{-3}
k_S	$g_{succinic\ acid} \cdot L \cdot h^{-1} \cdot g_{biomass}^{-1}$	1.31×10^{-2}	±	3.95×10^{-3}
Y_{GF}	$g_{glucose}/g_{fumaric\ acid}$	6.38×10^{-1}	±	1.16×10^{-2}
Y_{GM}	$g_{glucose}/g_{malic\ acid}$	1.07	±	0.52
Y_{GS}	$g_{glucose}/g_{succinic\ acid}$	1.65	±	0.34
Y_{GX}	$g_{glucose}/g_{biomass}$	14.4	±	3.34
Y_{MX}	$g_{malic\ acid}/g_{biomass}$	0.73	±	0.33

Results in Table 2 show reasonable error intervals for the parameters, while the values of kinetic constants confirm a notable swift of glucose, as the carbon source, towards the production of energy and a lower trend to be converted to acids, even to fumaric acid. A comparison of k_F and k_M indicates that (a) they are an order of magnitude lower than m_S and (b) they are very similar, so the fungus is a good producer of both acids (evident also in Figure 8), as the carbon flux is distributed between both productions in a very similar way. The value of k_S is an order of magnitude higher than k_F and k_M , due to being only dependent on the biomass concentration, but not on the glucose concentration. Thus, the reaction rate to succinic acid is one order of magnitude lower than those related to fumaric and malic acid and it is independent of the glucose concentration (order zero with respect to this substrate), showing either saturation of enzymes in the succinic acid route or succinic acid production on other carbon source (e.g., those contained in complex nitrogen sources in medium C). This last explanation is less probable, as only minute amounts of carbon are introduced in the production medium through tartaric acid and corn steep liquor, so enzyme saturation with glucose in the route to succinic acid seems like a good explanation for succinic acid production trends.

Regarding the values of kinetic parameters concerning malic acid, we remark how its production is mostly due to a non-associated component, supposing more than 65% of the total contribution on the lowest result. This fact is observed by comparing the values of both components of the malic acid reaction rate (Equation (8)) and how the obtained values of each parameter in both components provide higher contributions, due to the non-associated component to malic acid production, which has an even higher contribution as the process proceeds. The yield obtained for fumaric acid production supposes a 24.12%, with respect to the maximum theory, that could be reached from glucose ($1.29 \text{ g}_{\text{fumaric acid}}/\text{g}_{\text{consumed glucose}}$). However, a notable production of malic acid is also obtained ($0.23 \text{ g}_{\text{malic acid}}/\text{g}_{\text{consumed glucose}}$), so $0.58 \text{ g}/\text{g}_{\text{consumed glucose}}$ of both organic acids, in sum, are produced in these conditions, with malic acid being a coproduct. Malic acid is also obtained from fumaric acid by chemical and biotechnological means, being a food acidifier with a notable market share (10%), due to its high acidity and solubility [18]. These dicarboxylic acids can be separated between them and from glucose by combining adsorption on activated carbon, where fumaric acid can be recovered up to 200 mg/g of solid, followed by the removal of the adsorbed acid with acetone [30,31].

Finally, the maximum specific fungal growth rate could be compared with values found in the literature. Values obtained during this research are very similar but slightly lower to those in similar papers [19].

Regarding Table 3, where the values of the goodness-of-fit parameters are collected, it is remarkable how low the values of SSR and RMSE are, highlighting the low accumulative error present in the model. The value of F_{95} is high compared with tabulated values at 95% confidence, confirming the good fit of the model and its statistical significance (i.e., the null hypothesis is overcome and the mathematical model significantly fits the experimental data). Finally, the value of VE indicates that the model explains almost all the variation of the concentrations of the components with the process time (a 98.12% of this variation).

Table 3. Statistical parameters obtained from fitting experimental data to proposed kinetic model.

Parameter	Value
Degrees of freedom	45
Root Mean Square Error (RMSE)	21.13
F_{95}	37.76
Variation Explained (VE) (%)	98.12
Sum of Squared Residuals (SSR)	359.4

Therefore, we can conclude that the proposed model fits adequately to the experimental data and can explain several trends that were observed. In this way, further studies about fumaric acid production maximization, looking for the minimization of by-products (malic acid overall), will show,

by comparison of the kinetic parameters coming from the application of this, or similar, models, how such improvements are reflected in them. This would facilitate the scaling-up of the process, progressively including the effects of relevant physical phenomena not influencing lower scales and the effect of including new, and more economical, carbon sources from food waste hydrolysates.

4. Conclusions

In this study, a preliminary search for an adequate biomass and inoculum conditions permits to conclude that only one phase of the inoculum development is adequate to reach suitable fumaric acid yields and should be started with 10^9 spores/L, that grow into pellets at 34 °C for 12 h to reach a pH slightly higher than 2. When 0.154 g/L of the biomass are inoculated in medium C, fumaric and malic acid are coproduced from 120 g/L glucose, reaching 30 and 25 g/L of each dicarboxylic acid, respectively. A simple kinetic model with a logistic equation for the biomass growth and potential kinetic equations for the substrate and the products, including the less produced succinic acid, fits well to the data from several production experiments in medium C at 34 °C, according to all goodness-of-fit parameters used in this study. The model, and a previously set reaction scheme, show that most glucose is used for biomass maintenance, but yields to fumaric and malic acid are appreciable.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2227-9717/8/2/188/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, V.E.S. and M.L.; data curation, V.M.-D. and M.L.; formal analysis, V.E.S.; funding acquisition, V.E.S. and M.L.; investigation, V.M.-D., L.B.-S. and N.M.-P.; methodology, V.M.-D., L.B.-S., N.M.-P. and V.E.S.; project administration, M.L.; software, V.M.-D. and M.L.; supervision, V.E.S.; validation, M.L.; writing—original draft, V.M.-D. and M.L.; writing—review and editing, V.E.S. and M.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research has been funded by the Spanish Science Innovation and Universities Ministry through contract CTQ2017-84963-C2-1-R and scholarship PRE2018-084908.

Acknowledgments: We also express our gratitude to Laslo Eidt, Anja Kuenz, and Ulf Pruesse for their generous support in the development of the bioprocess through numerous discussions and counsel and for supplying the strain NRRL 1526 of *Rhizopus arrhizus*.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Nomenclature

C_G	Glucose concentration (g_{glucose}/L)
C_x	Biomass concentration (g_{biomass}/L)
C_{x_m}	Biomass concentration at stationary phase (logistic equation parameter) (g_{biomass}/L)
F_{95}	Fisher distribution parameter with 95% confident
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
t	Time (h)
m_S	Reaction rate coefficient of maintenance reaction ($L \cdot h^{-1} \cdot g_{\text{biomass}}^{-1}$)
k_F	Reaction rate coefficient of fumaric acid production ($g_{\text{fumaric acid}} \cdot L \cdot h^{-1} \cdot g_{\text{glucose}}^{-1} \cdot g_{\text{biomass}}^{-1}$)
k_M	Reaction rate coefficient of malic acid production ($g_{\text{malic acid}} \cdot L \cdot h^{-1} \cdot g_{\text{glucose}}^{-1} \cdot g_{\text{biomass}}^{-1}$)
k_S	Reaction rate coefficient of succinic acid production ($g_{\text{succinic acid}} \cdot L \cdot h^{-1} \cdot g_{\text{biomass}}^{-1}$)
r_1	Reaction rate of reaction 1 (biomass production) ($g_{\text{biomass}}/(L \cdot h)$)
r_2	Reaction rate of reaction 2 (maintenance reaction) ($-g_{\text{glucose}}/(L \cdot h)$)
r_3	Reaction rate of reaction 3 (fumaric acid production) ($g_{\text{fumaric acid}}/(L \cdot h)$)
r_4	Reaction rate of reaction 4 (malic acid production) ($g_{\text{malic acid}}/(L \cdot h)$)
r_5	Reaction rate of reaction 5 (succinic acid production) ($g_{\text{succinic acid}}/(L \cdot h)$)
RMSE	Root Mean Squared Error
R_F	Reaction rate of fumaric acid production ($g_{\text{fumaric acid}}/(L \cdot h)$)
R_G	Reaction rate of glucose consumption ($g_{\text{glucose}}/(L \cdot h)$)
R_M	Reaction rate of malic acid production ($g_{\text{malic acid}}/(L \cdot h)$)
R_S	Reaction rate of succinic acid production ($g_{\text{succinic acid}}/(L \cdot h)$)
R_X	Reaction rate of biomass production ($g_{\text{biomass}}/(L \cdot h)$)

SSR	Sum of Squared Residuals
Y_{GF}	Glucose consumption to fumaric acid production parameter ($g_{\text{glucose}}/g_{\text{fumaric acid}}$)
Y_{GM}	Glucose consumption to malic acid production parameter ($g_{\text{glucose}}/g_{\text{malic acid}}$)
Y_{GS}	Glucose consumption to succinic acid production parameter ($g_{\text{glucose}}/g_{\text{succinic acid}}$)
Y_{GX}	Glucose consumption to biomass production parameter ($g_{\text{glucose}}/g_{\text{biomass}}$)
Y_{MX}	Malic acid production associated to biomass growth parameter ($g_{\text{malic acid}}/g_{\text{biomass}}$)
VE	Variation Explained (%)
WWII	World War II
μ	Specific growth rate (h^{-1})

References

- Parajuli, R.; Dalgaard, T.; Jørgensen, U.; Adamsen, A.P.S.; Knudsen, M.T.; Birkved, M.; Gylling, M.; Schjørring, J.K. Biorefining in the prevailing energy and materials crisis: A review of sustainable pathways for biorefinery value chains and sustainability assessment methodologies. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2015**, *43*, 244–263. [\[CrossRef\]](#)
- Moncada, B.J.; Aristizábal, M.V.; Cardona, A.C.A. Design strategies for sustainable biorefineries. *Biochem. Eng. J.* **2016**, *116*, 122–134. [\[CrossRef\]](#)
- Nanda, S.; Rana, R.; Sarangi, P.K.; Dalai, A.K.; Kozinski, J.A. A broad introduction to first-, second-, and third-generation biofuels. *Recent Adv. Biofuels Bioenergy Util.* **2018**, 1–25. [\[CrossRef\]](#)
- Straathof, A.J.J.; Wahl, S.A.; Benjamin, K.R.; Takors, R.; Wierckx, N.; Noorman, H.J. Grand Research Challenges for Sustainable Industrial Biotechnology. *Trends Biotechnol.* **2019**, *37*, 1042–1050. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Esteban, J.; Ladero, M. Food waste as a source of value-added chemicals and materials: A biorefinery perspective. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2018**, *53*, 1095–1108. [\[CrossRef\]](#)
- Sebastian, J.; Hegde, K.; Kumar, P.; Rouissi, T.; Brar, S.K. Bioproduction of fumaric acid: An insight into microbial strain improvement strategies. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2019**, *39*, 817–834. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Sheppard, P.; Garcia-Garcia, G.; Angelis-Dimakis, A.; Campbell, G.M.; Rahimifard, S. Synergies in the co-location of food manufacturing and biorefining. *Food Bioprod. Process.* **2019**, *117*, 340–359. [\[CrossRef\]](#)
- Martin-Dominguez, V.; Estevez, J.; De Borja Ojembarrena, F.; Santos, V.E.; Ladero, M. Fumaric acid production: A biorefinery perspective. *Fermentation* **2018**, *4*, 33. [\[CrossRef\]](#)
- Roa Engel, C.A.; Straathof, A.J.J.; Zijlmans, T.W.; Van Gulik, W.M.; Van Der Wielen, L.A.M. Fumaric acid production by fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *78*, 379–389. [\[CrossRef\]](#)
- Werpy, T.; Petersen, G. *Top Value Added Chemicals from Biomass Volume I—Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas Energy Efficiency and Renewable Energy*; Northwest Natl. Lab.: Golden, CO, USA, 1992.
- Figueira, D.; Cavalheiro, J.; Sommer Ferreira, B. Purification of polymer-grade fumaric acid from fermented spent sulfite liquor. *Fermentation* **2017**, *3*, 13. [\[CrossRef\]](#)
- Papadaki, A.; Papapostolou, H.; Alexandri, M.; Kopsahelis, N.; Papanikolaou, S.; de Castro, A.M.; Freire, D.M.G.; Koutinas, A.A. Fumaric acid production using renewable resources from biodiesel and cane sugar production processes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 35960–35970. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Rhodes, R.A.; Moyer, A.J.; Smith, M.L.; Kelley, S.E. Production of fumaric acid by *Rhizopus arrhizus*. *Appl. Microbiol.* **1959**, *7*, 74–80. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Rhodes, R.A.; Lagoda, A.A.; Misenheimer, T.J.; Smith, M.L.; Anderson, R.F.; Jackson, R.W. Production of Fumaric Acid in 20-Liter Fermentors. *Appl. Microbiol.* **1962**, *10*, 9–15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ling, L.; Ng, T. Fermentation Process for Carboxylic Acids. US Patent 4,877,731, 31 October 1989.
- Xu, Q.; Li, S.; Huang, H.; Wen, J. Key technologies for the industrial production of fumaric acid by fermentation. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 1685–1696. [\[CrossRef\]](#)
- Eidt, L.; Kuenz, A.; Prüße, U. Biotechnologische produktion von fumarsäure: Prozessoptimierung und kontrolle der morphologie. *Chemie Ing. Technik* **2018**, *90*, 1272. [\[CrossRef\]](#)

18. Naude, A.; Nicol, W. Malic acid production through the whole-cell hydration of fumaric acid with immobilised *Rhizopus oryzae*. *Biochem. Eng. J.* **2018**, *137*, 152–161. [[CrossRef](#)]
19. Sun, C.; Xu, L.; Chen, X.; Qiu, T.; Zhou, T. Sustainable recovery of valuable metals from spent lithium-ion batteries using DL-malic acid: Leaching and kinetics aspect. *Waste Manag. Res.* **2018**, *36*, 113–120. [[CrossRef](#)]
20. Pinto Carneiro, S.; Moine, L.; Tessier, B.; Nicolas, V.; dos Santos, O.; dos Santos, D.H.; Fattal, E. Pyrazinoic acid-Poly(malic acid) biodegradable nanoconjugate for efficient intracellular delivery. *Precis. Nanomed.* **2019**, *2*, 303–317. [[CrossRef](#)]
21. Castro, V.I.; Mano, F.; Reis, R.L.; Paiva, A.; Duarte, A.R.C. Synthesis and physical and thermodynamic properties of lactic acid and malic acid-based natural deep eutectic solvents. *J. Chem. Eng. Data* **2019**, *63*, 2548–2556. [[CrossRef](#)]
22. Naude, A.; Nicol, W. Fumaric acid fermentation with immobilised *Rhizopus oryzae*: Quantifying time-dependent variations in catabolic flux. *Process Biochem.* **2017**, *56*, 8–20. [[CrossRef](#)]
23. Zhang, K.; Yang, S.T.; Chalmers, J.J.; Wood, D. Fumaric Acid Fermentation by *Rhizopus oryzae* with Integrated Separation Technologies. Ph.D. Thesis, The Ohio State University, Columbus, OH, USA, 2012; pp. 1–210.
24. Acedos, M.G.; Ramon, A.; de la Morena, S.; Santos, V.E.; Garcia-Ochoa, F. Isobutanol production by a recombinant biocatalyst *Shimwellia blattae* (p424IbPSO): Study of the operational conditions. *Biochem. Eng. J.* **2018**, *133*, 21–27. [[CrossRef](#)]
25. De la Morena, S.; Acedos, M.G.; Santos, V.E.; Garcia-Ochoa, F. Dihydroxyacetone production from glycerol using *Gluconobacter oxydans*: Study of medium composition and operational conditions in shaken flasks. *Biotechnol. Prog.* **2019**, *35*, e2803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. De la Torre, I.; Ladero, M.; Santos, V.E. Production of d-lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* from orange peel waste: Techno-economical assessment of nitrogen sources. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 10511–10521. [[PubMed](#)]
27. Zhang, K.; Yu, C.; Yang, S.T. Effects of soybean meal hydrolysate as the nitrogen source on seed culture morphology and fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*. *Process Biochem.* **2015**, *50*, 173–179. [[CrossRef](#)]
28. Papadaki, A.; Androutsopoulos, N.; Patsalou, M.; Koutinas, M.; Kopsahelis, N.; de Castro, A.M.; Papanikolaou, S.; Koutinas, A.A. Biotechnological production of fumaric acid: The effect of morphology of *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582. *Fermentation* **2017**, *3*, 33. [[CrossRef](#)]
29. Zhou, Z.; Du, G.; Hua, Z.; Zhou, J.; Chen, J. Optimization of fumaric acid production by *Rhizopus delemar* based on the morphology formation. *Biores. Technol.* **2011**, *102*, 9345–9349. [[CrossRef](#)]
30. Zhang, K.; Zhang, L.; Yang, S.T. Fumaric acid recovery and purification from fermentation broth by activated carbon adsorption followed with desorption by acetone. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2014**, *53*, 12802–12808. [[CrossRef](#)]
31. Cao, N.; Du, J.; Gong, C.S.; Tsao, G.T. Simultaneous production and recovery of fumaric acid from immobilized *Rhizopus oryzae* with a rotary biofilm contactor and an adsorption column. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 2926–2931. [[CrossRef](#)]



Anexo III

Título: Production of fumaric acid by *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526: A simple production medium and the kinetic modelling of the bioprocess.

Autores: Víctor Martín-Domínguez, Paula I. Alemán-Cabrera, Laslo Eidt, Ulf Pruesse, Anja Kuenz, Miguel Ladero y Victoria E. Santos.

Revista: *Fermentation* (2022). 8, 64.

DOI: 10.3390/fermentation8020064.

Article

Production of Fumaric Acid by *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526: A Simple Production Medium and the Kinetic Modelling of the Bioprocess

Victor Martin-Dominguez¹, Paula I. Aleman Cabrera¹, Laslo Eidt², Ulf Pruesse², Anja Kuenz², Miguel Ladero^{1,*} and Victoria E. Santos¹ 

¹ FQPIMA Group, Materials and Chemical Engineering Department, Chemical Science School, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain; vmdominguez@ucm.es (V.M.-D.); paulalem@ucm.es (P.I.A.C.); vesantos@ucm.es (V.E.S.)

² Thünen Institute of Agricultural Technology, 38116 Braunschweig, Germany; lasloeidt@gmx.de (L.E.); ulf.pruesse@thuenen.de (U.P.); anja.kuenz@thuenen.de (A.K.)

* Correspondence: mladero@quim.ucm.es

Abstract: Fumaric acid is a promising monomer to obtain biomass-based polyesters and polyamides, and it is mainly produced by fungi of the *Rhizopus* genus in medium to high titers. The use of glucose, a main component of starchy and cellulosic food waste, as carbon source, together with a low-nitrogen source concentration, is a promising route to reduce process costs. In this work, the effects of nitrogen and carbonate sources on *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526 morphology and fumaric acid productivity were analysed, simplifying the traditional production broth composition. Moreover, a non-structured, non-segregated kinetic model was proposed and fitted to concentration data of all relevant components obtained in batches performed in triplicate with the selected production broth at 34 °C and 200 rpm in an orbital shaker.

Keywords: fumaric acid; *Rhizopus arrhizus*; kinetic modelling; fermentation



Citation: Martin-Dominguez, V.; Cabrera, P.I.A.; Eidt, L.; Pruesse, U.; Kuenz, A.; Ladero, M.; Santos, V.E. Production of Fumaric Acid by *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526: A Simple Production Medium and the Kinetic Modelling of the Bioprocess. *Fermentation* **2022**, *8*, 64. <https://doi.org/10.3390/fermentation8020064>

Academic Editors: Ana Susmozas and Aleta Duque

Received: 23 December 2021

Accepted: 26 January 2022

Published: 30 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Fumaric acid has been designated by the US Department of Energy (DOE) as one of the top 12 value chemicals to be produced from biomass [1,2]. In addition, the production of this acid by a fermentative process that can be implemented in a multi-feedstock biorefinery contributes to the development of the circular economy and bioeconomy [3].

The IUPAC name of fumaric acid is (2E)-But-2-enedioic acid, being a dicarboxylic acid with a double bond between C2 and C3, as well as the trans-isomer of maleic acid. This particular fact provides certain specific properties, such as a high melting temperature or a very low water solubility (7 g/L at 25 °C) [4].

Although the acid is widely used as an acidulant in the food and feed industries [4], a promising industrial application is as chemical building block, being the raw material to obtain several resins and polyamides [4,5]. In recent years, new applications for this acid have been developed, such as a supplement for cattle feeding, reducing up to 70% methane emissions [6]; in new biopolymers; and as a crosslinker for packaging materials, providing more sturdiness and modifying swelling and mechanical behaviour of hydrogels [7,8]. In medicine, fumaric acid and its esters are used as an active ingredient against the skin disease psoriasis and multiple sclerosis (encephalomyelitis disseminata), a chronic inflammatory autoimmune disease of the nervous system [9,10].

Biotechnological production of fumaric acid via fermentation is a process that was studied and developed in the 1950s [11]. However, fermentative production was substituted by more profitable processes based on fossil resources. In recent years, the interest for fermentative production of fumaric acid has increased through the concept of biorefinery,

obtaining fumaric acid as a raw material along from food or agri-food industries-derived wastes [8,12,13]. Glucose is the main component in this kind of waste [14,15]. For this reason, the present study uses glucose as substrate to generate deeper knowledge about this process, seeking further development of the biorefinery process.

Filamentous fungi are considered as the best fumaric acid producers, standing out among *Rhizopus* spp. [4,8]. These microorganisms are employed in several industrial processes, such as the production of antibiotics, amino acids, biopolymers and carboxylic acids [2]. Classical operation modes are implemented at the industrial scale, such as submerged and solid state fermentation, while others are being actively researched, as is the case of simultaneous saccharification and fermentation [4,16].

The development and growth of filamentous fungi occurs on hyphae, generating different morphologies [4,5]. These morphologies are an indicator of the metabolic and cellular states, influencing the fungal production profile [17]. In fact, fungal morphology can be controlled through certain process conditions such as agitation or aeration rates [17–19], spore initial concentration [7] or supplementary nitrogen sources [5]. This morphological growth generates certain technical problems such as low oxygen transfer or high broth viscosity, with the precise quantification of the viable biomass being very complex.

For controlling the fungal morphology, several authors have immobilised the microorganism on different supports, from synthetic ones such as polypropylene [20] to natural carriers such as loofah fibres [21]. Using these immobilized biocatalysts, several operation regimes have been tested, such as the continue regime on tubular reactors or batch operation on stirred tanks. In these bioprocesses, different support configurations have been employed, such as small particles to generate pellets or direct mycelium attachment on fibrous structures or surfaces [20,21]. In the present study, the effect of several operation conditions on morphology were studied, including the selection of a proper diameter of CaCO₃ used as CO₂ supplier and pH controller [22].

Fungal metabolism generates fumaric acid through two different pathways. One pathway is the Tricarboxylic Acids cycle (TCA), common in all eukaryotic organisms. Fumaric acid produced by the TCA cycle is an intermediate and is not excreted outside of mitochondria [22–24]. The second pathway is the reductive TCA cycle (carried out in cytosol) [14], which is responsible for fumaric acid overproduction on filamentous fungi [14,22,25]. This latter pathway requires CO₂ fixation. Either the presence of the gaseous compounds by direct feed or the addition of a carbonate, mainly CaCO₃, is critical for the production of fumaric acid [26].

Several studies have concluded that nitrogen-limiting conditions increase fumaric acid yield [5,23,26]. Therefore, the nitrogen concentration in the broth must be followed to understand its consumption and influence over the productive profile, morphology and cell viability. Moreover, there is an evident lack of kinetic models regarding fumaric acid production. Only some kinetic studies have been published, mainly focused on yields calculation [20,27]. Kinetic models, starting from the relatively simple (as non-structured, non-segregated macroscopic kinetic models), can help to achieve an in-depth understanding of how operation conditions affect the bioprocess, as well as the external and internal dynamic phenomena, including cell metabolic reactions and their rates.

The objective of this work is to maximize the production of fumaric acid while simplifying the composition of the production broth, including the nitrogen sources. In addition, this work aims to provide a non-structured, non-segregated kinetic model able to explain and simulate the development and behaviour of the fungi on fumaric acid production. For this purpose, an analysis of nitrogen consumption and assimilation on the biomass was performed to understand how it affects fungal growth and viability.

2. Materials and Methods

2.1. Microorganism and Stock Elaboration

Rhizopus arrhizus NRRL 1526 was selected by screening for fumaric acid production. It was provided by the Agriculture Research Service culture collection (NRRL). It was

received as a lyophilus, and was rehydrated and cultured on agar plates with PDA (potato dextrose agar) medium for 5 days at 34 °C to achieve proper growth and sporulation. After sporulation, spores were extracted and later quantified using a Neubauer chamber. The obtained individual doses of stock were conserved on a 20% *w/w* glycerol/saline solution at −80 °C.

2.2. Media and Culture Conditions

In the present study, some process conditions selected by previous researchers were applied [7]. All experiments were performed at 34 °C and 200 rpm, with an initial spore concentration of 10⁹ spores/L on the inoculum, using 100 mL non-baffled Erlenmeyer flasks with 20 mL of each culture medium with cellulose covers [7]. To start each production run, the initial inoculum volume transferred to production medium was 10% *v/v*, using the inoculum culture obtained after 12 h in the aforementioned conditions. All experiments were performed in triplicate [7].

As previously described, the bioprocess was divided into two in-series stages: inoculum production and acid production. The inoculum stage is focused on the obtention of a fungal biomass with a proper morphology and optimal metabolic state [7]. This stage requires a medium specifically designed for fungal growth (inoculum medium) [11], which was modified by previous researchers to allow a free pH evolution for reaching the appropriate pellet morphology [7]. Its composition is described in Table 1.

Table 1. Composition of the culture media.

Component	Inoculum Medium (g/L) [7]	Production Medium (g/L) [28]
Glucose	40	130
(NH ₄) ₂ SO ₄	4	1.8 ¹
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0.4	0.4
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0.044	0.44
KH ₂ PO ₄	1.6	0.3
FeCl ₃ × 6 H ₂ O	0.0075	0.0075
Tartaric acid	-	0.0075 ²
CaCO ₃	-	50 ¹
Corn steep liquor (CSL)	0.5 mL/L	0.5 mL/L ²

¹ (NH₄)₂SO₄ and CaCO₃ concentrations were modified in different experiments; ² Tartaric acid and CSL contents were removed from the production medium in certain experiments

The medium employed in the production stage was a consolidated benchmark medium used in several studies [7,28,29]. In the present study, this production medium was modified to enhance fumaric acid production, as shown in Table 1.

2.3. Carbonate Characterization

To control fungal morphology during the bioprocess, different types of calcium carbonate have been tested to determine the effect of different particle sizes and shapes or any slight compositional variation due to micronutrients [30].

To this end, Scanning Electron Microscopy with Energy Dispersion Spectroscopy (SEM-EDS) was applied using a JEOL JSM 6335F microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). Several high-resolution images for crystallization system and particle size characterization, alongside with local elemental composition analysis of the samples, were obtained.

To further determine the particle average size and its dispersion, the Focused Beam Reflectance Measurement (FBRM) technique was employed to measure the chord length of CaCO₃ particles using a Particle Track 400 probe (PT400, Mettler-Toledo, Coslada, Madrid, Spain). This probe was equipped with a rotating laser beam, which was emitted to suspension and through the reflection time when laser beam interacted with every particle. Knowing the rotation speed, the chord length was calculated. Later, using a specific software, the particle size was determined using regression models [31,32].

In this way, a particle size distribution can be obtained for analysis, and the average particle diameter can be calculated.

2.4. Biomass Characterization

Due to the filamentous nature of the fungi, its biomass must be quantified using cell dry weight determination. For this purpose, the working protocol “one flask, one sample” was developed, where each sample taken is the whole content of one flask [7]. In the present work, the biomass was not only quantified but its structure and composition were investigated by several techniques.

Lyophilised biomass was analysed through SEM-EDS, using the same device as in calcium carbonate characterization. We obtained a high-resolution images for surface characterization (SEM), which was complemented with a semiquantitative composition determination (EDS).

In addition, the biomass composition was exactly determined by elemental micro-analysis, conducted with an elemental microanalyzer LECO CHNS-932, which provides accurate results about the elemental composition of the fungal biomass.

To use both characterization techniques, the biomass must be completely lyophilized. For this purpose, the biomass was separated from the fermentation broth by centrifugating each flask content 3 times at 8,500 rpm, with a thorough washing. Next, the biomass was frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h and subsequently lyophilized for 5 days. Finally, it was very finely grinded and analysed.

2.5. Sample Analysis

Substrates and metabolic products concentration obtained from production experiments were determined by HPLC using a modular device (Jasco PU-2089, AS-2059, CO-2060, RI-2031 & MD-2015, Jasco Corporation Ishikawamachi Hachioji-shi, Tokyo Japan), employing a REZEX ROA-Organic Acid H^+ column and H_2SO_4 0.005 M as mobile phase at 0.5 mL/min and $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Fumaric acid was quantified using a diode array detector (Jasco MD-2015) at a wavelength of 250 nm, while the concentration of all other existing substances on liquid samples, such as glucose, ethanol and malic acid, were measured by refractive index detector (Jasco RI-2031).

Bradford assays were performed to determine the soluble protein content in fermentation broth [33].

In addition, the sample pH and ammonia concentration were determined through a pH-meter Hanna Instruments HI-5521 (Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA), using specific probes for pH (Hanna Instruments HI-1131) and ammonia concentration (Hanna Instruments HI-4101) determinations.

2.6. Mathematical Procedures

Specific software, namely Aspen Custom Modeller V10[®] (ACM) (Aspen Technology, Inc., Bedford, MA, USA) and OriginLab 2019[®] (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) was used to perform fitting to different non-structured, non-segregated kinetic models. Mathematic methods for nonlinear fitting based on the Levenberg–Marquardt algorithm, combined with numeric integration by Euler method, were used.

The proposed kinetic models are described in Section 3.2. For the selection of the most suitable model for the experimental data, several statistical parameters were considered. Root Mean Square Error (RMSE) is a parameter to minimize because its value is a measure of the error between the experimental and estimated data. On the other hand, F_{95} is a parameter to maximize, meaning the fitting of the data to a Fisher-Snedecor distribution in a 95% confidence must be always over a critical value (theoretical, tabulated) [34,35].

Finally, the percentage of variation explained (%VE) presents how suitable the model is to explain the evolution of the variables with time. Its value must be the closest possible to 100% [34,36].

3. Results and Discussion

3.1. Medium Simplification

The first objective was to improve the production yield through the modification of the classical production medium [26].

Calcium carbonate concentration was initially studied to solve certain solidification problems found in several runs. The presence of CaCO_3 has been confirmed to be essential for fumaric acid production by previous studies [7], because CO_2 must be provided to the TCA reductive pathway and pH must be controlled between 7.0 and 5.5, avoiding very acid pH values.

It can be seen how a moderate reduction of CaCO_3 composition (from 50 to 35 g/L) led to a similar fumaric acid concentration, even if a decrease of 15 g/L was performed, while the creation of solid deposits was avoided (Figure 1). At the same time, the pH decrease was slow during the process, only reaching pH values lower than 5 at the last hours of the process due to the high fumaric acid concentrations reached.

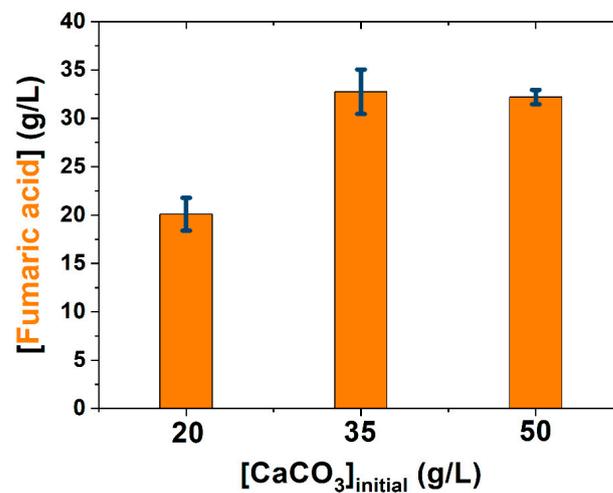


Figure 1. Effect of reducing the CaCO_3 ($d_p = 57.77 \mu\text{m}$) composition.

Furthermore, CaCO_3 particle diameter was studied to determine the development of a proper morphology. At the same time, the possible effects of minor components of the salt and the shape of the crystals were analysed. In Figure 2A, the particle size distribution of two different kinds of calcium carbonate obtained by FBRM measurements can be observed, obtaining the average diameter of the particles. These results, combined with those from Figure 2B, show how a smaller particle size enhanced the fumaric acid yield. Depending on the particle size of CaCO_3 , different pellet sizes (and even morphologies) of *R. arrhizus* occurred. Using CaCO_3 , which has the smallest particle size, the best production of fumaric acid was reached.

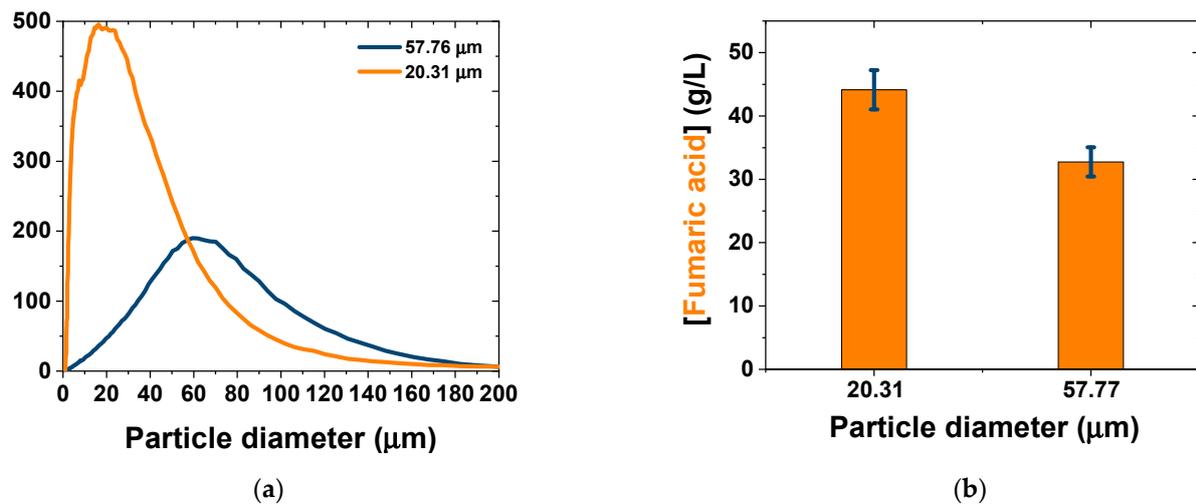


Figure 2. (a) Particle size distribution on different kinds of CaCO_3 . (b) Fumaric acid production yield comparison between both kinds of CaCO_3 .

To discern if the composition or shape and size (or both) were the causes of such behaviour, the examined samples were analysed by SEM-EDS. The results are displayed in Figure 3, showing how carbonate crystallization is possibly carried out on different systems (trigonal in Figure 3A, orthorhombic in Figure 3B) and the existence of evident differences regarding the microcrystal size and shape. It is interesting to observe how the CaCO_3 of the class showed in Figure 3B lead to an increase in the fumaric acid production (Figure 3). The final particle size, measured by FDBR, was higher than microcrystals observed by SEM, as they aggregated and formed the particles detected by FBRM.

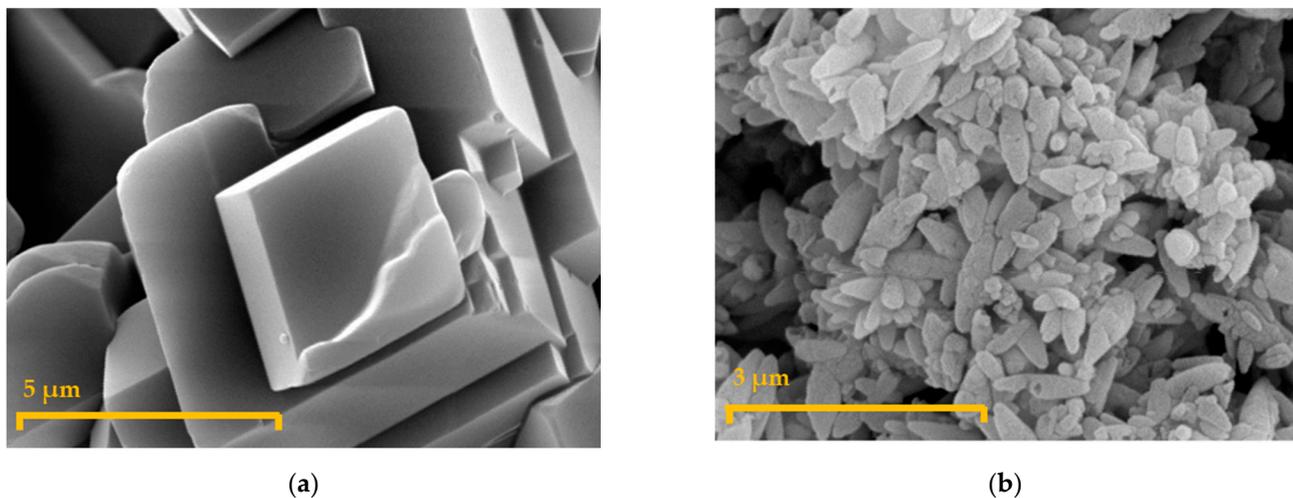


Figure 3. Different crystallization systems and particles shapes on different CaCO_3 types: (a) $d_p = 57.77 \mu\text{m}$, (b) $d_p = 20.31 \mu\text{m}$.

On the other hand, the composition provided from the SEM-EDS analysis showed that the micro composition of both carbonates was very close. Therefore, the differences observed in fumaric acid production were due to the shape and size of the particles and, apparently, not due to their composition.

In view of these results, the following experiments were performed at a reduced calcium carbonate concentration (35 g/L) using a solid with an average particle diameter of 20.3 μm . The particles were aggregations of microcrystals belonging to the orthorhombic system with a length of approximately 1 μm and width of approximately 0.3 μm .

An additional simplification of the production medium was to remove tartaric acid, since its concentration is very low and, a priori, it does not appear to have a great influence on the process. It was described on the reference medium by Ling and Ng in 1989 [28] but it does not appear elsewhere in the literature [26].

As for the nitrogen sources, removing corn steep liquor (CSL) could negatively affect fumaric acid production and fungi's metabolic profile, as it has been demonstrated that different nitrogen sources directly affect fungus morphology [5]. Therefore, CSL was removed only in the production medium but not in the inoculum medium, because, in its presence, pellet morphology with an appropriate size is reached and developed in the inoculum stage, while CSL concentration on the production medium does not appear to have an important role on production stage [5,26].

As can be seen in Figure 4, removing tartaric acid and CSL increased the selectivity of fumaric acid production, shifting a fumaric and malic acids coproduction to a fumaric acid production with a much lower presence of malic acid as a by-product.

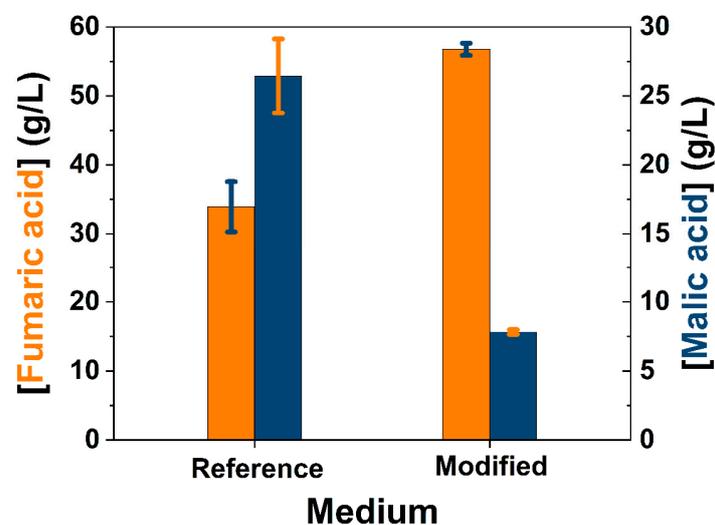


Figure 4. Effect of removal tartaric acid and CSL.

As it has been demonstrated that limited nitrogen conditions increase fumaric acid production on different substances of fungi and yeasts [5,37], different concentrations of the inorganic nitrogen source $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ were tested to find an improved yield of fumaric acid production.

In Figure 5, several final concentrations of fumaric acid are presented when different initial concentrations of ammonium sulphate were used. Lower concentrations of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (not provided) were also tested. However, using initial values under 1.2 g/L modifies the morphology of the fungi change from pellets to clumps, changing the metabolic profile and drastically reducing the fumaric acid production yield (< 10 g/L). Therefore, the final concentration chosen to improve fumaric acid production was 1.2 g/L. This way, the production medium composition was as simple as possible, having an improved result from the reference concentration (1.8 g/L).

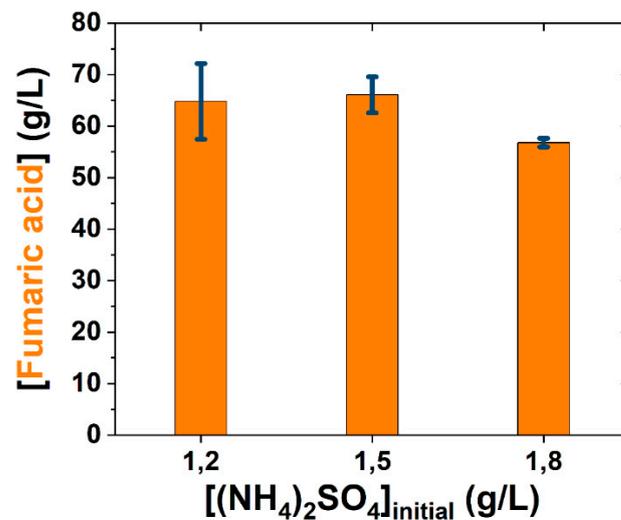


Figure 5. Nitrogen source initial concentration influence on fumaric acid production (5 days).

Once the modifications of the production medium were applied, the fumaric acid yield was very close or higher than those obtained in the literature in batch processes developed in orbital shaken flasks (Table 2). In Table 2, we compiled the results of similar studies where conceptualization, conditions and execution are comparable. Glucose was used as main substrate, and the broth composition was very similar to the one employed in this work. However, some differences are found concerning the nitrogen source, as these studies also focused on the effect of the nitrogen source and content on the fungal morphology and production. These differences in the media composition, together with slight changes in the working procedures (different inocula procedures and pH-controlling strategies), lead to the results shown in Table 2.

There are two different ways to calculate the maximum theoretical yield of fumaric acid depending on the metabolic pathway: (1) The formation of fumaric acid via the TCA cycle enables a theoretical yield of a maximum of 1 mol_{fumaric acid}/mol_{consumed glucose} or 0.64 g_{fumaric acid}/g_{consumed glucose}. (2) Reductive carboxylation provides a maximum yield of 2 mol_{fumaric acid}/mol_{consumed glucose} or 1.29 g_{fumaric acid}/g_{consumed glucose} [38]. In practice, however, a lower yield will be expected, since an exclusive course of the reductive carboxylation would lead to an energy deficit due to the consumption of ATP during the CO₂ fixation. Thus, in the fermentative production of fumaric acid, the oxidative citric acid cycle is also active to maintain the energy balance [39].

Table 2. Overview of the fumaric acid yields based on glucose in the fermentative production of fumaric acid using *Rhizopus* spp.

Reference	N Source	Yield (g _{Fumaric acid} /g _{consumed glucose})	Process Conditions	pH Control	Inoculum	Operation Time (h)
[7]	(NH ₄) ₂ SO ₄ : 1.8 g/L	0.26	[Glucose] ₀ = 130 g/L 200 rpm; 34 °C; pH ≈ 5.5	CaCO ₃ : 50 g/L (d _p = 57.77 μm)	12 h, pH free, 10 ⁶ spores/mL	120
[40]	(NH ₄) ₂ SO ₄ : 0.8 g/L	0.33	[Glucose] ₀ = 130 g/L 220 rpm; 32 °C; pH ≈ 5.5	(NH ₄) ₂ SO ₄ : 2 M (d _p : not specified)	8–10 h, pH controlled, 10 ⁷ spores/mL	120
[41]	CSL: 0.5%	0.43	[Glucose] ₀ = 100 g/L 250 rpm; 35 °C; pH ≈ 6.5	CaCO ₃ : 2% w/w (d _p : not specified)	12 h, pH controlled, 10 ⁷ spores/mL	120
Present study	(NH ₄) ₂ SO ₄ : 1.2 g/L	0.46	[Glucose] ₀ = 130 g/L 200 rpm; 34 °C, pH ≈ 5.5	CaCO ₃ : 35 g/L (d _p = 20.31 μm)	12 h, pH free, 10 ⁶ spores/mL	120

In short, after medium simplification, the production yield clearly increased (from 0.26 to 0.46 g_{Fumaric acid}/g_{consumed glucose}). Therefore, the modified broth was employed for the runs which are the basis of the subsequent kinetic study.

3.2. Kinetic Modelling

The kinetic study was performed by following the concentration of all substances present on the fermentation broth. We proposed an adequate non-structured, non-segregated kinetic model and, finally, fitted a proposed non-structured, non-segregated kinetic model to all retrieved data.

In Figure 6, the average evolution of the relevant substances in the bioprocess, including the biomass, is reflected (runs performed in triplicate). At first glance, an apparent diauxic growth was perceived, with two growing phases in series, as observed by following the dry weight of the solid phases collected during the experiment. Previously, these solids were recognised as biomass [7]. However, the observed behaviour indicates that these collected solids were composed not only of living biomass but also by dead biomass. In addition, these collected solids could also contain a great number of fumaric acid crystals as, due to its very low solubility in water, the acid tends to form crystals above diverse surfaces.

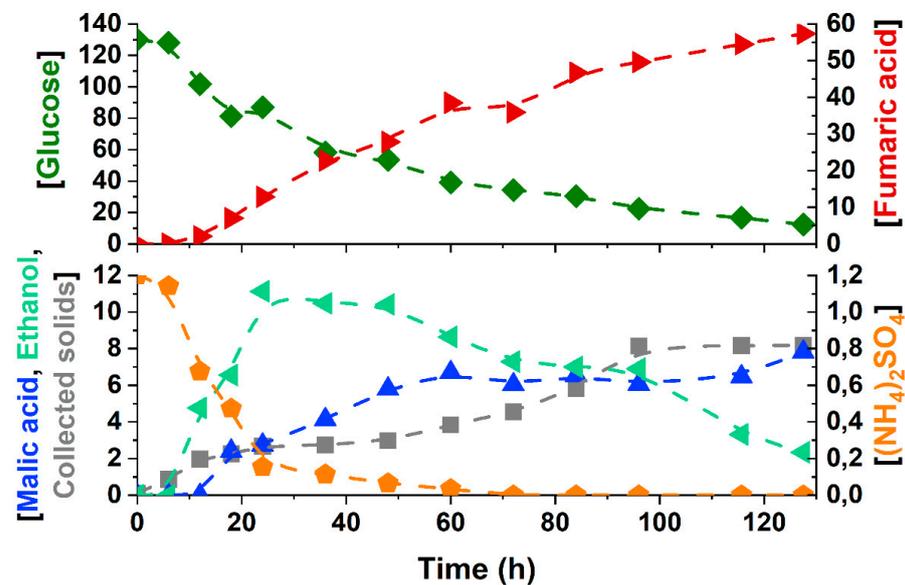


Figure 6. Kinetic evolution of all substances (20 mL shake flask, 200 rpm, 34 °C) (concentration in g/L). (◆) Glucose, (▶) fumaric acid, (◆) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (◀) ethanol, (▲) malic acid, (■) collected solids.

The results shown in Figure 7 indicate that nitrogen source was quickly consumed in the first 72 h, agreeing with the first exponential increase in the collected mass of dry solids. The second increase of the dry weight could be fumaric acid accumulation over the fungal surface as calcium fumarate. At the same time, a certain biomass renovation must have occurred in the context of the stationary phase of growth, although this latter phenomenon should not have affected the total solid mass at a given bioprocess time. Therefore, it is possible to allocate this second growth phase of solids to the fumaric acid accumulation onto mycelium due to the great production yield reached and its low solubility at the operation temperature. In this case, only the first apparent growth could be considered real biomass growth.

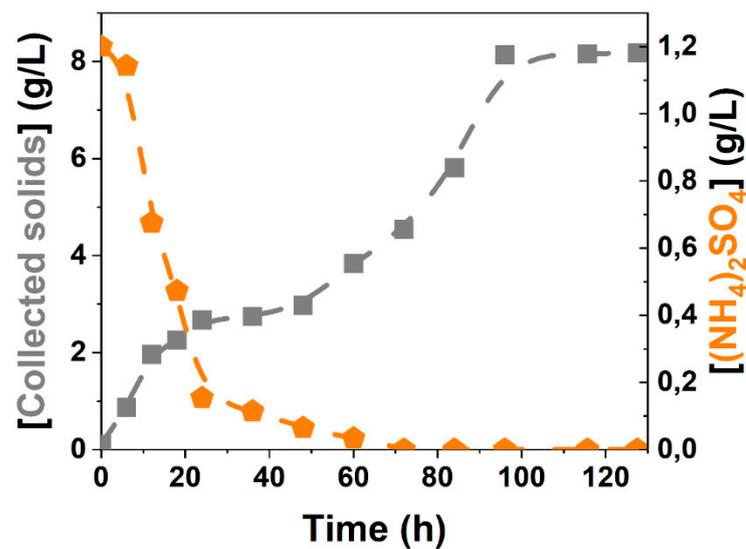


Figure 7. Evolution of the collected solids and nitrogen source during the fermentation process.

To study this hypothesis, a deeper study about nitrogen evolution and biomass composition was conducted. First, we confirmed that no apparent lysis was present by measuring any peptide or protein accumulated in the broth. Thus, a Bradford assay was performed in samples withdrawn during a fermentation process. In this experiment, no significant dissolved protein was measured in the fermentation broth. We observed signals very close to those of the blanks, even below them, suggesting that the soluble protein in the broth was almost absent. In addition, this observation indicates that all nitrogen assimilated by the biomass remained inside the mycelium [42], being recycled within the biomass during the stationary phase.

Second, the fumaric acid accumulation over the mycelium surface was studied through a SEM-EDS analysis. For this purpose, several biomass samples were obtained at several experimental time values and observed, providing high-definition images of hyphae (Figure 8) and an approximate quantification of carbon composition in the biomass. Comparing Figures 8A and 8B, it can be seen how micro crystals were precipitated on the mycelium surface.

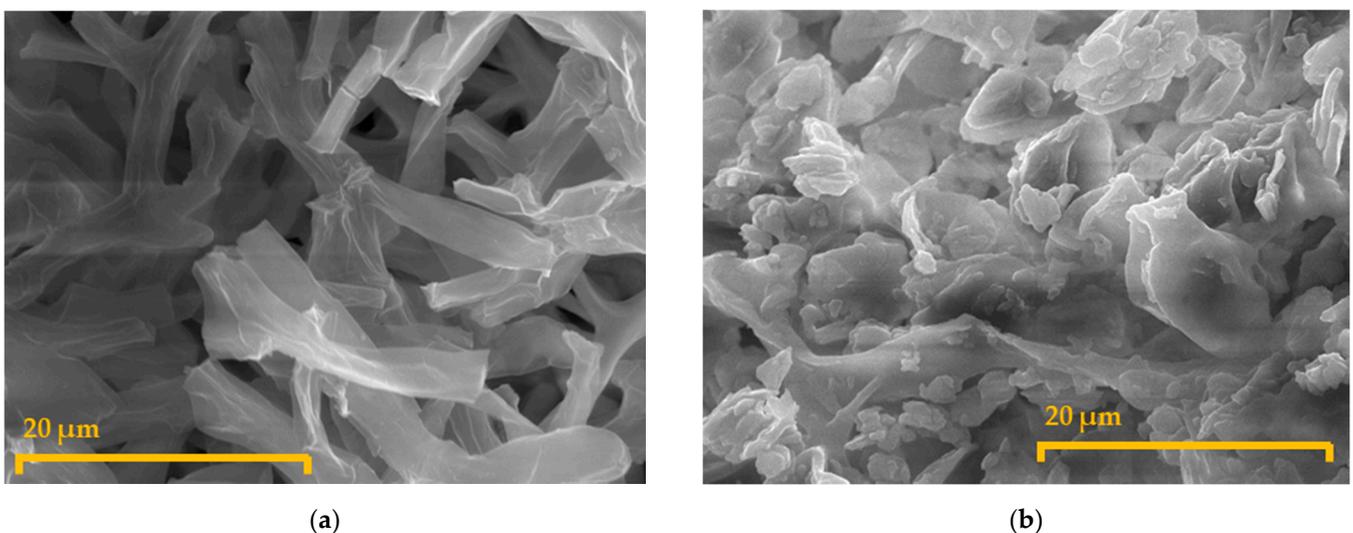


Figure 8. Comparison between initial (a) and final (b) mycelium surface. Small salt (calcium fumarate) crystals can be observed on the mycelium in micrograph B.

However, SEM-EDS provides only morphological and semi-quantitative elemental composition analysis. For more accurate results of biomass elemental composition, an elemental micro-analysis by total combustion was performed on the same biomass samples. The results are compiled in Table 3.

Table 3. Biomass elemental composition during fermentation obtained by microanalysis.

t (h)	C % (±0.35%)	H % (±0.30%)	N % (±0.30%)	S % (±0.35%)	O % ¹	C:N
6	43.04	6.47	10.89	0.54	39.06	3.95
12	44.23	6.66	9.77	0.50	38.84	4.53
18	45.05	6.77	8.85	0.46	38.87	5.09
24	44.37	6.77	8.17	0.40	40.29	5.43
36	45.27	6.86	7.31	0.34	40.22	6.19
48	44.94	6.45	5.57	0.25	42.79	8.07
60	47.96	7.04	6.09	0.28	38.63	7.87
72	46.71	6.42	4.55	0.22	42.10	10.27
84	46.68	6.32	4.49	0.20	42.31	10.39
96	45.38	5.74	3.30	0.15	45.43	13.75
108	44.96	5.57	2.95	0.13	46.39	15.24
120	44.89	5.37	2.39	0.12	47.23	18.78

¹ O percentage values were calculated from the difference from 100 %.

When observing the temporal evolution of the composition of the collected solids, it is evident that the C:N ratio increased as the process proceeded. The nitrogen content on the solid lower increased with time, which confirms the hypothesis that fumaric acid is accumulated in and on the hyphae. This effect can also be observed on the sulphur content, with both (N and S) contents decreasing at the same rate, undoubtedly indicating that the protein quantity was kept constant while the solid composition was enriched only in the C, O and H contents due to the fumaric acid accumulation. For these reasons, the total biomass concentration can be calculated using the assimilated nitrogen content, taking as the value of the solid's composition at 6 h as reference. It could be assumed that all solid at this time was biomass because the fumaric acid was totally dissolved at the low concentration at this time (lower than 1 g/L). Therefore, the solid collected could be considered living biomass.

Using these composition values, the molecular formula of the biomass was $\text{CH}_{1.80}\text{O}_{0.68}\text{N}_{0.22}$. From this average molecular formula and considering that all ammonium consumed from the fermentation broth was fixed and converted into living biomass, its concentration can be calculated (Figure 9), increasing the biomass concentration while ammonium sulphate was consumed, and keeping it constant after ammonium sulphate was totally consumed.

This final constant value of the biomass concentration in the stationary phase was proportional to the initial ammonium concentration. Knowing this concentration and the composition of biomass, the concentration of fungal biomass can be calculated, as shown in Figure 9. These are the average biomass values that will be employed when fitting the kinetic model to the experimental data.

Another aspect remarked previously is the scarce presence of by-products. The malic acid concentration was reduced from 26.4 to 7.8 g/L malic acid through medium improvement, becoming a by-product instead of being a co-product.

The fumaric acid production profile suggests a production that is not associated or partially associated with growth. This association will be considered to propose the kinetic model.

Ethanol is a by-product obtained through the pyruvate-acetaldehyde route [7]. In our results, the behaviour of ethanol is complex. At the beginning, ethanol increases in the same way as biomass, which suggests a production associated with growth. However, at certain moment, its concentration starts to decrease, which could be attributed to evaporation or to its consumption by fungi as an alternative carbon source [20]. This behaviour have been previously observed by other authors [20,43].

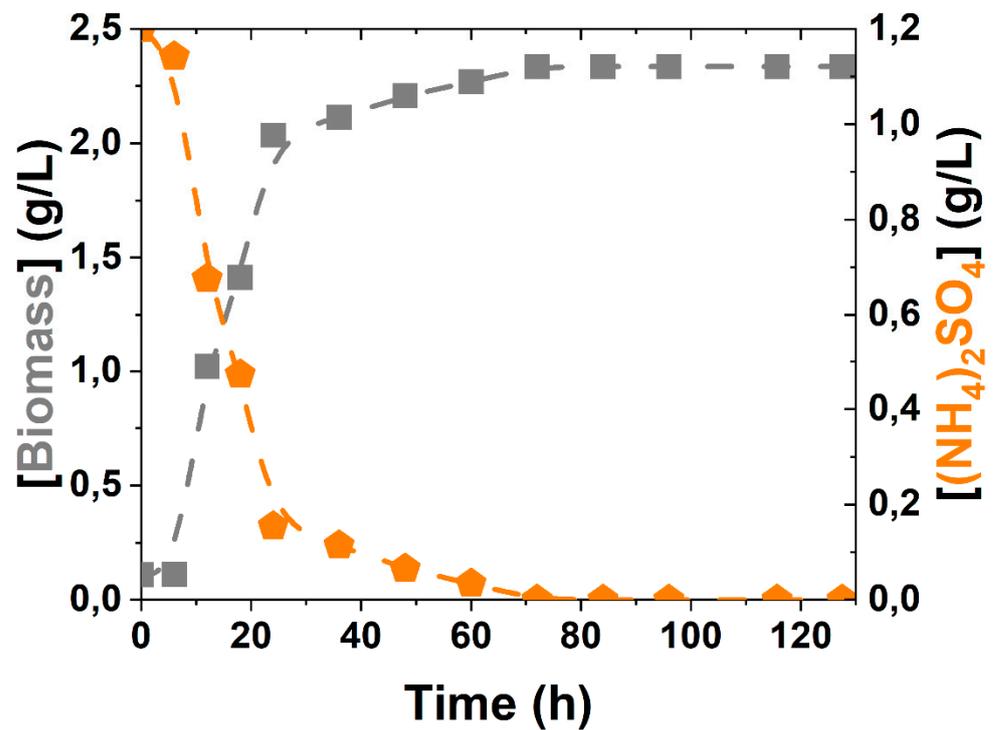


Figure 9. Total biomass calculated from the consumed ammonium sulphate.

To determine the nature of the behaviour of the ethanol, a simulation experiment was performed in the same conditions employed for the fermentation kinetic runs. The results shown in Figure 10 allow us to conclude that the ethanol concentration decreases because of evaporation, a fact that must be considered in the kinetic model, in particular, in the mass balance of ethanol.

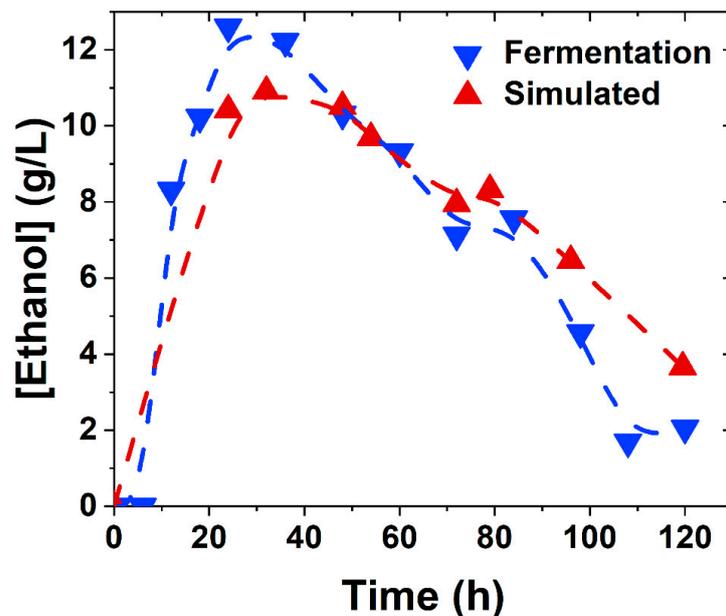


Figure 10. Ethanol evaporation simulation.

After these observations, a reaction scheme to develop the kinetic model was proposed, considering the total biomass production and temporal evolutions of the substrates, products and by-products (see points in Figure 11).

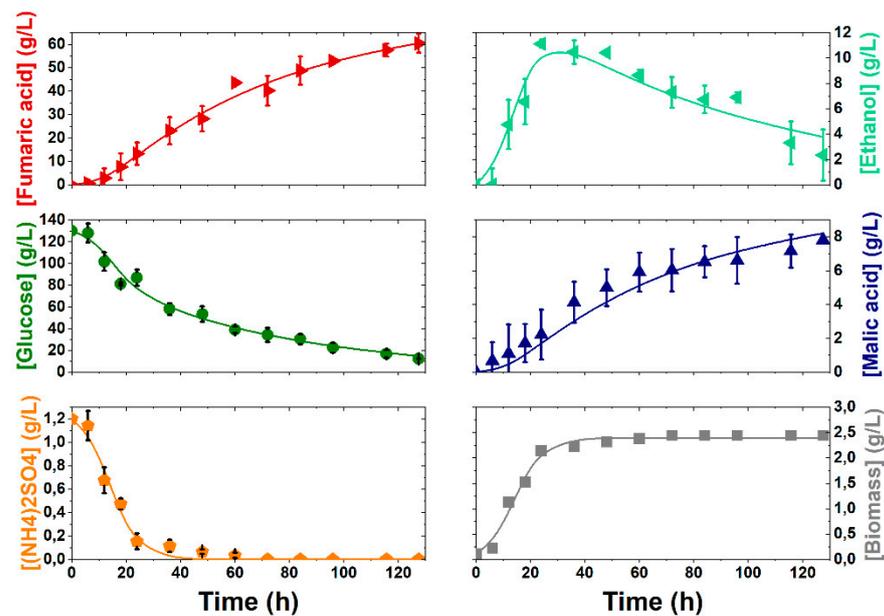


Figure 11. Evolution of different components in the fermentation process and the proposed kinetic modelling.

Other authors have considered three different reactions: Respiration and biomass production, ethanol production and fumaric acid production [20]. In the present study, we considered only two reactions due to the different processes observed in the evolution of the different substances. In particular, we observed a first reaction, reflected in Equation (1), which comprises respiration, in addition to biomass and ethanol productions. These processes are associated with biomass growth.

The second reaction of our model (Equation (2)) describes the TCA reductive pathway, described in Section 1 for producing malic and fumaric acids.



The kinetic model proposed to fit the experimental data is a function of the biomass growth model, as it is usual in non-structured non-segregated kinetic models. An empirical potential model was proposed (Equations (1) and (3)), which is convenient for having only one parameter. The empirical potential model has a growth rate of μ_m , providing a simple model. Once the biomass production model is chosen, the ammonium sulphate consumption rate is defined depending only on the biomass production, linked through a yield, Y_{NX} (Equation (4)). The glucose consumption rate reflects both processes (Equations (1) and (2)), as different terms regarding the glucose consumption to produce biomass (expressed by the yield Y_{GX}) and different products (expressed by the yield Y_{GF}) must be introduced (Equation (5)). Finally, to complete the kinetic model, the production rate of the different products must be proposed. The fumaric acid production rate is defined with a non-associated growth equation (which was tested to be the best fit), where the production rate is completely independent of the biomass growth, and is constantly produced depending on biomass and glucose concentrations with a kinetic parameter for production (k_F), as suggested by Figure 6 (Equations (2) and (6)). Malic and fumaric acids productions evolve almost in parallel, as both of them are produced in the same metabolic pathway (Equation (2)), a reason why, with a certain frequency, *Rhizopus* sp. produces both on a co-production regime [7]. For this reason, the suggested kinetic model involves both acids in the same reaction, linking their production rates with a yield, Y_{MF} (Equations (2) and (7)). Finally, the ethanol rate is defined coupling a kinetic term that is associated with the growth production model through a yield (Y_{EX}) and another term considering ethanol evaporation,

a phenomenon observed and commented on previously. This evaporation term is only dependent on the ethanol concentration, and has an evaporation kinetic parameter (k_E) (Equation (8)).

$$R_X = \frac{d[\text{Biomass}]}{dt} = r_1 \tag{3}$$

$$R_N = \frac{d[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]}{dt} = -Y_{NX} \cdot r_1 \tag{4}$$

$$R_G = \frac{d[\text{Glucose}]}{dt} = -Y_{GX} \cdot r_1 - Y_{GF} \cdot r_3 \tag{5}$$

$$R_F = \frac{d[\text{Fumaric acid}]}{dt} = r_2 \tag{6}$$

$$R_M = \frac{d[\text{Malic acid}]}{dt} = Y_{MF} \cdot r_2 \tag{7}$$

$$R_E = Y_{EX} \cdot r_1 \therefore \frac{d[\text{Ethanol}]}{dt} = Y_{EX} \cdot r_1 - k_E \cdot [\text{Ethanol}] \tag{8}$$

For fitting the proposed kinetic model (Equations (3)–(8)) to the experimental data, coupled non-linear regression and fourth-order Runge-Kutta algorithms implemented in software Aspen Custom Modeler® V11 have been employed, obtaining the value and error interval of the pertinent kinetic parameters, which are compiled in Table 4. The obtained results are represented in Figure 11 (as lines), showing how the proposed model reasonably fits all retrieved kinetic data. Thus, the model seems to be able to predict and simulate all phenomena observed in the process.

Table 4. Kinetic parameters of the proposed model (Equations (1)–(8)) from the data represented on Figures 6 and 9, and the model represented on Figure 11.

Parameter	Units	Value
μ_m	$\frac{\text{L}}{\text{g}_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} \cdot \text{h}}$	$1.69 \cdot 10^{-1} \pm 3.04 \cdot 10^{-3}$
k_F	$\frac{\text{L} \cdot \text{g}_{\text{Fumaric acid}}}{\text{g}_{\text{Biomass}} \cdot \text{g}_{\text{Glucose}} \cdot \text{h}}$	$5.45 \cdot 10^{-3} \pm 2.07 \cdot 10^{-4}$
Y_{MF}	$\frac{\text{g}_{\text{Malic acid}}}{\text{g}_{\text{Fumaric acid}}}$	$1.36 \cdot 10^{-1} \pm 2.81 \cdot 10^{-2}$
Y_{EX}	$\frac{\text{g}_{\text{Ethanol}}}{\text{g}_{\text{Biomass}}}$	$5.87 \pm 9.87 \cdot 10^{-1}$
k_E	h^{-1}	$1.13 \cdot 10^{-2} \pm 3.9210^{-3}$
Y_{NX}	$\frac{\text{g}_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4}}{\text{g}_{\text{Biomass}}}$	$5.26 \cdot 10^{-1} \pm 5.65 \cdot 10^{-3}$
Y_{GX}	$\frac{\text{g}_{\text{Glucose}}}{\text{g}_{\text{Biomass}}}$	19.75 ± 1.59
Y_{GF}	$\frac{\text{g}_{\text{Glucose}}}{\text{g}_{\text{Fumaric acid}}}$	$1.16 \pm 9.19 \cdot 10^{-2}$

Observing the value of the kinetic parameters represented in Table 4, the accurate fitting of the model to the experimental data is also evident, with the model having reasonable values for all parameters with low standard errors. The goodness-of-fit bounty is confirmed when considering the values of the RMSE, F_{95} and the percentage of variation explained (%VE) (Table 5). The high value of F_{95} is remarkable, being much higher than the reference value. The value of %VE, which is being very close to 100%, is also appropriate.

Table 5. Statistical parameters obtained from fitting the proposal model (Equations (1)–(8), Table 4), indicators of the goodness of fit.

Parameter	Value
Degrees of freedom	82
RMSE	3.48
F_{95}	823.74
%VE	98.30

4. Conclusions

The fumaric acid production yield was enhanced through media modification, reaching a simpler composition that provides nitrogen-limiting conditions and can be of importance for the further purification of this dicarboxylic acid [34]. The calcium carbonate particle size and shape have shown to be very important parameters on the development of a proper morphology, having direct effects on the production profile and yield.

As dry weight leads to an apparent diauxic growth that is inconsistent with nitrogen mass balance, a new method for quantifying total biomass based on combining elemental microanalysis and ammonium quantification in the broth was developed and applied. On one hand, biased dry weight measurements are due to the presence of calcium fumarate crystals while, on the other, the application of the new method leads to a constant biomass concentration after the nitrogen source is depleted.

Finally, we proposed a simple non-structured, non-segregated kinetic model for fumaric acid production that was successfully fitted to all experimental data obtained in runs performed with the best production medium composition. The model seems to adequately represent the temporal evolution of all relevant chemical substances, including the corrected fungal biomass.

Author Contributions: Conceptualization, V.M.-D., U.P., L.E., A.K., M.L. and V.E.S.; methodology, V.M.-D., U.P., L.E. and A.K.; investigation, V.M.-D., P.I.A.C., L.E. and A.K.; data curation, V.M.-D. and P.I.A.C.; writing—original draft preparation, V.M.-D.; writing—review and editing, M.L. and V.E.S.; supervision, M.L. and V.E.S.; project administration, U.P., M.L. and V.E.S.; funding acquisition, M.L. and V.E.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Spanish Science and Innovation Ministry through a grant for VMD with reference PRE2018-084908 and through the research project with reference CTQ2017-84963-C2-1-R. This funding is thankfully appreciated. This work was also carried out in the framework of the European Research Area Network for Industrial Biotechnology (ERA-IB project “Fumaric Acid for Polymer Applications (FAPA)”) and was funded by the German Federal Ministry of Food and Agriculture, following a decision of the German Bundestag, via the Agency of Renewable Resources (Grant No. 22029515).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data supporting this paper results are included in this document.

Acknowledgments: We would like to acknowledge the help of Cynthia Hopson and the research group “Development of Processes and Products of Low Environmental Impact” belonging to the Complutense University of Madrid for their collaboration in the lyophilisation process. Likewise, we are very grateful to Patricio Lopez-Exposito and Angeles Blanco, from the research group “Cellulose and Paper” of the same university, for their collaboration on particle size distribution studies. The technical support of Ms. Ana María Vicente (SEM-EDS) and María José Saucedo (Elemental Microanalysis), from the National Center of Electronic Microscopy and the Complutense Microanalysis Facility, respectively, is gratefully acknowledged.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

Abbreviations

Components

CSL	Corn Steep Liquor
E	Ethanol
F	Fumaric acid
G	Glucose
M	Malic acid
N	Ammonium sulphate
PDA	Potato Dextrose Agar medium
X	Biomass

Nomenclature

%VE	Percentage of variation explained
DOE	U. S. Departement Of Energy
dp	Particle diameter
F ₉₅	Parameter of F-test at 95% confident
k _E	Ethanol evaporation parameter
k _F	Fumaric acid production kinetic parameter
RMSE	Root Main Square Error
R _E	Ethanol evolution rate
R _F	Fumaric acid production rate
R _G	Glucose consumption rate
R _M	Malic acid production rate
R _N	Ammonium sulphate consumption rate
R _X	Biomass production rate
TCA	Tri-Carboxylic Acid cycle
Y _{CO2F}	Carbon dioxide-fumaric acid stoichiometric yield
Y _{EX}	Ethanol-biomass stoichiometric yield
Y _{EX}	Ethanol-biomass yield
Y _{GF}	Glucose-fumaric acid stoichiometric yield
Y _{GF}	Glucose- fumaric acid yield
Y _{GX}	Glucose-biomass stoichiometric yield
Y _{GX}	Glucose-biomass yield
Y _{MF}	Malic acid-fumaric acid stoichiometric yield
Y _{MF}	Malic acid-fumaric acid yield
Y _{NX}	Ammonium sulphate-biomass yield
Y _{NX}	Ammonium sulphate-biomass stoichiometric yield
μ _m	Biomass specific growth rate

References

1. Werpy, T.; Petersen, G. *Top Value Added Chemicals from Biomass Volume I—Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas Energy Efficiency and Renewable Energy*; PNLL: Richland, WA, USA, 1992.
2. Jiménez-Quero, A.; Pollet, E.; Zhao, M.; Marchioni, E.; Avérous, L.; Phalip, V. Itaconic and fumaric acid production from biomass hydrolysates by *Aspergillus strains*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *26*, 1557–1565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Esteban, J.; Ladero, M. Food waste as a source of value-added chemicals and materials: A biorefinery perspective. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2018**, *53*, 1095–1108. [[CrossRef](#)]
4. Martin-Dominguez, V.; Estevez, J.; De Borja Ojembarrena, F.; Santos, V.E.; Ladero, M. Fumaric acid production: A biorefinery perspective. *Fermentation* **2018**, *4*, 33. [[CrossRef](#)]
5. Zhang, K.; Yu, C.; Yang, S.T. Effects of soybean meal hydrolysate as the nitrogen source on seed culture morphology and fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*. *Process. Biochem.* **2015**, *50*, 173–179. [[CrossRef](#)]
6. Das, R.K.; Brar, S.K. Enhanced fumaric acid production from brewery wastewater and insight into the morphology of *Rhizopus oryzae* 1526. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, *172*, 2974–2988. [[CrossRef](#)]
7. Martin-Dominguez, V.; Bouzas-Santiso, L.; Martinez-Peinado, N.; Santos, V.E.; Ladero, M. Kinetic Modelling of the coproduction process of fumaric and malic acids by *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526. *Processes* **2020**, *8*, 188. [[CrossRef](#)]
8. Magalhães Júnior, A.I.; Soccol, C.R.; Camara, M.C.; Molina Aulestia, D.T.; de Souza Vandenberghe, L.P.; Cesar de Carvalho, J. Challenges in the production of second-generation organic acids (potential monomers for application in biopolymers). *Biomass Bioenergy* **2021**, *149*, 106092. [[CrossRef](#)]
9. Das, R.K.; Brar, S.K.; Verma, M. *Fumaric Acid*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2016; ISBN 9780128029800.

10. Weißert, R. Multiple Sklerose-Risiken und Nutzen der neuen antiinflammatorischen Substanzen. *J. Neurol. Neurochir. Psychiatr.* **2014**, *16*, 95–101.
11. Rhodes, R.A.; Moyer, A.J.; Smith, M.L.; Kelley, S.E. Production of fumaric acid by *Rhizopus arrhizus*. *Appl. Microbiol.* **1959**, *7*, 74–80. [[CrossRef](#)]
12. Sebastian, J.; Dominguez, K.V.; Brar, S.K.; Rouissi, T. Fumaric acid production using alternate fermentation mode by immobilized *Rhizopus oryzae*-a greener production strategy. *Chemosphere* **2021**, *281*, 130858. [[CrossRef](#)]
13. De la Torre, I.; Martin-Dominguez, V.; Acedos, M.G.; Esteban, J.; Santos, V.E.; Ladero, M. Utilisation/upgrading of orange peel waste from a biological biorefinery perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 5975–5991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Abraham, A.; Moideen, S.K.; Mathew, A.K.; Sr, A.R.; Sindhu, R.; Pandey, A.; Sang, B.-I.; Sukumaran, R.K. Fumaric acid production from sugarcane trash hydrolysate using *Rhizopus oryzae* NIIST 1. *Indian J. Exp. Biol.* **2020**, *58*, 548–556.
15. Papadaki, A.; Papapostolou, H.; Alexandri, M.; Kopsahelis, N.; Papanikolaou, S.; de Castro, A.M.; Freire, D.M.G.; Koutinas, A.A. Fumaric acid production using renewable resources from biodiesel and cane sugar production processes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 35960–35970. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Wakai, S.; Arazoe, T.; Ogino, C.; Kondo, A.; Song, P.; Li, S.; Ding, Y.; Xu, Q.; Huang, H.; Peleg, Y.; et al. Future insights in fungal metabolic engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *115*, 49–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Papadaki, A.; Androutsopoulos, N.; Patsalou, M.; Koutinas, M.; Kopsahelis, N.; de Castro, A.M.; Papanikolaou, S.; Koutinas, A.A. Biotechnological production of fumaric acid: The effect of morphology of *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582. *Fermentation* **2017**, *3*, 33. [[CrossRef](#)]
18. Yu, S.; Huang, D.; Wen, J.; Li, S.; Chen, Y.; Jia, X. Metabolic profiling of a *Rhizopus oryzae* fumaric acid production mutant generated by femtosecond laser irradiation. *Bioresour. Technol.* **2012**, *114*, 610–615. [[CrossRef](#)]
19. Liu, Y.; Xu, Q.; Lv, C.; Yan, C.; Li, S.; Jiang, L.; Huang, H.; Ouyang, P. Study of metabolic profile of *Rhizopus oryzae* to enhance fumaric acid production under low pH condition. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2015**, *177*, 1508–1519. [[CrossRef](#)]
20. Naude, A.; Nicol, W. Improved continuous fumaric acid production with immobilised *Rhizopus oryzae* by implementation of a revised nitrogen control strategy. *N. Biotechnol.* **2018**, *44*, 13–22. [[CrossRef](#)]
21. Liu, H.; Zhao, S.; Jin, Y.; Yue, X.; Deng, L.; Wang, F.; Tan, T. Production of fumaric acid by immobilized *Rhizopus arrhizus* RH 7-13-9# on loofah fiber in a stirred-tank reactor. *Bioresour. Technol.* **2017**, *244*, 929–933. [[CrossRef](#)]
22. Troiano, D.; Orsat, V.; Dumont, M.J. Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2020**, *117*, 109472. [[CrossRef](#)]
23. Ferreira, J.A.; Lennartsson, P.R.; Edebo, L.; Taherzadeh, M.J. Zygomycetes-based biorefinery: Present status and future prospects. *Bioresour. Technol.* **2013**, *135*, 523–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Pan, X.; Liu, H.; Liu, J.; Wang, C.; Wen, J. Omics-based approaches reveal phospholipids remodeling of *Rhizopus oryzae* responding to furfural stress for fumaric acid-production from xylose. *Bioresour. Technol.* **2016**, *222*, 24–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Roa Engel, C.A.; Van Gulik, W.M.; Marang, L.; van der Wielen, L.A.M.; Straathof, A.J.J. Development of a low pH fermentation strategy for fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*. *Enzyme Microb. Technol.* **2011**, *48*, 39–47. [[CrossRef](#)]
26. Eidt, L. Nutzung Nachwachsender Rohstoffe für die Biotechnologische Produktion von Fumarsäure. Ph.D. Thesis, Technical University of Braunschweig, Braunschweig, Germany, 2021.
27. Fu, Y.; Xu, Q.; Li, S.; Huang, H.; Chen, Y. A novel multi-stage preculture strategy of *Rhizopus oryzae* ME-F12 for fumaric acid production in a stirred-tank reactor. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *25*, 1871–1876. [[CrossRef](#)]
28. Ling, L.; Ng, T. Fermentation Process for Carboxylic Acids. U.S. Patent 4,877,731, 31 October 1989.
29. Naude, A.; Nicol, W. Fumaric acid fermentation with immobilised *Rhizopus oryzae*: Quantifying time-dependent variations in catabolic flux. *Process Biochem.* **2017**, *56*, 8–20. [[CrossRef](#)]
30. Yang, P.B.; Tian, Y.; Wang, Q.; Cong, W. Effect of different types of calcium carbonate on the lactic acid fermentation performance of *Lactobacillus lactis*. *Biochem. Eng. J.* **2015**, *98*, 38–46. [[CrossRef](#)]
31. Lopez-Exposito, P.; Negro, C.; Blanco, A. Direct estimation of microalgal flocs fractal dimension through laser reflectance and machine learning. *Algal Res.* **2019**, *37*, 240–247. [[CrossRef](#)]
32. López Expósito, P.; Blanco Suárez, A.; Negro Álvarez, C. Laser reflectance measurement for the online monitoring of *Chlorella sorokiniana* biomass concentration. *J. Biotechnol.* **2017**, *243*, 10–15. [[CrossRef](#)]
33. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)]
34. Esteban, J.; Ladero, M.; García-Ochoa, F. Kinetic modelling of the solventless synthesis of solketal with a sulphonic ion exchange resin. *Chem. Eng. J.* **2015**, *269*, 194–202. [[CrossRef](#)]
35. De la Torre, I.; Ladero, M.; Santos, V.E. Production of d-lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* from orange peel waste: Techno-economical assessment of nitrogen sources. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 10511–10521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Esteban, J.; Fuente, E.; Blanco, A.; Ladero, M.; Garcia-Ochoa, F. Phenomenological kinetic model of the synthesis of glycerol carbonate assisted by focused beam reflectance measurements. *Chem. Eng. J.* **2015**, *260*, 434–443. [[CrossRef](#)]
37. Xu, G.; Chen, X.; Liu, L.; Jiang, L. Fumaric acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by simultaneous use of oxidative and reductive routes. *Bioresour. Technol.* **2013**, *148*, 91–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Kenealy, W.; Zaady, E.; du Preez, J.C. Biochemical aspects of fumaric acid accumulation by *Rhizopus arrhizus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1986**, *52*, 128–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

39. Zhang, K.; Zhang, B.; Yang, S.-T. Production of citric, itaconic, fumaric, and malic acids in filamentous fungal fermentations. In *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2013; pp. 375–398. [[CrossRef](#)]
40. Riscaldati, E.; Moresi, M.; Federici, F.; Petruccioli, M. Direct ammonium fumarate production by *Rhizopus arrhizus* under phosphorous limitation. *Biotechnol. Lett.* **2000**, *22*, 1043–1047. [[CrossRef](#)]
41. Kang, S.W.; Lee, H.; Kim, D.; Lee, D.; Kim, S.; Chun, G.T.; Lee, J.; Kim, S.W.; Park, C. Strain development and medium optimization for fumaric acid production. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2010**, *15*, 761–769. [[CrossRef](#)]
42. El-Enshasy, H.A. Filamentous fungal cultures-process characteristics, products, and applications. In *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2007; pp. 225–261. [[CrossRef](#)]
43. Fu, Y.Q.; Li, S.; Chen, Y.; Xu, Q.; Huang, H.; Sheng, X.Y. Enhancement of fumaric acid production by *Rhizopus oryzae* using a two-stage dissolved oxygen control strategy. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *162*, 1031–1038. [[CrossRef](#)]

Anexo IV

Título: Fumaric acid production from apple pomace hydrolysate with *R. arrhizus*: Kinetic modelling.

Autores: Víctor Martín-Domínguez, Jorge García-Montalvo, Alberto García-Martín, Miguel Ladero y Victoria E. Santos.

Revista: *Processes* (invitado y enviado, 2022).

Fumaric acid production by *R. arrhizus* NRRL 1526 using apple pomace enzymatic hydrolysates: Kinetic modelling

Victor Martin-Dominguez; Jorge Garcia-Montalvo; Alberto Garcia-Martin; Miguel Ladero*; Victoria E. Santos

FQPIMA group. Materials and Chemical Engineering Department. Chemical Sciences School. Complutense University of Madrid. Madrid. Spain

* Correspondence: mladerog@ucm.es

Abstract: Fumaric acid is one of the most promising biorefinery platform chemical, being fruit residues a very suitable raw material for its production in second generation biorefineries. In particular, apple pomace is a plentiful residue from apple juice industry, being apple the second fruit crop in the world with a production that increased from 46 to 86 Mtons in the 1994-2021 period. With a global apple juice production of more than 4.5 Mtons, a similar amount of apple pomace is yearly produced. In this work, apple pomace hydrolysate has been obtained by enzymatic hydrolysis and further characterized for its content in sugars, phenolics and nitrogen using different analytic methods, based on HPLC and colorimetric techniques. Previous to the use of this hydrolysate (APH), we studied if the addition of fructose to the usual glucose-rich broth could lead to high fumaric acid yields, titers and productivities. Afterwards, APH fermentation was performed and improved using different nitrogen initial amounts, obtaining production yields ($0.32 \text{ g}_{\text{Fumaric acid}} / \text{g}_{\text{consumed sugar}}$) similar to those obtained with synthetic media ($0.38 \text{ g}_{\text{Fumaric acid}} / \text{g}_{\text{consumed sugar}}$). Kinetic modelling was employed to evaluate, explain, and understand the experimental values and trends of relevant components in the fermentation broth as functions of the bioprocess time, proposing as suitable reaction scheme and a non-structured, non-segregated kinetic model based on it.

Keywords: Fumaric acid; *Rhizopus arrhizus*; kinetic modelling; biorefinery; apple pomace

Citation: Martin-Dominguez, V.; Garcia-Montalvo, J.; Garcia-Martín, A.; Ladero, M.; Santos, V.E. Fumaric acid production by *R. arrhizus* NRRL 1526 using apple pomace enzymatic hydrolysates: Kinetic modelling. *Processes* **2022**, *10*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Last-name

Received: date

Accepted: date

Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Sustainable development is a geopolitical target in most countries throughout the World. It addresses key social, economic, and environmental indicators, with the aim to create a lasting equilibrium between human needs and desires and the ultimate source of most resources, both energetic and material, our Earth. Petroleum and, in general, fossil resources depletion starts to be a reality, pushing the search and discovery of new materials and energy sources [1–3].

Green chemistry and engineering are sustainability tools that has experienced a great growth in recent years for the aforementioned reasons [4]. Additionally, biorefineries appear as an integrated and integral process strategy based on the petrochemical industry but focusing on the modification of biomass as the source for almost unlimited array of products, being biomass a global term encompassing all renewable and sustainable raw materials created in the Biosphere, that is, by living beings[5].

During the last decades, biorefineries have evolved and they can be classified in several generations. First generation biorefineries are based on starch and sucrose rich crops, also used in feeding. However, this involved an ethical dilemma, due to the competition they create between the energy and food sectors [2,6]. Thus, and due also to the relative scarceness of these raw materials, second generation biorefineries are based on lignocellulosic materials: energy crops and residues, which has little or no value as food or feed. These biorefineries can use also sugar rich wastes, provided by agro-food industries, with no value as food ingredients. In this way, the raw material is plentiful and cost efficient

and several problems due to waste management are solved [6]. This generation is widely investigated by creating alternative industrial processes, with a focus on the increase of the raw material reactivity, as it is usually recalcitrant to chemical or biochemical transformation[7]. In this context, a third generation of biorefineries is coming, developed to transform sea resources, and mainly focused on algae technology [2,8].

To increase yields and productivities of the biotechnological processes in biorefineries, genetic edition has been introduced. For example, using Genetically Modified Organisms (GMOs) a wide variety of products can be obtained from very different raw materials, this fact rises the fourth generation of biorefineries, focused overall as a continuation of previous generation, modifying algae and cyanobacteria [7].

Food industry is a very suitable source of raw materials for second generation biorefineries, as food waste and loss need to be valorised instead of being disposed of. In this context, fruit wastes from beverage industry, which are rich on free sugars and structural polysaccharides, are composed by cellulose, hemicellulose and pectin, which can be hydrolysed to fermentable sugars [9]. Moreover, fruit wastes are a rich source of high value substances: Such as essential oils (mostly terpenes), flavonoids, carotenoids, and pectin, to name a few. These substances add value to overall process, rendering it more efficient and cost-effective, also avoiding deleterious effect on upstream operations due to catalysts and/or biocatalysts deactivation or inhibitions [10].

Apple manufacturing wastes, also known as apple pomace (AP), are mainly composed by apple peel, flesh, and seeds, and even, precipitated solids from juice clarification. In countries like Germany, apple is the fruit with the highest production. A huge amount of AP (200-250 kt/year) are generated, being necessary its management, as wastes or as by-product. The main AP applications are focussed on composting or on animal feeding, remarking its use as horse feeding [11].

Fumaric acid was designated as one of the Top 12 building blocks to be produced on biorefineries, by the U.S. Department of Energy [12]. It is a dicarboxylic acid with a double bond, which confers very interesting properties as monomer and as rising crosslinker on material industry. As a chemical building block, it is co-polymerized to several polyamides or resins. Its main use lies, however, in the food industry, where it is used as not flavouring acidulant. This compound has also several applications in the health and pharma industries. As an ingredient of cattle feed, it reduces 70% of methane emissions, a greenhouse gas with a heating potential 21 times higher than CO₂ [13,14].

The acid is produced nowadays by catalytic isomerization from maleic anhydride, a process that involves very intensive pressure and temperature, being energy-intensive. In addition, the use of maleic anhydride is dangerous for the environment, while this compound is petroleum-based[13,15].

Rhizopus spp. is a genus of filamentous fungi, known to be the best natural producers of fumaric acid. However, these microorganisms present some disadvantages due to low productivity and lack of process reliability. This last feature is due to their growth as hyphae, having different morphologies with diverse productivities [16]. Fungal morphology and its control have been widely discussed on bibliography [17,18]. Pellet morphology is generally recognised as the most suitable morphology due to its high productivity and low effect on medium rheology. The control of the size and the development of pellets on inoculum stages optimizes the fungal metabolism for fumaric acid production [19].

Fumaric acid is present in the metabolism of *Rhizopus* in two different pathways: The Tri-Carboxylic Acid (TCA) cycle and the TCA reductive pathway. The first route is only present inside the mitochondria and fumaric acid is within a metabolic cycle, not being a product of the route [13,20]. This is, however, the situation in the TCA reductive pathway: The acid is the final product. This metabolic route starts from pyruvate which, through CO₂ fixation, ends in fumarate. Enzyme fumarase is the responsible from the last step of the route. Its activity is known to be increased in nitrogen limiting conditions [21,22].

With the objective of implementing this fermentative process on a biorefinery model, this work is focused on the obtention of fumaric acid from an enzymatic hydrolysate of

AP (APH), as carbon source on fermentation medium. This hydrolysate was characterized to know its composition. As a comparative counterpart, the fungal fermentation with synthetic media with identical composition to APH and also with glucose as only carbon source has been studied. The kinetic modelling was employed as a tool for a further comparison and to simulate the bioprocess based on APH, looking for a future scale up.

2. Materials and Methods

2.1. Wastes

AP employed on the present work have been kindly supplied by a beverage factory, having real industrial wastes for an accurate implementation. It was supplied by Concentrados Villaviciosa S.A. (La Almunia de Doña Godina, Aragon, Spain), an apple juice factory for cider elaboration. The waste is produced in the first part of the process, when apples are washed and peeled and after shredding and pressing[23,24].

2.2. Enzymes and reagents

The enzymes employed on the present study have been supplied by ASA Spezialenzyme GmbH (Wolfenbüttel, Germany). These enzymes are: Biogazyme 2x, Xylanase 2x, β -glucosidase 1000 and Pektinase L40.

Several chemical reagents have been employed for media elaboration and analysis protocols. Glucose and fructose EPR (Labchem. Premia de Dalt, Spain) have been employed as carbon source on synthetic media, at the same time, fermentation media are composed by any other salts such as ammonium sulphate or magnesium sulphate, all these salts and inorganic compounds, as well as DPPH for antioxidant activity determination have been supplied by Panreac (Castellar del Vallés, Spain). On the other hand, certain specific reagents have been supplied by Sigma-Aldrich (Saint Louise, MO, U.S.A.), such as Corn Step Liquor (CSL) and the ion exchange resin Dowex® 50WX8. Other reagent employed was Folin–Ciocalteu’s phenol reagent in analytical grade (Chemical Lab, Zedelgem, Belgium). Active carbon for detoxification process have been supplied by ACROS Organics (Waltman, MA, U.S.A.) with 4-12 mesh.

Finally, different kinds of CaCO_3 have been tested, with diverse specifications, have been provided by Alfa-Aesar (Averhill, MA, U.S.A.) and VWR chemicals (Radnor, PA, U.S.A.), both with $\geq 99\%$ purity.

2.3. Enzymatic hydrolysis

Enzymatic hydrolysis has been carried out using fresh apple pomace, with no further pre-treatment. The process regime selected was fed-batch. Final total solid load was 15% (w/v), distributed on 5 different loads of 3% (w/v) of dry solid at 0, 3.5, 24, 48 and 60 h, with a total time of 72 h. This hydrolysis was performed in a 2 L bioreactor, with mechanical stirring at 350 rpm and 50 °C, pH was maintained at 5.0 using NaOH.

Enzymatic cocktail has been developed based on previous studies [25,26]. Its composition was: Biogazyme 2x: 18 mg/g_{dry solid}, Xylanase 2x: 12 mg/g_{dry solid}, β -glucosidase 1000: 9 $\mu\text{L/g}_{\text{dry solid}}$ and Pektinase L40: 9 $\mu\text{L/g}_{\text{dry solid}}$. Due to the high solid load over time, there were two different enzymatic cocktail loads during the waste processing: One at the beginning of the operation (0 h) and another load at 48 h.

2.4. Detoxification

Because of the nature and composition of APH, a decontamination process is needed to remove antimicrobial compounds [27,28]. Firstly, a precipitation of solids, assisted by CaCO_3 (1 g/L), has been performed during 5 min at 80 rpm and at room temperature. Afterwards, the solids were removed by centrifugation using three cycles of 10 min at $11,733 \times g$ (8500 rpm) to ensure a complete clarification of the liquid phase.

Once all solids were removed, two detoxification stages have been performed in series. The first one was an adsorption operation using 10% (w/v) active carbon in a contact stage of 30 min. This stage sought to eliminate phenolic compounds and essential oils[29]. A second detoxification stage was performed using an ion exchange resin Dowex® 50WX8,

using 10% (w/v) of resin for 30 min. This resin is employed to reduce the cation concentration, such as metals or ammonium [27].

After the use of the resin, it must be washed with water (500 mL_{water} /100 g_{resin}), later regenerated with H₂SO₄ 0.125 M (100 mL_{acid} /100 g_{resin}) and, finally, washed with water again.

At last, two filtrations have been performed: An initial filtration with a glass fibre filter, for removing remaining solids. Finally, a sterilizing filtration (0.22 µm) was applied to have a stable medium.

2.5. Microorganism and stock elaboration

As in previous studies [19,30], *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526 has been used for fumaric acid production. It was cultivated on agar plates with PDA (Potato Dextrose Agar) medium. The spore stock (2·10⁷ spores/tube) was elaborated after sporulation (5 days). Stock was stored at -80 °C in a saline-glycerol 20% (v/v) solution.

2.6. Media and culture conditions

All experiments carried out on this study, have been performed following one flask-one sample working protocol, in the way to assure reproducibility and traceability [19]. Fermentations have been carried out in 100 mL shake flasks, using 20 mL of culture medium at 34 °C and 400 rpm.

The process has been divided on two different stages: Inoculum stage is firstly performed. With the purpose of developing correctly pellet morphology, with a proper size, and a metabolic state suitable for an enhanced fumaric acid production.

Inoculum medium was defined by Rhodes in 1959 [31], with some later modifications [19]. It is composed by: Glucose (40 g/L), ammonium sulphate (4 g/L), MgSO₄ × 7 H₂O (0.4 g/L), ZnSO₄ × 7 H₂O (0.044 g/L), KH₂PO₄ (1.6 g/L), FeCl₃ × 6 H₂O (0.0075 g/L) and CSL (0.5 mL/L). This medium is widely employed in the bibliography as it has a proper composition to obtain an appropriate growth and development of fungal biomass.

For production stage, has been employed a common composition of micronutrients, optimised for production by Ling and Ng [32]: MgSO₄ × 7 H₂O (0.4 g/L), ZnSO₄ × 7 H₂O (0.044 g/L), KH₂PO₄ (0.3 g/L), FeCl₃ × 6 H₂O (0.0075 g/L) and finally CaCO₃ (35 g/L), used as pH controller and CO₂ supplier [30]. Sugars concentration has been set to resemble culture media to APH, after its analysis. There were two synthetic media used: A first medium only composed by glucose as carbon source with a concentration of 60 g/L. The other synthetic medium consisted in an analogous of the APH, being composed of glucose and fructose in the same concentration of 30 g/L.

The nitrogen content on different production media, has been adapted from literature [30,32] to obtain nitrogen limiting conditions. Ammonium sulphate concentration has been adjusted, to have the same C:N ratio on the different experiments, having an ammonium sulphate concentration of 0.54 g/L for these media, which means 0.07 g/L of ammonia.

The final AP fermentation medium would be composed mainly of APH, but it was complemented to ensure the same composition of micronutrients defined before, and adding (NH₄)₂SO₄ as nitrogen source, at a concentration to be determined.

2.7. Biomass and ammonium tracing

Ammonium concentration has been measured using an ammonia ion selective electrode Hanna Instruments HI-4101, in an ISE (Ion Selective Electrode) measurer Hanna Instruments HI-5522 (Hanna Instruments. Villafranca Padovana, Italy).

Living biomass have been quantified following the methodology defined on a previous study [30]. As indicated in this reference, the biomass concentration was related to nitrogen consumption by stoichiometry once the average molecular formula of the microorganism was established (CH_{1.80}O_{0.68}N_{0.22}).

2.8. Sample analysis

For tracing the concentration of the different compounds, HPLC techniques have been employed. A modular HPLC device Jasco series 2000 (Jasco. Tokyo, Japan) was used, having a Refractive Index Detector (RID) and a Diode Array Detector (DAD).

Two different HPLC columns have been employed for different purposes: A BP 800-H column (Benson. Reno, NV, USA), with H₂SO₄ 0.005 M as mobile phase, at 0.5 mL/min and 60 °C was employed for all samples, as this HPLC method is suitable for almost all relevant compounds. In this analysis, fumaric acid has been measured using the DAD at 250 nm. Other substances (malic acid, ethanol, and glucose) have been quantified using the RID. In addition, a BP 800-PB column thermostated at 80 °C (Benson. Reno, NV, USA), with Milli-Q H₂O as mobile phase flowing at 0.5 mL/min, was used for analysing in detail several hexoses and pentoses present on the hydrolysates, such as xylose, galactose, saccharose, and fructose.

Folin-Ciocalteu and DPPH assays were performed to determine total phenolic content and antioxidant capacity respectively, on APH. These characterizations have been applied to study the effectivity of detoxification process [9] by known protocols obtained from bibliography: Folin-Ciocalteu working protocol has been developed by Ribeiro et al., from Universidade Federal do Paraná, Brazil [33], while DPPH protocol was established by Ozturk et al., from The University of Manchester, UK [34].

Finally, a classical Bradford method for soluble protein quantification have been employed, used for characterizing APH. The employed protocol is the same as in previous studies [30].

2.9. Mathematic methods

Once the different kinetic models on the present study were proposed, they were fit to all relevant experimental data using the software Aspen Custom Modeller V11® (ACM). This program applies nonlinear fitting mathematic methods, based on NL2SOL algorithm coupled to a variable interval Euler method for the numerical integration of the ordinary differential equations (ODEs) that constitutes each kinetic model. The NL2SOL algorithm is an algorithm very adequate to solve ODEs systems based on gradient method, it was developed from the Marquardt-Levenberg algorithm. It ensures a fast and reliable calculation of the kinetic parameters or constants of the models[35].

The model must be introduced using programming language very similar to Matlab. Afterwards, experimental data are introduced, finally initial iteration values for model parameters are required to reach an appropriate convergence of the system. For the iteration, some physical criteria must be applied such as the need for the kinetic parameters to be positive.

Kinetic parameters are obtained together their standard errors with a 95% confident (by Student's t analysis) which must be as lower as possible. To test the goodness of the proposed kinetic model, some statistical parameters were provided by the software: Root Mean Squared Error (RMSE) (**equation 1**) measures of the cumulative error between the experimental data and the fitted model, so it should tend to zero. This parameter is based on the Sum of Squared Residuals (SSR), represented on **equation 2**, that indicates the overall error present on the model, respect from experimental data[36,37].

$$RMSE = \sqrt{\frac{SSR}{(N - K)}} \quad (1)$$

$$SSR = \sum_{j=1}^{j=K} \sum_{i=1}^{i=N} (C_{ij \text{ exp}} - C_{ij \text{ calc}})^2 \quad (2)$$

The calculation of RMSE, requires the freedom degrees in the model (N-K). Representing N, the number of experimental data and K the number of parameters in the proposed model.

F test is based on SSR calculation too, it points out how good the fitting is. This test indicates the probability that the model would be represented by a Fisher-Snedecor distribution in a 95% confident. Provides the parameter F_{95} (equation 3), that must be always over a critical value (tabulated) for the number of data and kinetic parameters used, thus ruling out the null hypothesis. In any case, it should be as large a value as possible[36,37].

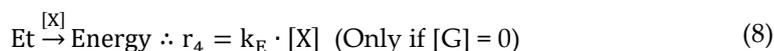
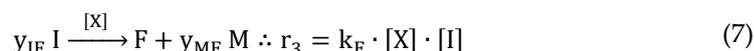
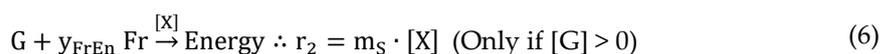
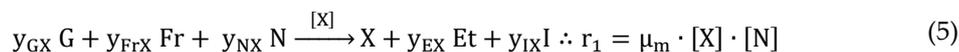
$$F_{95} = \frac{\sum_{j=1}^{j=K} \sum_{n=1}^{n=N} \left(\frac{C_{jn \text{ calc}}}{K} \right)^2}{\sum_{j=1}^{j=K} \sum_{n=1}^{n=N} \left(\frac{SSR}{N-K} \right)} \quad (3)$$

Finally, the percentage of variation explained (%VE) (equation 4) is a differential goodness-of-fit parameter: It gives information about how well the model explains the changes of the measured variables (concentrations) with the independent variable (time, in this case). A 100% implies a perfect explanation by the model of the experimental change of the dependent variable(s) contained in the model[37,38].

$$\%VE = 100 \cdot \left(1 - \frac{\sum_{l=1}^{l=L} SSR_l}{\sum_{l=1}^{l=L} SSR_{\text{mean } l}} \right) \quad (4)$$

2.10. Kinetic model

To model the time course of the different compounds in the experiments carried out in the present study, a non-structured, non-segregated simple kinetic model has been proposed and applied to these four experiments. The model (equations 5-16) is based on another model successfully employed in a previous study [30], but it has been modified according to the trends appreciated in these experiments. The reaction scheme developed for this model is:



From this reaction scheme, model equations are the following:

Biomass:

$$R_X = \frac{d[X]}{dt} = r_1 \quad (9)$$

Fumaric acid:

$$R_F = \frac{d[F]}{dt} = r_3 \quad (10)$$

Malic acid:

$$R_M = \frac{d[M]}{dt} = Y_{MF} \cdot r_3 \quad (11)$$

Ethanol:

$$R_E = \frac{d[Et]}{dt} = Y_{EX} \cdot r_1 - r_4 \quad (12)$$

Ammonia: 273

$$R_N = \frac{d[N]}{dt} = -Y_{NX} \cdot r_1 \quad (13)$$

Glucose: 274

$$R_G = \frac{d[G]}{dt} = -Y_{GX} \cdot r_1 - r_2 \quad (14)$$

Fructose: 275

$$R_{Fr} = \frac{d[Fr]}{dt} = -Y_{FrX} \cdot r_1 - Y_{FrEn} \cdot r_2 \quad (15)$$

Intermediate: 276

$$R_I = \frac{d[I]}{dt} = Y_{IX} \cdot r_1 - Y_{IF} \cdot r_3 \quad (16)$$

The proposed kinetic model is based on fungal growth described by M'Kendrick & 277
Pai model considering ammonia as limiting substrate (equations 5 and 9). From this 278
growth model, associated to growth substances production are described through yields: 279
ethanol and the intermediate metabolite (equations 5, 12 and 16). 280

A cellular maintenance reaction was introduced too; for this reaction we considered 281
the consumption of glucose and fructose for respiration to obtain energy (equation 6, 14 282
and 15). 283

Additionally, there is a specific reaction to describe the TCA reductive pathway, 284
where fumaric and malic acids are clearly not associated to growth (equation 7). As pre- 285
viously mentioned, when using APH as substrate, the production of fumaric and malic 286
acids do not deter even when sugars are totally consumed, suggesting the accumulation 287
of an intermediate inside the fungal cells (growth associated, as reflected in equation 5). 288
Probably, malate concentration grows inside the cells due to the great sensitivity of the 289
fumarase to inhibitors [28,39]. 290

Concerning ethanol disappearance (equation 8), this is a phenomenon that is not pre- 291
sent in all experiments probably because only when APH is used, glucose and fructose 292
disappear completely. Ethanol has been proved to be produced in aerobic conditions by 293
the Crabtree effect [30], shifting the excess of carbohydrate to the production of ethanol to 294
increase NADH levels in the cells. Afterward, when the microorganism needs of energy 295
increases, ethanol is transported inside the microorganism to face such needs in the ab- 296
sence of other carbon sources. For this reason, the reaction represented on the equation 8 297
is only present with the condition that glucose and fructose concentrations are 0, a fact 298
that happens at the same time (40 h). 299

3. Results and Discussion 300

3.1. Enzymatic hydrolysis 301

Enzymatic hydrolysis was performed as commented in Materials and Methods sec- 302
tion. APH was characterized after and before detoxification process, obtaining the results 303
shown in **Table 1**. HPLC sugar analysis was carried out using different columns described 304
on section 2.8. It is appreciated that the detoxification treatment only slightly affects the 305
final monosaccharide content, conserving more than 95% original sugar content. Phenolic 306
and antioxidant activity quantifications were also performed, these substances are re- 307
ported to have antifungal effect [28]. As it is shown in **Table 1**, the detoxification process 308
reduced the content in phenolics and antioxidants. Near 43% phenolics are removed, ac- 309
cording to the Folin-Ciocalteu method, but only 20% antioxidant activity disappears. 310
Therefore, enzyme inhibition due to this type of compounds can still be expected. Also, a 311
nitrogen quantification has been carried out, and in **Table 1** can be observed that ammo- 312
nium content on the detoxified APH is below the quantification limit, so its value could 313

be considered null. Therefore, the treatment with ionic resins is successful to remove ammonia. Moreover, protein content, as measured by the Bradford method, is not significant (0.42 g/L), being this value below the initial protein concentration added for hydrolysis (2.87 g/L). This detoxified APH constitutes the carbon source for some experiments reported in this work.

Table 1. APH characterization analysis.

Parameter	Before detoxification	Detoxified APH	Units
[Sugars]	68.12	65.29	g/L
[Glucose]	35.11	32.48	g/L
[Fructose]	33.01	32.81	g/L
Total phenolic content	587.86	336.32	mg ^{eq.gallic acid} /L
Antioxidant activity	67.69	53.77	TEAC/L
[NH ₄ ⁺]	105.17	< 10 *	mg/L
[Soluble protein]	–	0.42	g/L

* Below quantification limit.

3.2. Synthetic media experiments

To study the effect of glucose and glucose/fructose mixtures in this bioprocess, two experiments are carried out using a medium with only glucose at a concentration identical to that of total sugars in detoxified APH (experiment 1) and another run using a mixture glucose/fructose 1:1 w/w with the same mass concentration found in detoxified APH (experiment 2). In **Table 2** we have collected diverse key fermentation parameters of these experiments. It can be notice that they are very similar for both runs. **Figures 1** and **2** show the experimental data (as points) obtained for these experiments. The results for experiment 1 (**Figure 1**) show the same trends reported elsewhere [30]: Fumaric and malic acids accumulate in parallel in the fermentation broth, having a non-associated increase relative to biomass production. Glucose and ammonia are totally consumed.

Ethanol evolution is of notable interest. In bibliography is widely reported how its production is linked to fungal growth, and when it stops, ethanol concentration starts decreasing, as a consequence of evaporation [30,40] and/or due to its consumption by the fungus after having produced it via the Crabtree effect [41]. This effect is reported to take place in different processes performed by certain species of fungi and yeasts. It consists of ethanol generation with a double purpose, firstly generates an energy reserve that they can consume when required (in particular, fumaric acid transport through the membrane needs a notable amount of ATP). At the same time, its presence prevents or hinders the growth of other microorganism, reducing the competence for resources. Ethanol production takes place over a threshold concentration of glucose and in an excess of oxygen [42,43]. Despite of this, in both experiments with pure sugars (**Figure 1** and **Figure 2**), it can be observed how ethanol concentration remains constant after being produced, suggesting that the microorganism has no need of it as an energy source in these cases, while evaporation is not taking place at an appreciable rate.

Regarding the experiment 2 (**Figure 2**), the use of both sugars combined in identical concentrations at zero time provides very close results to those obtained when we use only glucose. However, fructose is not totally consumed. In fact, the microorganism consumes glucose at a much higher rate (glucose is totally consumed at a bioprocess time between 30 and 50 h). This effect is not due to carbon catabolite repression, as fructose is consumed in parallel to glucose, though at a lower rate. However, fructose transport through the membrane needs a higher amount of energy and the fungus need to use a different phosphorylation route (and enzymes) to obtain pyruvate out of fructose [25]. Even in these conditions, fumaric production is very similar to that in Experiment 1, not only in terms of final yield but also considering its concentration evolution with time. Likewise, the evolution of the rest of compounds in the fermentation broth is very close

to those shown in **Figure 1**. Thus, there is an evident possibility of using glucose-fructose mixtures as substrate, the composition of the detoxified APH.

Table 2. Main parameters of the experiments performed in this work.

Experiment	Medium	Figure	[Fumaric acid] (g/L)	Yield ($\frac{\text{g}_{\text{Fumaric acid}}}{\text{g}_{\text{consumed sugar}}}$)	Specific productivity ($\frac{\text{g}_{\text{Fumaric acid}}}{\text{g}_{\text{Biomass}} \cdot \text{h}}$)
1	Glucose: 60 g/L NH ₃ : 0.14 g/L	Figure 1	22.20	0.37	0.32
2	Glucose: 30 g/L Fructose: 30 g/L NH ₃ : 0.14 g/L	Figure 2	22.70	0.38	0.33
3	APH NH ₃ : 0.14 g/L	Figure 3	14.67	0.23	0.17
4	APH NH ₃ : 0.25 g/L	Figure 6	20.82	0.32	0.14

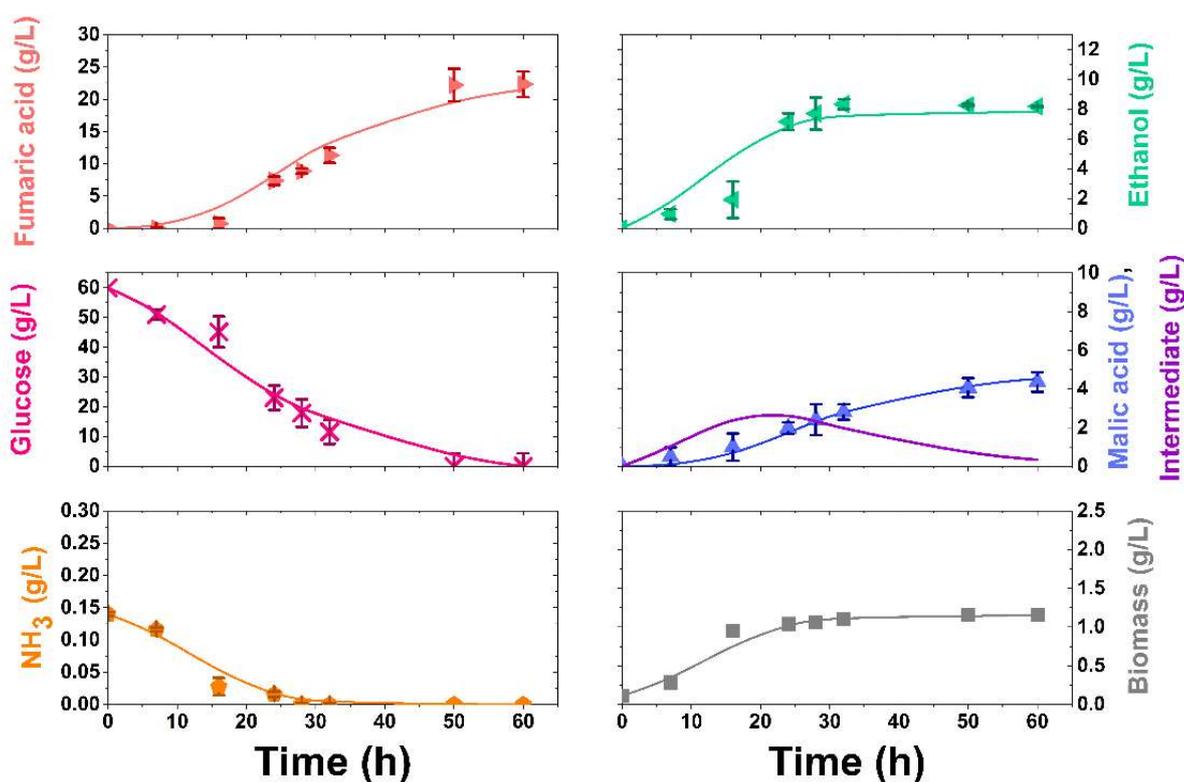


Figure 1. Experimental results (points) and simulation (lines) by means of the kinetic modelling applied to Experiment 1 ($[\text{Glucose}]_0 = 60 \text{ g/L}$, $[\text{NH}_3]_0 = 0.14 \text{ g/L}$, 200 rpm, 34 °C).

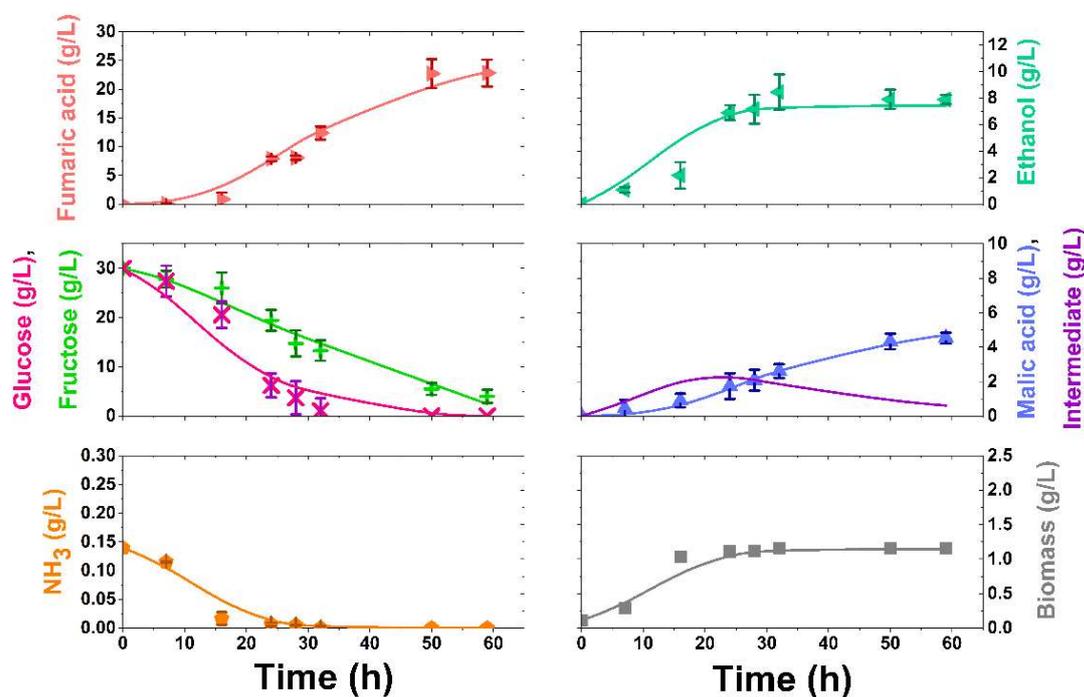


Figure 2. Experimental results (points) and simulation (lines) by means of the kinetic modelling applied to Experiment 2 ($[\text{Glucose}]_0 = [\text{Fructose}]_0 = 30 \text{ g/L}$, $[\text{NH}_3]_0 = 0.14 \text{ g/L}$, 200 rpm, 34 °C).

3.3. APH application

A second set of runs was devoted to the use of detoxified APH as a carbon source in fumaric acid production. In a first trial (experiment 3) to produce fumaric acid, the same conditions of experiment 2 were used (Table 2). We can appreciate that both fumaric acid yield and productivity decreased by 40% and 48%, respectively. These lower values obtained in APH can be due to the remaining toxicity due to phenolic compounds and also reflect on the change of morphology: The mycelium in experiment 3 does not grow any longer with a pellet morphology, resembling more a clump (Figure 3). This change of morphology is a symptom from a change in the metabolism. This metabolic alteration is probably a fungal defense strategy in the presence of phenolics and antioxidant compounds, because it reduces the inner concentration of these compounds in the biomass due to mass transfer limitations inside the clump [28,44]. However, this will result also in lower amounts of oxygen reaching the inner part of the clump and, probably, to the dead on inner cells as the clump grows, with the subsequent reduction of active biomass concentration.

In view of these results, is clear that detoxification process should be improved, in a way to reduce the inhibition and reach higher production yields. For this purpose, active carbon treatment step could be optimized; on the other hand, other treatment could be performed, such as adsorption to hydrophobic matrixes, nanofiltration with membranes or peroxidase treatment [45,46].

In Figure 4 we displayed the time evolution of all the compounds. Some temporal changes can be easily perceived. For example, even if biomass growth and nitrogen source consumption follow the same trends as they used to, however these processes are taking place slower. Moreover, the change of morphology provokes the decrease on fumaric acid production. This reduction on the final concentration of fumaric acid is balanced by a higher production of malic acid. The carbon flux driven to reductive TCA should be main-

tained[47]. Thus, the mentioned inhibition must have affected to fumarase activity, preventing malate transformation to fumarate. It have been reported that certain substances present in essential oils coming from different fruits have antifungal effect [28,44], also some components from fruit juices like phenolics or antioxidant compounds reduces the activity of several enzymes produced by fungi [44,48]. It is well known and reported in bibliography that enzymes responsible of reductive TCA pathway are very sensitive to changes on fermentation conditions, overall fumarase [49,50]. It is possible to switch reversibility of certain metabolic reactions, changing process conditions [13,51]. So, it is not strange that the presence of inhibitors could impact on reductive TCA enzymes and, in particular, on fumarase.

As a consequence, fumaric and malic acids evolves in a diverse manner: their production is still not associated to growth (such as in previous experiments), however, when sugar concentration finishes, both acids concentration still rises. This effect could be explained by the accumulation of an intermediate metabolite, possibly malate, as the result of the deactivation of fumarase or other enzymes on the TCA reductive pathway[48,52]

Other remarkable difference is the ethanol disappearance once its maximum is reached. As mentioned before, the Crabtree effect can be activated or not depending on the concentration of glucose and fructose, being the threshold concentration dependent on the sugar [41]. In fact, this effect can also be affected by the presence of inhibitory substances. Under stress conditions and in need of energy sources, the fungus could activate the ethanol transport through the membrane, being this transport driven by a concentration gradient and, thus, diffusive in nature. Ethanol is consumed afterwards in the TCA cycle, creating a notable amount of energy in terms of ATP [43]. This ethanol consumption takes place after 40 h, once glucose and fructose have disappeared. In fact, carbohydrate consumption when using APH is faster than with pure sugar solutions, so ethanol could be used as alternative carbon source for cellular maintenance once sugars are not present. Furthermore, sugars disappearance with bioprocess time changes when compared to the trend in experiment 2: now both sugars are consumed at the same rate. While glucose is consumed at a slightly higher rate, fructose consumption rate is increased 2-3 fold.

The drop of the fermentation parameters could be caused by an excess of chemical stress suffered by the fungi, although this stress reflects in a more active metabolism and a diverse morphology. As carbon consumption is activated, it can be foreseen than nitrogen needs will be higher. For this reason, and also trying to reduce the classical nitrogen limiting conditions [13,21,42], we have tested different ammonia initial concentrations when using APH (**Figure 5**), setting them at 0.25 and 0.40 g/L.



Figure 3. (a) Pellets obtained in synthetic media; (b) Morphology obtained in APH fermentations.

395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430

431

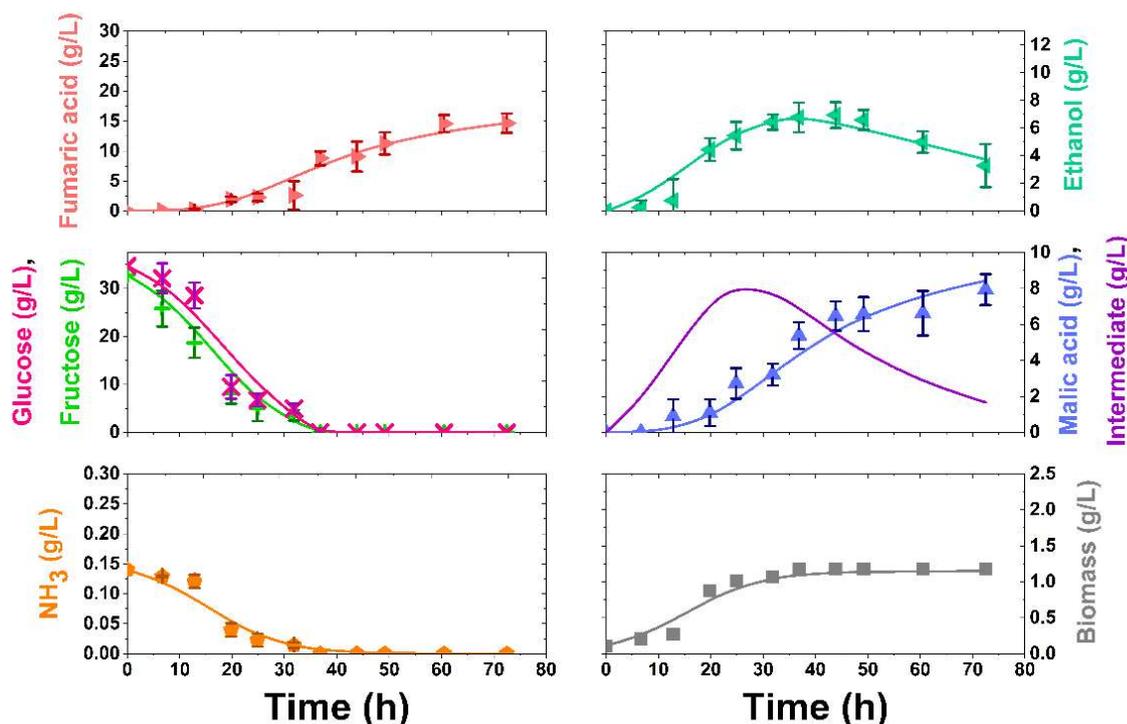


Figure 4. Experimental results (points) and simulation (lines) by means of the kinetic modelling applied on Experiment 3 (APH, $[\text{NH}_3]_0 = 0.14 \text{ g/L}$, 200 rpm, 34 °C).

It is to be appreciated (**Figure 5**) that now, when using APH monosaccharides as the main carbon source, the fungal need of nitrogen swifts towards higher values (even though nitrogen restrictions are still needed to produce fumaric acid). As a consequence, an ammonia concentration of 0.25 g/L was selected for a final experiment (experiment 4). As can be seen on **Table 2**, production yield is very similar to that obtained with the analogue medium (experiment 2). Moreover, the productivities (**Table 2**) show how this increase on final production is due to the reduction of nitrogen stress, with a concomitant decrease of fumaric acid productivity. Thus, the higher acid final concentration seems to be directly related to a higher biomass concentration, consequence of a higher nitrogen availability. In **Figure 6** we appreciate the same trends for all the compounds perceived in experiment 3 (in both cases using APH) while final fumaric acid concentration has been improved and ethanol production increases. As malic acid production is lower than obtained in experiment 3, we can conclude that its conversion into fumaric acid is also activated. The behaviour of ethanol indicates a higher activation of the Crabtree effect [41].

It has been proven the fall in the value of the production yield when APH is used, however, this value is similar to those obtained with other wastes hydrolysates (**Table 3**). The use of these kind of carbon sources involves inhibition due to the presence of different substances present in the hydrolyzed biomass, that provokes a lower production respect that from synthetic media. However, reached production yields are good enough to carry out the process successfully.

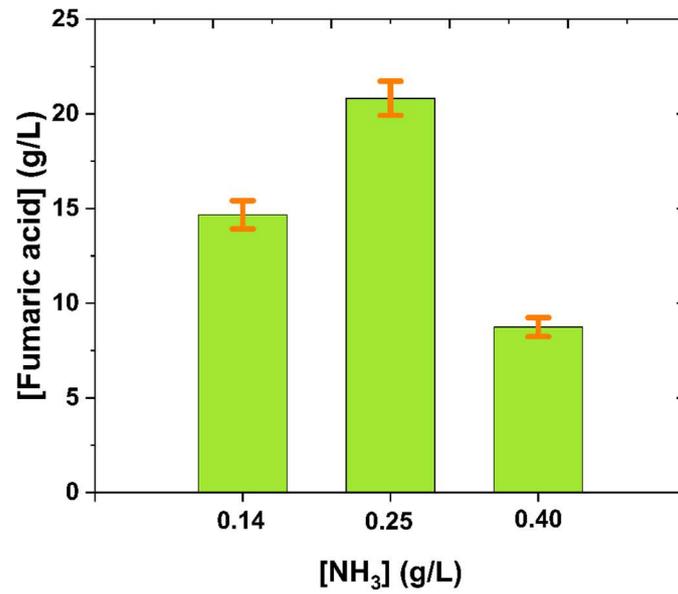


Figure 5. Nitrogen source concentration selection for complementing APH.

456

457

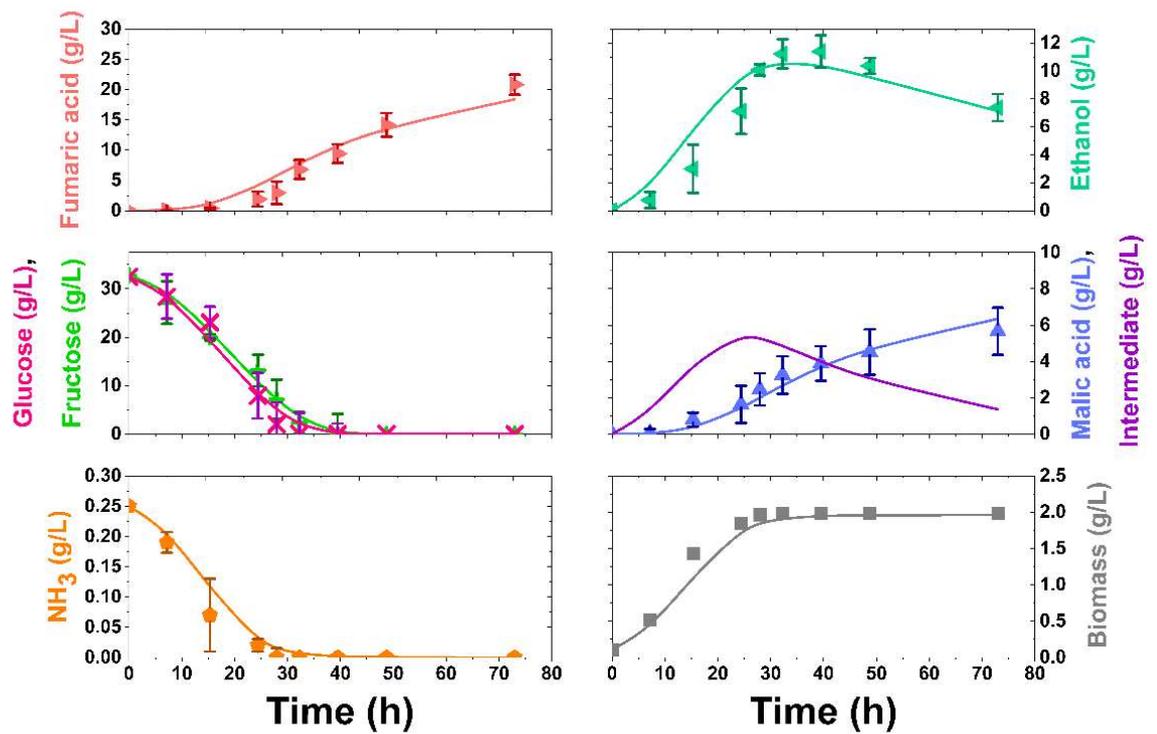


Figure 6. Experimental results (points) and simulation (lines) by means of the kinetic modelling applied on Experiment 4 (APH, [NH₃]₀ = 0.25 g/L, 200 rpm, 34 °C).

458

459

460

461

462

463

Table 3. Comparative of fumaric acid production using different wastes hydrolysates.

464

Reference	Microorganism	Medium	[Fumaric acid] (g/L)	Production yield ($\frac{\text{g}_{\text{fumaric acid}}}{\text{g}_{\text{sugar}}}$)
[53]	<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 2582	Silver grass hydrolysate: Sugars \approx 55 g/L; Yeast extract: 0.5 g/L	9.26	0.17
[54]	<i>Rhizopus oryzae</i> ATCC 20344	Lignocellulosic syrup: Sugars \approx 80 g/L; Urea: 0.2 g/L	34.20	0.43
[55]	<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 2582	Sugar cane molasses with soybean cake hydrolysate: Sugars \approx 25 g/L; free amino nitrogen: 0.2 g/L	7.90	0.32
Present work	<i>Rhizopus arrhizus</i> NRRL 1526	Apple pomace hydrolysate: Sugars \approx 60 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 0.25 g/L	20.82	0.32

465

3.4. Kinetic modelling.

466

With the proposed kinetic model, modelling and analysis was performed using Aspen Custom Modeller V11[®]. Kinetic parameters obtained are represented on **Table 4**. At the same time, statistical parameters related with goodness of fitting are represented on **Table 5**. The model prediction is represented in **Figures 1, 2, 3** and **5** as lines, showing the accurate fit of the model, in lines, to each experiment results. As it can be seen, the evolution of the intermediate compound can be predicted using this model: as expected this compound shows a trend passing through a maximum value. The accumulation of this compound is higher when APH is used as substrate as a consequence of the reduction of fumaric acid production.

467

468

469

470

471

472

473

474

475

The value of the parameter Y_{NX} is set to a value of 0.135 $\frac{\text{g}_{\text{Ammonia}}}{\text{g}_{\text{Biomass}}}$ in all cases because biomass concentration is calculated from consumed ammonia. From the other kinetic parameters, contained in **Table 4**, some observations can be pointed out: the first observation is the inhibition caused by phenolics and antioxidants containing in APH, affecting to the specific growth rate, μ_{m} . Its value is clearly lower in the experiments when the hydrolysate is used as substrate, this effect can be observed comparing results shown on **Figures 2** and **3**, where biomass production is slower in experiment 3. The value for experiment 4 lower than experiment 3 is perhaps due to an ammonia inhibition.

476

477

478

479

480

481

482

483

The values of μ_{m} in experiments 1 and 2 are difficult to analyse in comparison with other processes where *Rhizopus spp.* because in literature there are no kinetic models for this process. A comparative process is, for example, lactic acid production [56,57], showing the same magnitude order and similar values for this kinetic parameter in different processes with diverse growth models. *Rhizopus spp.* specific growth rate is always very similar.

484

485

486

487

488

489

Regarding the values of Y_{GX} and Y_{FX} parameters, we can observe how the sum of values of parameters Y_{GX} and Y_{FX} in experiments 2 and 3, gives a value very close to Y_{GX} in experiment 1. This means that the yield of the use of sugars for cell reproduction is equal for the experiments carried out using the same total sugar and ammonium concentrations (**Table 4**).

490

491

492

493

494

Considering malic acid production, Y_{MF} has a very similar value in experiments 1 and 2, but in experiment 3 the highest value on the study is observed. Apparently, this increase in malic acid production is consequence of the excessive accumulation of the intermediate metabolite observed on **Figure 3**.

495

496

497

498

Considering the evolution of the intermediate and the behaviours of k_F and Y_{MF} parameters, it is most plausible that inhibition caused by compounds present on APH is affecting fumarase. Therefore, to identify the intermediate metabolite with malate turns to be a real possibility.

Table 4. Kinetic parameters for the proposed kinetic model obtained by statistical fitting.

Parameter	Units	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Experiment 4
μ_m	$\frac{L}{g_{NH_3} \cdot h}$	1.20 ± 0.07	1.28 ± 0.08	0.96 ± 0.04	0.76 ± 0.05
k_F	$\frac{L \cdot g_{Fumaric\ acid}}{g_{Biomass} \cdot g_{Sugar} \cdot h}$	$(2.64 \pm 0.40) \cdot 10^{-1}$	$(2.87 \pm 0.34) \cdot 10^{-1}$	$(0.74 \pm 0.05) \cdot 10^{-1}$	$(0.48 \pm 0.05) \cdot 10^{-1}$
k_E	$\frac{g_{Ethanol}}{g_{Biomass} \cdot h}$	–	–	$(8.14 \pm 1.42) \cdot 10^{-2}$	$(5.14 \pm 2.20) \cdot 10^{-2}$
m_S	$\frac{g_{Glucose}}{g_{Biomass} \cdot h}$	$(5.94 \pm 2.67) \cdot 10^{-1}$	$(3.14 \pm 0.38) \cdot 10^{-1}$	$(5.36 \pm 0.26) \cdot 10^{-1}$	$(3.25 \pm 2.81) \cdot 10^{-1}$
Y_{FrEn}	$\frac{g_{Fructose}}{g_{Glucose}}$	–	1.25 ± 0.13	1.93 ± 0.10	1.27 ± 1.06
Y_{MF}	$\frac{g_{Malic\ acid}}{g_{Fumaric\ acid}}$	$(2.11 \pm 0.16) \cdot 10^{-1}$	$(2.04 \pm 0.16) \cdot 10^{-1}$	$(5.61 \pm 0.34) \cdot 10^{-1}$	$(3.45 \pm 0.79) \cdot 10^{-1}$
Y_{EX}	$\frac{g_{Ethanol}}{g_{Biomass}}$	7.52 ± 0.36	7.17 ± 0.34	6.88 ± 0.29	5.86 ± 0.39
Y_{GX}	$\frac{g_{Glucose}}{g_{Biomass}}$	30.40 ± 8.85	20.57 ± 2.95	21.95 ± 1.19	10.57 ± 4.47
Y_{FrX}	$\frac{g_{Fructose}}{g_{Biomass}}$	–	5.97 ± 2.84	9.47 ± 1.19	8.17 ± 4.41
Y_{IX}	$\frac{g_{Intermediate}}{g_{Biomass}}$	4.86 ± 0.68	3.49 ± 0.46	6.93 ± 0.80	4.19 ± 0.47
Y_{IF}	$\frac{g_{Intermediate}}{g_{Fumaric\ acid}}$	$(2.19 \pm 0.16) \cdot 10^{-1}$	$(1.31 \pm 0.32) \cdot 10^{-1}$	$(3.49 \pm 0.88) \cdot 10^{-1}$	$(3.45 \pm 0.79) \cdot 10^{-1}$

To generate a deeper understanding of the influence of certain parameters onto the proposed model, a sensibility analysis of certain parameters was performed throughout the proposal of alternative scenarios. We can appreciate that the model predicts a higher yield to fumaric acid when a total detoxification of the APH is attained, while a higher amount of glucose and fructose at the beginning results in higher titres for the acid and by-products, but not in higher yields. Evidently, considering the environmental effects on the biocatalytic capacity of the fungus, these results are predictions that need to be validated with a thorough experimentation. This analysis has been included as Supplementary Material.

Regarding statistical parameters in **Table 5**, is clearly observed that the fit of the proposed models to experimental data of the four experiments is accurate from an statistical perspective: very high F_{95} values, much higher than the theoretical or threshold one to reject the null hypothesis at 95% confidence (between 20 and 30 for each experiment data number and the kinetic model parameter number), a very low value of RMSE (corresponding to similar values for experimental data and data obtained by calculation with the kinetic model and the parameters retrieved for the relevant experiment). Moreover, the percentage of variation explained is relatively closed to 100%, so experimental and calculated, with the model, trends of the concentrations with time are very similar.

Table 5. Statistical parameters of proposed kinetic modelling.

Parameter	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Experiment 4
RMSE	0.088	0.086	0.089	0.127
F_{95}	195430	95366	114079	37696

% VE	96.28	95.50	96.55	96.93
------	-------	-------	-------	-------

4. Conclusions

R. arrhizus is proven to be able to produce fumaric acid from pure glucose and glucose:fructose mixtures media, providing relatively high final concentrations that are even better when glucose:fructose mixtures are used, instead of only glucose.

APH is a suitable substrate for this fermentative processes, with an adequate sugar concentration to reach appropriate production yields. APH detoxification reduces its high content in phenolics and antioxidants, but still a high amount remains. It can suppose a disadvantage and generate inhibitory effects on cellular growth and production. Adding more nitrogen, reducing the stress due to its relative deficiency, results in relatively low yields but fumaric acid titers are recovered.

Finally, a proposed kinetic model can describe and predict the behavior of the process in the four conditions here tested, through an accurate description of the reaction scheme, providing optimum goodness-of-fit statistical parameters. Kinetic parameters reflect the effects of the chemical changes in the broth due to the modifications in the type of carbon source and the amount of nitrogen source.

Author Contributions: Conceptualization, V.M.-D., M.L. and V.E.S.; methodology, V.M.-D., J.G.-M. and A.G.-M.; investigation, V.M.-D., J.G.-M. and A.G.-M.; data curation, V.M.-D.; writing—original draft preparation, V.M.-D.; writing—review and editing, V.E.S. and M.L.; supervision, V.E.S. and M.L.; project administration, V.E.S. and M.L.; funding acquisition, V.E.S. and M.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Spanish Science and Innovation Ministry through a pre-doctoral grant for V.M.D. and the research project VALOPACK [grant number: PRE2018-084908; research project code: PID2020-114365RB-C21], and European Commission with the ERA-net project SPAREC [research project code: ERA-Net SUSFOOD2 PCI2018-093114], all of which are thankfully appreciate.

Acknowledgments: Concentrados Villaviciosa S.A. is sincerely grateful for fruit wastes supply employed in the present study.

ASA Spezialenzyme GmbH is kindly acknowledged for its contribution as consultant on enzymes selection and enzyme supply.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Portada - Desarrollo Sostenible Available online: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/> (accessed on May 17, 2022).
- Mat Aron, N.S.; Khoo, K.S.; Chew, K.W.; Show, P.L.; Chen, W.H.; Nguyen, T.H.P. Sustainability of the four generations of biofuels – A review. *Int. J. Energy Res.* **2020**, *44*, 9266–9282, doi:10.1002/er.5557.
- Batten, S. Climate Change and the Macro-Economy: A Critical Review. *SSRN Electron. J.* **2018**, doi:10.2139/ssrn.3104554.
- Moral-Zamorano, M.; Quijada-Garrido, I.; San-Miguel, V.; Serrano, B.; Baselga, J.; Hashmi, S.; Stadler, F.J.; García-Peñas, A. Concentration effect over thermoresponse derived from organometallic compounds of functionalized poly(N-isopropylacrylamide-co-dopamine methacrylamide). *Polymers (Basel)*. **2021**, *13*, doi:10.3390/polym13223921.
- Ripoll, V.; Rodríguez, A.; Ladero, M.; Santos, V.E. High 2,3-butanediol production from glycerol by *Raoultella terrigena* CECT 4519. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2020**, *43*, 685–692, doi:10.1007/s00449-019-02266-8.
- Esteban, J.; Ladero, M. Food waste as a source of value-added chemicals and materials: a biorefinery perspective. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2018**, *53*, 1095–1108, doi:10.1111/ijfs.13726.
- Nanda, S.; Rana, R.; Sarangi, P.K.; Dalai, A.K.; Kozinski, J.A. A broad introduction to first-, second-, and third-generation biofuels. *Recent Adv. Biofuels Bioenergy Util.* **2018**, 1–25, doi:10.1007/978-981-13-1307-3_1.

8. Straathof, A.J.J.; Wahl, S.A.; Benjamin, K.R.; Takors, R.; Wierckx, N.; Noorman, H.J. Grand Research Challenges for Sustainable Industrial Biotechnology. *Trends Biotechnol.* **2019**, *37*, 1042–1050, doi:10.1016/j.tibtech.2019.04.002. 570
9. Garcia-Montalvo, J.; Garcia-Martin, A.; Ibañez-Bujan, J.; Santos, V.E.; Yustos, P.; Bolivar, J.M.; Ladero, M. Extraction of Antioxidants from Grape and Apple Pomace: Solvent Selection and Process Kinetics. *Appl. Sci.* **2022**. 572
10. Arias, A.; Feijoo, G.; Moreira, M.T. Exploring the potential of antioxidants from fruits and vegetables and strategies for their recovery. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2022**, *77*, 102974, doi:10.1016/j.ifset.2022.102974. 574
11. Perussello, C.A.; Zhang, Z.; Marzocchella, A.; Tiwari, B.K. Valorization of Apple Pomace by Extraction of Valuable Compounds. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2017**, *16*, 776–796, doi:10.1111/1541-4337.12290. 576
12. Werpy, T.; Petersen, G. Top Value Added Chemicals from Biomass Volume I—Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas Energy Efficiency and Renewable Energy. *Top Value Added Chem. from Biomass* **2004**. 578
13. Roa Engel, C.A.; Straathof, A.J.J.; Zijlmans, T.W.; Van Gulik, W.M.; Van Der Wielen, L.A.M. Fumaric acid production by fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *78*, 379–389, doi:10.1007/s00253-007-1341-x. 580
14. McGinn, S.M.; Beauchemin, K.A.; Coates, T.; Colombatto, D. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *J. Anim. Sci.* **2004**, *82*, 3346–3356, doi:10.2527/2004.82113346x. 582
15. Liu, Y.; Song, J.; Tan, T.; Liu, L. Production of Fumaric Acid from L-Malic Acid by Solvent Engineering Using a Recombinant Thermostable Fumarase from *Thermus thermophilus* HB8. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2015**, *175*, 2823–2831, doi:10.1007/s12010-014-1468-z. 584
16. El-Enshasy, H.A. Filamentous Fungal Cultures-Process Characteristics, Products, and Applications. *Bioprocess. Value-Added Prod. from Renew. Resour.* **2007**, 225–261, doi:10.1016/B978-044452114-9/50010-4. 587
17. Zhang, K.; Yang, S.T.; Chalmers, J.J.; Wood, D. Fumaric Acid Fermentation by *Rhizopus oryzae* with Integrated Separation Technologies. **2012**, 1–210. 589
18. Martin-Dominguez, V.; Estevez, J.; De Borja Ojembarrena, F.; Santos, V.E.; Ladero, M. Fumaric acid production: A biorefinery perspective. *Fermentation* **2018**, *4*, doi:10.3390/fermentation4020033. 591
19. Martin-Dominguez, V.; Bouzas-Santiso, L.; Martinez-Peinado, N.; Santos, V.E.; Ladero, M. Kinetic Modelling of the Coproduction Process of Fumaric and Malic Acids by *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526. *Processes* **2020**, *8*, doi:10.3390/pr8020188. 593
20. Xu, Q.; Li, S.; Huang, H.; Wen, J. Key technologies for the industrial production of fumaric acid by fermentation. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 1685–1696, doi:10.1016/j.biotechadv.2012.08.007. 595
21. Zhang, K.; Yu, C.; Yang, S.T. Effects of soybean meal hydrolysate as the nitrogen source on seed culture morphology and fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*. *Process Biochem.* **2015**, *50*, 173–179, doi:10.1016/j.procbio.2014.12.015. 597
22. Jiménez-Quero, A.; Pollet, E.; Zhao, M.; Marchioni, E.; Avérous, L.; Phalip, V. Fungal fermentation of lignocellulosic biomass for itaconic and fumaric acid production. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *27*, 1–8, doi:10.4014/jmb.1607.07057. 599
23. Gołebiewska, E.; Kalinowska, M.; Yildiz, G. Sustainable Use of Apple Pomace (AP) in Different Industrial Sectors. *Materials (Basel)*. **2022**. 601
24. Vukušić, J.L.; Millenautzki, T.; Cieplik, R.; Obst, V.; Saaid, A.M.; Clavijo, L.; Zlatanovic, S.; Hof, J.; Mösche, M.; Barbe, S. Reshaping Apple Juice Production Into a Zero Discharge Biorefinery Process. *Waste and Biomass Valorization* **2021**, *12*, 3617–3627, doi:10.1007/s12649-020-01245-5. 603
25. de la Torre, I.; Ladero, M.; Santos, V.E. D-lactic acid production from orange waste enzymatic hydrolysates with *L. delbrueckii* cells in growing and resting state. *Ind. Crops Prod.* **2020**, *146*, 112176, doi:10.1016/j.indcrop.2020.112176. 606
26. Senit, J.J.; Velasco, D.; Gomez Manrique, A.; Sanchez-Barba, M.; Toledo, J.M.; Santos, V.E.; Garcia-Ochoa, F.; Yustos, P.; Ladero, M. Orange peel waste upstream integrated processing to terpenes, phenolics, pectin and monosaccharides: Optimization approaches. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *134*, 370–381, doi:10.1016/j.indcrop.2019.03.060. 608
27. Krull, S.; Eidt, L.; Hevekerl, A.; Kuenz, A.; Prüße, U. Itaconic acid production from wheat chaff by *Aspergillus terreus*. *Process* 611

- Biochem.* **2017**, *63*, 169–176, doi:10.1016/j.procbio.2017.08.010. 612
28. Grande-Tovar, C.D.; Chaves-Lopez, C.; Serio, A.; Rossi, C.; Paparella, A. Chitosan coatings enriched with essential oils: Effects on fungi involve in fruit decay and mechanisms of action. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *78*, 61–71, doi:10.1016/j.tifs.2018.05.019. 613
614
615
29. Chandel, A.K.; Kapoor, R.K.; Singh, A.; Kuhad, R.C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 1947–1950, doi:10.1016/j.biortech.2006.07.047. 616
617
30. Martin-Dominguez, V.; Aleman-Cabrera, P.I.; Eidt, L.; Pruesse, U.; Kuenz, A.; Ladero, M.; Santos, V.E. Production of Fumaric Acid by *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526: A Simple Production Medium and the Kinetic Modelling of the Bioprocess. *Fermentation* **2022**, *8*, 64. 618
619
620
31. Rhodes, R.A.; Moyer, A.J.; Smith, M.L.; Kelley, S.E. Production of fumaric acid by *Rhizopus arrhizus*. *Appl. Microbiol.* **1959**, *7*, 74–80. 621
622
32. Ling, L.; Ng, T. Fermentation process for carboxylic acids. *US Pat. 4,877,731* **1989**, 1–6. 623
33. Ribeiro, L.F.; Ribani, R.H.; Francisco, T.M.G.; Soares, A.A.; Pontarolo, R.; Haminiuk, C.W.I. Profile of bioactive compounds from grape pomace (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2015**, *1007*, 72–80, doi:10.1016/j.jchromb.2015.11.005. 624
625
626
34. Ozturk, B.; Parkinson, C.; Gonzalez-Miquel, M. Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents. *Sep. Purif. Technol.* **2018**, *206*, 1–13, doi:10.1016/j.seppur.2018.05.052. 627
628
35. Dennis, J.E.; Gay, D.M.; Welsch, R.E. An adaptative nonlinear least-squares algorithm. *NBER Work. Pap.* **1977**. 629
36. Yepes, C.; Estévez, J.; Arroyo, M.; Ladero, M. Immobilization of an Industrial β -Glucosidase from *Aspergillus fumigatus* and Its Use for Cellobiose Hydrolysis. *Processes* **2022**, *10*, 1–17, doi:10.3390/pr10061225. 630
631
37. Martin-Dominguez, V.; Bouzas-Santiso, L.; Martinez-Peinado, N.; Santos, V.E.; Ladero, M. Kinetic modelling of the coproduction process of fumaric and malic acids by *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526. *Processes* **2020**, *8*, doi:10.3390/pr8020188. 632
633
38. Esteban, J.; Fuente, E.; Blanco, A.; Ladero, M.; Garcia-Ochoa, F. Phenomenological kinetic model of the synthesis of glycerol carbonate assisted by focused beam reflectance measurements. *Chem. Eng. J.* **2015**, *260*, 434–443, doi:10.1016/j.cej.2014.09.039. 634
635
39. Ichikawa, S.; Iino, T.; Sato, S.; Nakahara, T.; Mukataka, S. Improvement of production rate and yield of fumaric acid from maleic acid by heat treatment of *Pseudomonas alcaligenes* strain XD-1. *Biochem. Eng. J.* **2003**, *13*, 7–13, doi:10.1016/S1369-703X(02)00080-3. 636
637
638
40. Naude, A.; Nicol, W. Improved continuous fumaric acid production with immobilised *Rhizopus oryzae* by implementation of a revised nitrogen control strategy. *N. Biotechnol.* **2018**, *44*, 13–22, doi:10.1016/j.nbt.2018.02.012. 639
640
41. Swart, R.M.; Brink, H.; Nicol, W. *Rhizopus oryzae* for Fumaric Acid Production: Optimising the Use of a Synthetic Lignocellulosic Hydrolysate. **2022**. 641
642
42. Swart, R.M.; Ronoh, D.K.; Brink, H.; Nicol, W. Continuous Production of Fumaric Acid with Immobilised *Rhizopus oryzae*: The Role of pH and Urea Addition. *Catalysts* **2022**, *12*, doi:10.3390/catal12010082. 643
644
43. Swart, R.M.; Roux, F.; Naude, A.; Jongh, N.W. De; Nicol, W. Fumarate production with *Rhizopus oryzae*: utilising the Crabtree effect to minimise ethanol by - product formation. *Biotechnol. Biofuels* **2020**, 1–10, doi:10.1186/s13068-020-1664-8. 645
646
44. Rana, B.K.; Singh, U.P.; Taneja, V. Antifungal activity and kinetics of inhibition by essential oil isolated from leaves of *Aegle marmelos*. *J. Ethnopharmacol.* **1997**, *57*, 29–34, doi:10.1016/S0378-8741(97)00044-5. 647
648
45. Raj, T.; Chandrasekhar, K.; Morya, R.; Kumar Pandey, A.; Jung, J.H.; Kumar, D.; Singhanian, R.R.; Kim, S.H. Critical challenges and technological breakthroughs in food waste hydrolysis and detoxification for fuels and chemicals production. *Bioresour. Technol.* **2022**, *360*, 127512, doi:10.1016/j.biortech.2022.127512. 649
650
651
46. Tavares, A.P.M.; Gonçalves, M.J.A.; Brás, T.; Pesce, G.R.; Xavier, A.M.R.B.; Fernandes, M.C. Cardoon Hydrolysate Detoxification by Activated Carbon or Membranes System for Bioethanol Production. *Energies* **2022**, *15*, 652
653

- doi:10.3390/en15061993. 654
47. Yin, X.; Li, J.; Shin, H. dong; Du, G.; Liu, L.; Chen, J. Metabolic engineering in the biotechnological production of organic acids in the tricarboxylic acid cycle of microorganisms: Advances and prospects. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 830–841, doi:10.1016/j.biotechadv.2015.04.006. 655
48. Tsen, H.Y.; Tsai, S.Y. Comparison of the kinetics and factors affecting the stabilities of chitin-immobilized naringinases from two fungal sources. *J. Ferment. Technol.* **1988**, *66*, 193–198, doi:10.1016/0385-6380(88)90047-7. 656
49. Ding, Y.; Li, S.; Dou, C.; Yu, Y.; He, H. Production of fumaric acid by *Rhizopus oryzae*: Role of carbon-nitrogen ratio. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2011**, *164*, 1461–1467, doi:10.1007/s12010-011-9226-y. 657
50. Zhang, T.; Wang, Z.; Deng, L.; Tan, T.; Wang, F.; Yan, Y. Pull-in urea cycle for the production of fumaric acid in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 5033–5044, doi:10.1007/s00253-015-6556-7. 658
51. Zhang, B.; Yang, S.T. Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae*: Effects of overexpressing fumR gene on cell growth and fumaric acid biosynthesis from glucose. *Process Biochem.* **2012**, *47*, 2159–2165, doi:10.1016/j.procbio.2012.08.009. 659
52. Zhang, K.; Yang, S.T. In situ recovery of fumaric acid by intermittent adsorption with IRA-900 ion exchange resin for enhanced fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochem. Eng. J.* **2015**, *96*, 38–45, doi:10.1016/j.bej.2014.12.016. 660
53. Sebastian, J.; Rouissi, T.; Brar, S.K. Miscanthus sp. – Perennial lignocellulosic biomass as feedstock for greener fumaric acid bioproduction. *Ind. Crops Prod.* **2022**, *175*, 114248, doi:10.1016/j.indcrop.2021.114248. 661
54. Deng, F.; Aita, G.M. Fumaric Acid Production by *Rhizopus oryzae* ATCC® 20344™ from Lignocellulosic Syrup. *Bioenergy Res.* **2018**, *11*, 330–340, doi:10.1007/s12155-018-9899-y. 662
55. Papadaki, A.; Papapostolou, H.; Alexandri, M.; Kopsahelis, N.; Papanikolaou, S.; de Castro, A.M.; Freire, D.M.G.; Koutinas, A.A. Fumaric acid production using renewable resources from biodiesel and cane sugar production processes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 35960–35970, doi:10.1007/s11356-018-1791-y. 663
56. Groff, M.C.; Scaglia, G.; Gaido, M.; Kassuha, D.; Ortiz, O.A.; Noriega, S.E. Kinetic modeling of fungal biomass growth and lactic acid production in *Rhizopus oryzae* fermentation by using grape stalk as a solid substrate. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2022**, *39*, 102255, doi:10.1016/j.bcab.2021.102255. 664
57. Ajala, E.O.; Ajala, M.A.; Onoriemu, O.O.; Akinpelu, S.G.; Bamidele, S.H. Lactic acid production: Utilization of yam peel hydrolysate as a substrate using *Rhizopus oryzae* in kinetic studies. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* **2021**, 1031–1045, doi:10.1002/bbb.2213. 665
- 654 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681

