



EDUCACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®

Instituto Tecnológico de Orizaba

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

“ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN EL
PROCESO FERMENTATIVO DE LA PRODUCCION
DE XILITOL”.

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA QUÍMICA**

PRESENTA:

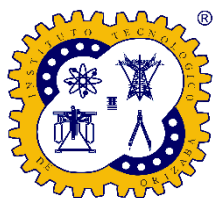
*I.Q. Diana Laura Martínez
Martínez*

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Leticia López Zamora

CO-DIRECTOR DE TESIS:

*Dra. María Guadalupe Aguilar
Uscanga*





Orizaba, Veracruz, 08/noviembre/2022
Dependencia: División de Estudios de
Posgrado e Investigación
Asunto: Autorización de Impresión
OPCION: I

C. DIANA LAURA MARTÍNEZ MARTÍNEZ
Candidato(a) a Grado de Maestro en:
CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA
P R E S E N T E.-

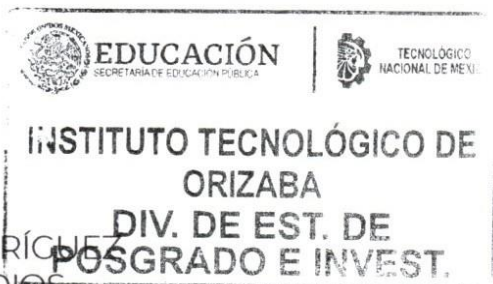
De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros e Institutos Tecnológicos Federales del Tecnológico Nacional de México, de la Secretaría de Educación Pública, y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

"Estudio de los factores que afectan el proceso fermentativo de la producción de xilitol".

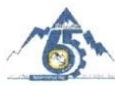
Comunico a Usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
CIENCIA - TÉCNICA - CULTURA®

Dr. MARIO LEONCIO ARRIJOA RODRÍGUEZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



OG-13-F06





Orizaba, Veracruz, 30/septiembre/2022
Asunto: **Revisión de trabajo escrito**

C. MARIO LEONCIO ARRIJOA RODRÍGUEZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PRESENTE.-

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (la) C.

DIANA LAURA MARTÍNEZ MARTÍNEZ

La cual lleva el título de:

**ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN EL PROCESO FERMENTATIVO DE LA
PRODUCCIÓN DE XILITOL.**

Y concluyen que se acepta.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
CIENCIA – TÉCNICA – CULTURA®

PRESIDENTE: DRA. LETICIA LÓPEZ ZAMORA

SECRETARIO: DR. EUSEBIO BOLAÑOS REYNOSO

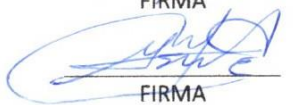
VOCAL: DRA. ROSALÍA CERECERO ENRÍQUEZ

VOCAL SUP.: DRA. MARÍA GUADALUPE AGUILAR USCANGA


FIRMA


FIRMA


FIRMA


FIRMA

TA-09-18



Declaración de originalidad y cesión de derechos

Orizaba, Veracruz, el día 10 del mes de noviembre del año 2022.

El(la) que suscribe

C. Diana Laura Martínez Martínez

Declaro que esta tesis, que tiene una extensión de 94 cuartillas, ha sido escrita por mí y constituye el registro escrito del trabajo de la tesis titulada

"Estudio de los factores que afectan el proceso fermentativo de la producción de xilitol"

del programa: Maestría en Ciencias de Ingeniería Química bajo la asesoría y dirección del (la) Dra. Leticia López Zamora y Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga y no ha sido sometida en ninguna otra institución previamente.

Todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal y, en los casos que así lo requieran, cuento con las debidas autorizaciones de quienes poseen los derechos patrimoniales. Por lo tanto, me hago responsable de cualquier litigio o reclamación relacionada con derechos de propiedad intelectual, exonerando de toda responsabilidad al Tecnológico Nacional de México campus Orizaba.

También declaro que, al presentar esta tesis, cedo los derechos del trabajo al Tecnológico Nacional de México campus Orizaba para su difusión, con fines académicos y de investigación, bajo las regulaciones propias de la institución y que si existe algún acuerdo de confidencialidad de la información lo haré saber en forma escrita para que se omitan las secciones correspondientes.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: depi_orizaba@tecnm.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente de este.



Diana Laura Martínez Martínez
Nombre y firma

AGRADECIMIENTOS

La paciencia, el amor recibido, y la dedicación con la que todos los días mis padres se preocupaban por mi avance y desarrollo de esta tesis, es único y lo agradezco infinitamente. Gracias a mi madre por ser la principal promotora de mis sueños y estar dispuesta a acompañarme cada larga y agotadora noche de estudio y de trabajo, a mi padre por confiar y creer en mí y apoyarme, siempre desear y anhelar lo mejor para mi vida, gracias por el consejo y por sus palabras que me guían durante mi vida.

Hijo, eres mi orgullo y mi gran motivación, libras mi mente de todos los problemas que se presentan, y me impulsan cada día a superarme en la carrera de ofrecerte siempre lo mejor. No es fácil, pero tal vez si no te tuviera, no habría logrado tantas cosas. Gracias a Dios por ponerme en frente a este niño hermoso, mi Santi, que, aunque aún no habla y su único medio es expresarse en llanto, me ha enseñado muchas sabías lecciones de vida. Muchas gracias hijo, porque sin tu ayuda, no habría logrado desarrollar con éxito, mi nuevo grado profesional.

Mis hermanos Edith, Ericka y Efrén, que día a día con su presencia, respaldo y cariño me impulsan para salir adelante, de saber que mis logros también son suyos. A mis sobrinas hermosas, Sofia y Lia, que siempre me han brindado mucha felicidad y risas.

Agradezco a la universidad Instituto Tecnológico Nacional de México, campus Orizaba, por haberme aceptado y ser parte de ella, por abrirme las puertas de su seno científico para poder estudiar mi posgrado.

Agradezco también a mi asesora de tesis a la Dra. Leticia López Zamora, por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento, así como haberme tenido toda la paciencia del mundo para guiarme durante todo el desarrollo de la tesis. A mis amigos, por su compañerismo, amistad y apoyo moral que han aportado en un alto porcentaje a mis ganas de seguir adelante en este largo camino de la maestría.

Gracias a Dios por la vida de mis padres, mis hermanos, sobrinas y mi hijo, también porque cada día bendice mi vida con la hermosa oportunidad de estar y disfrutar el lado de las personas que se que me aman, y alas que yo se que más amo en mi vida.

Gracias a la vida por este nuevo triunfo, gracias a todas las personas que aportaron y creyeron en la realización de esta tesis.

Y gracias a mi por ser fuerte y seguir adelante, por ser valiente cada vez que quise salir corriendo. Por seguir intentando sin rendirme. Por soñar y amar a pesar de las circunstancias, me agradezco, me valoro y me felicito.

RECONOCIMIENTOS

PRESENTACIONES DE CONGRESO

2022	Expositor	<i>Uso de la levadura <i>Candida tropicalis</i>, para la producción de xilitol y su uso en residuos lignocelulósicos.</i> Academia de Investigación y Docencia en Ingeniería Química. XLIII Encuentro Nacional de la AMIDIQ. 23 al 26 de agosto del 2022.
2022	Expositor	<i>Estudio de los factores que afectan el proceso fermentativo para la producción de xilitol.</i> Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. XV encuentro de investigación del Área Académica de Ciencias de la Tierra y Materiales. 28 al 30 de septiembre del 2022.

RESUMEN

Estudio de los factores que afectan el proceso fermentativo de la producción de xilitol.

Elaborado por: Ing. Diana Laura Martínez Martínez.
Dirigido por: Dra. Leticia López Zamora.
Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

En el mundo actual existe un gran auge en las sustancias conocidas como edulcorantes por su capacidad de reemplazo del azúcar. Entre ellos se encuentra el xilitol que es un edulcorante calórico artificial y un polialcohol de gran importancia por su alta estabilidad química y por sus características especiales. El xilitol tiene 5 carbonos y se encuentra presente en frutas y verduras. Para poder obtenerlo se requiere de una serie una de técnicas biotecnológicos que consiste en extraer los azúcares fermentables de residuos agroindustriales por medio de hidrólisis ácida, la xilosa es degradada por medio de levaduras del género *Candida* por un proceso conocido como fermentación. El objetivo de este trabajo es conocer y evaluar dos parámetros importantes en la producción de xilitol, la aireación y la agitación durante el proceso, para poder saber que tanto influye en la fermentación por lotes. Se realizó la experimentación de un 1 L de medio sintético rico en sales y nutrientes (4 g/L de Urea, 5 g/L de KH_2PO_4 , 0.4 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de xilosa), para el correcto crecimiento de la levadura *Candida tropicalis* IEC5- ITV en 4 experimentaciones por medio de un biorreactor Applikon My-control con una capacidad de 3 L con los valores de 11.3, 73.47 y 110.5, de OTR ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$), kLa (h^{-1}) de 1.44, 9.36 y 14.04 por medio de una tasa de aireación (vvm) de 0.1, 0.5 y 1, a 200 rpm, y una fermentación de 33.1 de OTR ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$), 4.32 de kLa (h^{-1}) y por medio de aireación (vvm) de 1, a 100 rpm, sometido a una temperatura de 30°C, en un medio sintético neutro (pH de 5.5), con una concentración de inóculo del 10%. Posteriormente para la validación por medio de hidrolizados ácidos se experimentaron con dos materias primas, RM (Residuos de Madera) con un hidrolizado ácido de H_2SO_4 con una concentración de 3.36 % v/v, RSL fija 1:6 g:mL con un duración de 30 min. y RCC (Residuos de cascara de café) bajo una concentración de ácido de 3.45 % v/v, RSL de 1:3.36 g:mL, con duración de 44 min, obteniendo xilosa de 15.755 y 27.55 g/L respectivamente. En el proceso de fermentación se evaluaron los valores de OTR de 73.47 ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$), kLa (h^{-1}) de 9.36 a 250 rpm en ambas muestras, con una duración de 120 h. En la muestra de la producción de xilitol fue de 1.355 g/L y para RCC fue de 7.35 g/L. En ambas cinéticas no se consumió la xilosa en su totalidad lo que causa que no exista producción de xilitol esperada, se considera que la formación de inhibidores que se forman durante el proceso fue un factor importante a tomar en cuenta, además de la limitación de oxígeno y agitación durante la fermentación, son factores a considerar que pudieron provocar estrés en la levadura y así está no desarrollo sus funciones adecuadas. Este trabajo y los resultados obtenidos pueden ser un punto de partida para nuevas investigaciones a futuro y así maximizar y optimizar la producción de xilitol.

ABSTRACT

Study of the factors affecting the fermentative process of xylitol production.

By

Advisor (s):

Ing. Diana Laura Martínez Martínez

Dra. Leticia López Zamora

Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

Currently, there is a great boom in substances known as sweeteners for their ability to replace sugar. Among them is xylitol, which is an artificial caloric sweetener and a polyol of great importance due to its high chemical stability and its special characteristics. Xylitol has 5 carbons and is present in fruits and vegetables. In order to obtain it, a series of biotechnological techniques is required, which consists of extracting fermentable sugars from agro-industrial waste by means of acid hydrolysis; xylose is degraded by means of *Candida* yeasts through a process known as fermentation. The objective of this work is to know and evaluate two important parameters in the production of xylitol, aeration and agitation during the process, in order to know how much it influences the batch fermentation. The experimentation of a 1 L of synthetic medium rich in salts and nutrients (4 g/L of Urea, 5 g/L of KH_2PO_4 , 0.4 g/L of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L of yeast extract and 20 g/L of xylose), for the correct growth of the yeast *Candida tropicalis* IEC5- ITV was carried out in 4 experiments by means of an Applikon My-control bioreactor with a capacity of 3 L with the values of 11.3, 73.47 and 110.5, of OTR ($\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$), kLa (h^{-1}) of 1.44, 9.36 and 14.04 by means of an aeration rate (vvm) of 0.1, 0.5 and 1, at 200 rpm, and a fermentation of 33.1 of OTR ($\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$), 4.32 of kLa (h^{-1}) and by aeration (vvm) of 1, at 100 rpm, at a temperature of 30°C and pH of 5.5, at an inoculum concentration of 10%. Subsequently, for the validation by means of acid hydrolysates, two raw materials were experimented with, RM (wood residues) with an acid hydrolysate of H_2SO_4 with a concentration of 3.36 % v/v, RSL fixed 1:6 g:mL with a duration of 30 min, and RCC (coffee husk residues) under an acid concentration of 3.45 % v/v, RSL of 1:3.36 g:mL, with a duration of 44 min, obtaining xylose of 15.755 and 27.55 g/L, respectively. In the fermentation process, OTR values of 73.47 ($\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$), kLa (h^{-1}) of 9.36 at 250 rpm were evaluated for both samples, with a duration of 120 h. In the sample of xylitol production was 1.355 g/L and for RCC it was 7.35 g/L. In both kinetics the xylose was not consumed in its totality which causes that there is no expected xylitol production, it is considered that the formation of inhibitors that are formed during the process was an important factor to take into account, besides the limitation of oxygen and agitation during the fermentation, are factors to consider that could cause stress in the yeast and thus it is not developing its adequate functions. This work and the results obtained can be a starting point for further research in the future to maximize and optimize xylitol production.

ÍNDICE

	PAG.
Resumen	ii
Abstract	iii
Lista de Figuras	vii
Lista de Tablas	ix
Nomenclatura	x
Introducción	1
CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEORICOS	
1.1 Edulcorantes	3
1.1.1 Clasificación de edulcorantes	3
1.1.2 Características de los edulcorantes	3
1.2 Xilitol	5
1.2.1 Propiedades y aplicaciones del xilitol	5
1.2.2 Aspectos importantes del xilitol y generalidades de su producción	8
1.2.3 Situación actual en el mercado del xilitol	11
1.3 Residuos Lignocelulósicos	13
1.3.1 Celulosa	13
1.3.2 Hemicelulosa	13
1.3.3 Lignina	14
1.3.4 Residuos más empleados en la producción de xilitol	14
1.4 Pretratamiento ácido	15
1.4.1 Compuestos tóxicos de la hidrólisis ácida	16
1.5 Fermentación	18
1.5.1 Fermentación Continua	18
1.5.2 Fermentación discontinua	18
1.6 Modo de operación del bioreactor	20
1.6.1 Cultivo por lote	21
1.6.2 Cultivo continuo	22
1.6.3 Cultivo por lote alimentado	23
1.7 Factores que afectan el proceso fermentativo	24
1.7.1 Microorganismos empleados en la producción de xilitol	24

1.7.2 Composición del medio de cultivo	25
1.7.3 Requerimientos nutricionales	25
1.7.4 Condiciones fisicoquímicas a emplear en la fermentación	26
1.8 Levaduras	27
1.8.1 Tipos de levaduras para producción de xilitol	27
1.8.2 Metabolismo de la xilosa en las levaduras	29
1.8.3 Levadura <i>Candida Tropicalis</i> IEC5-ITV	31
1.8.4 Factores que influyen en la velocidad de crecimiento	33
1.8.5 Influencia de la transferencia de oxígeno	35
1.9 Antecedentes	36
CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 Obtención y tratamiento de materia prima	41
2.2 Adecuación de la materia prima	41
2.3 Sembrado y mantenimiento de la cepa	42
2.3.1 Medio de activación	42
2.3.2 Medio de conservación	42
2.4 Preparación del inóculo	43
2.5 Fermentación por lote con medio sintético	43
2.6 Hidrolisis ácida	45
2.7 Fermentación de hidrolizado ácido	46
2.8 Métodos analíticos	46
2.8.1 Determinación de biomasa	46
2.8.2 Conteo celular	46
2.8.3 Viabilidad celular	48
2.8.4 Análisis de biomasa	48
2.8.5 Análisis de consumo de sustratos y formación de productos	48
2.9 Análisis de datos experimentales	49
2.9.1 Cálculo de rendimientos y productividades	49
2.9.2 Velocidades globales	50
2.9.3 Velocidades específicas	50
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 Composición química de las muestras RCC y RM	52
3.2 Análisis de los factores durante la fermentación de xilosa	54
3.2.1 Efecto de la OTR	59
3.3 Validación del proceso fermentativo en hidrolizado ácido	61

3.3.1 Fermentación de hidrolizados ácidos lignocelulósicos de RM y RCC para producción de xilitol.	61
3.3.2 Efecto del pH durante la fermentación	67
CONCLUSIONES	69
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	71
ANEXOS	80

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PAG
1.1 Estructura de xilitol (Rowe <i>et al.</i> , 2006)	5
1.2 Dulzura relativa comparada con diversos edulcorantes (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2017)	6
1.3 Producción química del xilitol (Martínez, 2013)	9
1.4 Producción biotecnológica de xilitol (Cheng <i>et al.</i> , 2013)	10
1.5 Proceso de producción de xilitol en 2 métodos (Rosales, 2018)	11
1.6 Mercado global del xilitol (Industry Experts, 2017)	12
1.7 Composición de material lignocelulósico (Polaina y MacCabe., 2017)	15
1.8 Fases de crecimiento celular en un reactor discontinuo (Martos, 2011)	19
1.9 Esquemización de las partes de un reactor (Serrano, 2017)	21
1.10 Reactor simple intermitente homogéneo (Fogler, 2008)	22
1.11 Biorreactor Continuo (Martos, 2011)	23
1.12 Esquema de Biorreactor Fed Batch (Ahmad <i>et al.</i> , 2019)	24
1.13 Mecanismos utilizados por las levaduras para la absorción de xilosa. (a): Difusión facilitada impulsada por el gradiente de concentración entre el medio extracelular y el citosol. (b): Sistema protón-xilosa impulsada por la fuerza motriz del transporte de protón, mantenido por un protón-ATPasa (Weusthuis <i>et al.</i> , 1994)	29
1.14 Metabolismo de la glucosa y xilosa en levaduras productoras de xilitol (Granström, 2002)	30
1.15 Medio de cultivo clásico de referencia de levaduras del género <i>Candida</i> (Palacio y Cuétara, 2008)	32
2.1 Metodología general del proceso de obtención de xilitol	40
2.2 Esquema del Birreactor Applicon My-Control (Hardware Manual, 2008)	44
2.3 Detalle de rejilla de una cámara Neubauer	47

3.1	Comparación de composición Lignocelulósica de RM	53
3.2	Comparación de composición Lignocelulósica de RCC	54
3.3	Consumo de xilosa para a) MF1 (11.3 gL ⁻¹ h ⁻¹), b) MF2 (73.47 gL ⁻¹ h ⁻¹), c) MF3 (110.5 gL ⁻¹ h ⁻¹) y d) MF4 (33.1) en un medio sintético de <i>Candida tropicalis</i> IEC5-ITV	55
3.4	Cinética de crecimiento de biomasa en medio sintético de las 4 pruebas de fermentación	57
3.5	Efecto de la aireación sobre la producción de xilitol	60
3.6	Consumo de xilosa y producción de xilitol con una OTR de 73.47 gL ⁻¹ h ⁻¹ de hidrolizado de RCC e hidrolizado de RM, por medio de <i>Candida tropicalis</i> IEC5-ITV	62
3.7	Consumo de glucosa y producción de etanol con una OTR de 73.47 gL ⁻¹ h ⁻¹ de a) hidrolizado de RCC y b) hidrolizado de RM, empleando <i>Candida tropicalis</i> IEC5-ITV	64
3.8	Fermentación de hidrolizado ácido con una OTR de 73.47 gL ⁻¹ h ⁻¹ de RCC y RM en a) Formación de Glicerol, b) Consumo de ácido acético y, c) Producción de Furfural, empleando <i>Candida tropicalis</i> IEC5-ITV	65
3.9	Lecturas de cinéticas de hidrolizado de RM y RCC, evaluando el pH con respecto al tiempo	67

LISTA DE TABLAS

TABLA	PAG.
1.1 Clasificación de edulcorante (García <i>et al.</i> , 2013)	4
1.2 Descripción de los alcoholes de azúcar (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2017)	4
1.3 Propiedades químicas y biológicas del xilitol (Mäkinen, 1978)	7
1.4 Residuos más comunes para producir xilitol (Vele <i>et al.</i> , 2021)	15
1.5 Principales inhibidores de la fermentación (Oliva, 2003)	17
1.6 Requerimientos nutricionales más comunes. (Santos y Faulk., 2019)	26
1.7 Producción de xilitol por diferentes levaduras y condiciones de fermentación utilizando diferentes residuos lignocelulósicos como materia prima (Espinoza, 2019).	28
1.8 Estudios sobre la producción de xilitol de levaduras del género <i>Candida</i> (Martínez, 2013)	31
1.9 Producción de xilitol de <i>Candida tropicalis</i> (Granström, 2002)	33
2.1 Composición del medio sintético para la <i>Candida tropicalis</i> .	33
2.2 Composición del medio de conservación	42
2.3 Características y parámetros de fermentación utilizadas en este trabajo. (Carrera, 2021)	45
3.1 Composición de residuos lignocelulósicos de RCC y RM	52
3.2 Condiciones de fermentación empleadas para la producción de xilitol y parámetros fermentativos	59
3.3 Parámetros de las cinéticas de las fermentaciones de RM y RCC	63

NOMENCLATURA

Símbolo	Descripción	Unidad
RCC	Residuo de cáscara de café	
RM	Residuo de madera	
OTR	Velocidad de transferencia de oxígeno	$\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$
ST	Número de sólidos totales	%
d	Disolución	mL
N	Número de células contadas	
n	Número de cuadros grandes contados	
k_{La}	Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	$\text{s}^{-1}\text{h}^{-1}$
$Y_{\frac{x}{s}}$	Rendimiento de biomasa	g de biomasa/ g de sustrato
$Y_{\frac{p}{s}}$	Rendimiento de producto	g de producto/ g de sustrato
Q	Productividad volumétrica	g de producto/ Litro* hora

INTRODUCCIÓN

Anualmente grandes cantidades de desechos agrícolas, vegetales y agroindustriales se generan en el ambiente, lo que provoca una problemática seria de contaminación ambiental y pérdida de fuentes que pueden ser aprovechados. Es por ello que la comunidad científica tiene gran interés en aprovechar estos desechos y encontrar nuevas tecnologías para obtener productos más verdes y con buen valor añadido. Los desechos de madera y cascara de café conocidos como residuos lignocelulósicos se encuentran dentro de los desechos antes mencionados.

En México la industria maderera genera desechos anuales de hasta 8 millones de m³, en la industria cafetalera se generan residuos de alrededor de 910 mil millones de toneladas anuales, por lo que se consideran una materia prima muy útil para la producción de xilosa por hidrólisis ácida, que, a su vez, puede convertirse en xilitol.

Este compuesto conocido por su alto poder edulcorante es semejante a la sacarosa, provee de muchas ventajas entre las que se encontró que tiene un efecto anti caries, con un sabor agradable incluso después de la ingestión. Beneficia a los seres humanos que son aquejados por diabetes y sustituir la sacarosa, es muy utilizada en el campo clínico, porque se absorbe bien en infusiones postoperatorias en pacientes que tienen dificultad para metabolizar la sacarosa, en osteoporosis y mejora ósea de propiedades bioquímicas óseas en presencia de osteoporosis y prevención de otitis media aguda, sin embargo, el uso más importante es la prevención de caries dental, ya que disminuye el crecimiento de microorganismos causantes de caries.

Existen dos alternativas para obtener este componente: la síntesis química y la vía biotecnológica. En esta investigación se exploró la segunda opción que consiste en utilizar un microorganismo productor de xilitol, que degrade la xilosa obtenida de los residuos lignocelulósicos por medio de una fermentación por lote. En el presente

trabajo se muestra un estudio de los parámetros que interactúan y pueden afectar el proceso fermentativo para la creación de xilitol extraído de desechos de café y madera, por medio del uso de la fracción líquida en la hidrólisis ácida. Entre los factores a considerar se encuentran la velocidad de agitación, la concentración inicial al momento de preparar el inóculo y la tasa de aireación, se estudiaron 4 OTR's en cultivo por lotes de medio sintético y posteriormente se evaluó el comportamiento de los dos diferentes residuos lignocelulósicos y así seleccionar la mejor opción para la producción de xilitol y utilizarlo como punto de partida en trabajos de investigación a futuro.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPITULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 Edulcorantes

Los edulcorantes son sustancias capaces de reemplazar el dulzor característico del azúcar y hoy en día se usan por su amplio poder edulcorante (Manzur *et al.*, 2019). La utilización de estos compuestos acalóricos como sustituto de azúcares en alimentos ha tenido su gran auge en las últimas 3 décadas (García *et al.*, 2013).

1.1.1 Clasificación de edulcorantes

Pueden clasificarse según su origen que puede ser:

- Naturales: Sustitutos de azúcar que se conocen como opciones más saludables que el azúcar mismo. Como zumos, miel, jarabe de arce, etc.
- Artificiales: Prácticamente no añaden calorías a la dieta, se necesita una fracción de este en comparación con la cantidad de azúcar que se usa para endulzar (Manzur *et al.*, 2019).

Existen otras clasificaciones como el contenido calórico (calóricos-no calóricos). En la Tabla 1.1 se presentan algunos edulcorantes y su respectiva clasificación.

El alcohol es un compuesto que se extrae del azúcar y se produce de manera natural, en cantidades reducidas en vegetales y cereales. En la Tabla 1.2 se muestran algunas características de diversos alcoholes.

1.1.2 Características de los edulcorantes

Un edulcorante natural o artificial tiene que cumplir con ciertas características entre las que se encuentran:

- Son aditivos alimentarios que pueden añadir a alimentos y bebidas.
- Actúa como sustituto del azúcar para reducir el contenido energético.
- Estabilidad química.
- Compuestos hidrofílicos (Cavagnari, 2019).

Tabla 1.1 Clasificación de edulcorantes (García *et al.*, 2013).

Calóricos	Naturales	Azúcares	Sacarosa, glucosa, dextrosa, fructosa, lactosa, maltosa, Naturales galactosa y trehalosa, tagatosa, Sucromalat.
		Edulcorantes naturales caloricos.	Miel, jarabe de arce, azúcar de palma o de coco y jarabe de sorgo.
	Artificiales	Azúcares modificados	Jarabe de maíz de alto fructosa, caramelo, azúcar invertido.
		Alcoholes del azúcar	Sorbitol, xilitol, manitol, eritritol maltitol, isomaltulosa, lactitol, glicerol.
Acalóricos	Naturales	Edulcorantes naturales sin calorías	Luo Han Guo, stevia, taumatina, pentadina, monelina, brazzeína.
	Artificiales	Edulcorantes artificiales	Aspartamo, sucralosa, sacarina, neotamo, acesulfame K, ciclamato, neohesperidina DC, alitamo, advantamo.

Tabla 1.2 Descripción de los alcoholes de azúcar. (Gutiérrez *et al.*, 2017)

Alcoholes de azúcares	Valor calórico (Cal/g)	Valor Calórico en relación al azúcar. (%)	Presencia	Dulzor en relación al azúcar. (%)
Lactitol	2-2.4	50-60	Caramelos, helados y galletas.	40
Maltitol	2.1	52	Chicles, caramelos y gominolas.	90
Xilitol	2.4	60	Chicles, mentas para el aliento, pasta de dientes y enjuagues bucales.	100
Eritritol	0.2	5	En frutas y alimentos fermentados.	70-80

1.2 Xilitol

El xilitol fue descubierto en la década de 1890 por Emil Fischer y Bertrand. Su purificación fue en la década de 1930 (Narváez, 2018). El xilitol es un alcohol poli hídrico de cinco carbonos (Gil *et al.*, 2019) como se muestra en la Figura 1.1, está presente en una cantidad muy pequeña en frutas y verduras (Ledezma *et al.*, 2018).

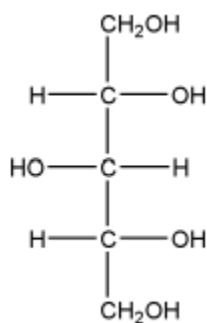


Figura 1.1 Estructura de xilitol (Rowe *et al.*, 2006)

1.2.1 Propiedades y aplicaciones del xilitol

Es un edulcorante similar a la sacarosa, pero con menor aporte calórico, y tiene un dulzor superior al sorbitol o manitol, como se muestra en la Figura 1.2. Es un componente de gran estabilidad química y microbiológica que ofrece resistencia al crecimiento de microorganismos (Gutiérrez *et al.*, 2017). Es un ingrediente natural de la dieta humana moderna porque está formado de muchos alimentos. Puede combinarse con otros polioles, tiene un bajo índice glucémico, el xilitol también ha encontrado aplicación en combinación con edulcorantes de alta intensidad, lo que ayuda a proporcionar una dulzura general más limpia y más similitud al azúcar (Rosales, 2018).

Las características más apreciadas e importantes que se conocen del metabolito xilitol se muestran a continuación en la Tabla 1.3.

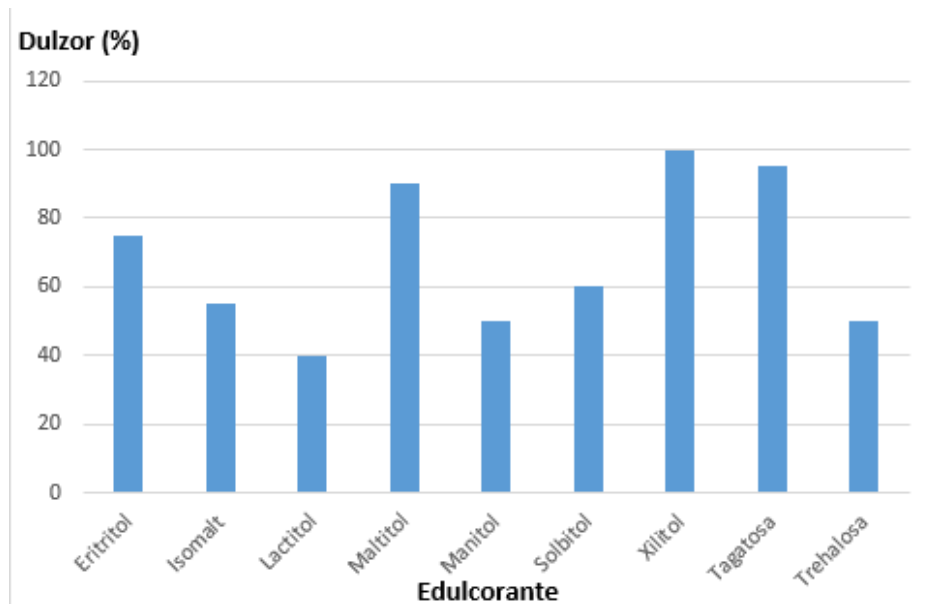


Figura 1.2 Dulzura relativa comparada con diversos edulcorantes (Gutiérrez *et al.*, 2017)

El creciente interés por el xilitol ha llevado a una fuerte demanda del producto en el mercado. Las aplicaciones potenciales se enfocan en tres tipos de industrias:

- **Industria alimentaria:** Genera beneficios importantes para la salud, lo que ha provocado su uso en productos de consumo cotidiano. En pastelería es un ingrediente ideal para la creación de productos de alta gama, su dulzura y buen sabor permite tener dulces con excelentes características para mejorar la salud y vitalidad en los seres humanos, puede combinarse con otros polialcoholes, o de manera individual, en productos pasteleros, además de ser un agente de volumen. La goma de mascar libre de azúcar es la aplicación comercial más común del xilitol en todo el mundo, se usa por sus propiedades dentales, tecnológicas y organolépticas (Rosales, 2018).

Tabla 1.3. Propiedades, químicas y biológicas del xilitol (Mäkinen, 1978).

Formula	C ₅ H ₁₂ O ₅
Peso molecular	152.15
Apariencia	Polvo blanco cristalino
Sistema de cristales	• Rómbico estable • Monocíclico, metastable.
Olor	Ninguno
Característica Óptica	Inactivo
Rango de fusión	Rombico: 93-94.5° C Monocíclico: 61-61.5 °C
Punto de ebullición	216 °C (760 mm)
Valor calórico	4.06 kcal/g
Hidroscopicidad	Con una humedad relativa elevada, el xilitol es más higroscópico que la sacarosa.
Posibles impurezas.	Manitol, sorbitol, galactitol, arabitól.
Fermentación	Es común entre ciertas bacterias y levaduras del césped.
Ocurrencias en la naturaleza	Frutas, hortalizas y vegetales; tejidos de mamíferos y microorganismos.
Adsorción	Prácticamente todo el xilitol absorbido por humanos sanos a una tasa algo más baja que la glucosa.
Destino metabólico	En humanos sanos, la mayor parte del xilitol se oxida a través de vías normales a la D-xilulosa, que es más metabolizado a glucosa

- Industria farmacéutica: El xilitol se utiliza como agente edulcorante no cariogénico en una variedad de formas farmacéuticas, como comprimidos, jarabes y recubrimientos ya que es muy eficaz para realzar el sabor de estos y enmascarar los sabores desagradables o amargos asociados a algunos activos que los componen. Se ha demostrado que reduce las caries dentales caries dental al inhibir el crecimiento de la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans* o SM. (Rowe *et al.*, 2006).

- Industria cosmetológica: En cosméticos y artículos de baño se emplea con mayor frecuencia como humectante y agente humectante de la piel, aunque también se han informado algunas aplicaciones terapéuticas (Rosales, 2018).
- Industria odontológica: Es usado en productos de higiene bucal (Rosales, 2018) porque disminuye el riesgo de caries ya que reduce los niveles de SM (*Streptococcus mutans*) (principal microorganismo cariogénico) en la placa y en la saliva y además atenúa la cantidad de ácido láctico producido por estas bacterias (Peydro *et al.*, 2019).

1.2.2 Aspectos importantes del xilitol y generalidades de su producción

En el medio ambiente el xilitol es encontrado en niveles inferiores de 1% (Rosales, 2018). La producción de este compuesto puede ser por medio de la vía química que se realiza a temperaturas y presiones elevadas (Pappu y Gummadi, 2016). Otra alternativa es la producción microbiana o enzimática de xilitol, que se está convirtiendo en una alternativa más sostenible. Se realiza en condiciones operativas con facilidad de purificación, relativamente económicas y seguras. El proceso microbiano utiliza bacterias, levaduras y hongos para la producción de xilitol a partir de xilosa o hidrolizado de hemicelulosa derivado de residuos de lignocelulosa (Pappu y Gummadi, 2017) por ejemplo, los residuos madereros y agrícola, y está compuesto en esta formada de hemicelulosa, lignina y celulosa (Ledezma *et al.*, 2018).

Producción química de xilitol

El xilitol a escala industrial es obtenido a partir de xilosa comercial por hidrogenación catalítica a altas temperaturas y presiones. El residuo lignocelulósico es sometido a un proceso hidrolítico con el fin de liberar xilosa, para después ser sujeta a la operación de hidrogenación sobre Níquel Raney. Después de la hidrogenación catalítica por medio de filtración, el catalizador se remueve, pasando a ser concentrada

y dividida mediante cromatografía, para purificarla, finalmente el xilitol se cristaliza. Dicho proceso se encuentra detallado en la Figura 1.3 (Cerioni *et al.*, 2019).

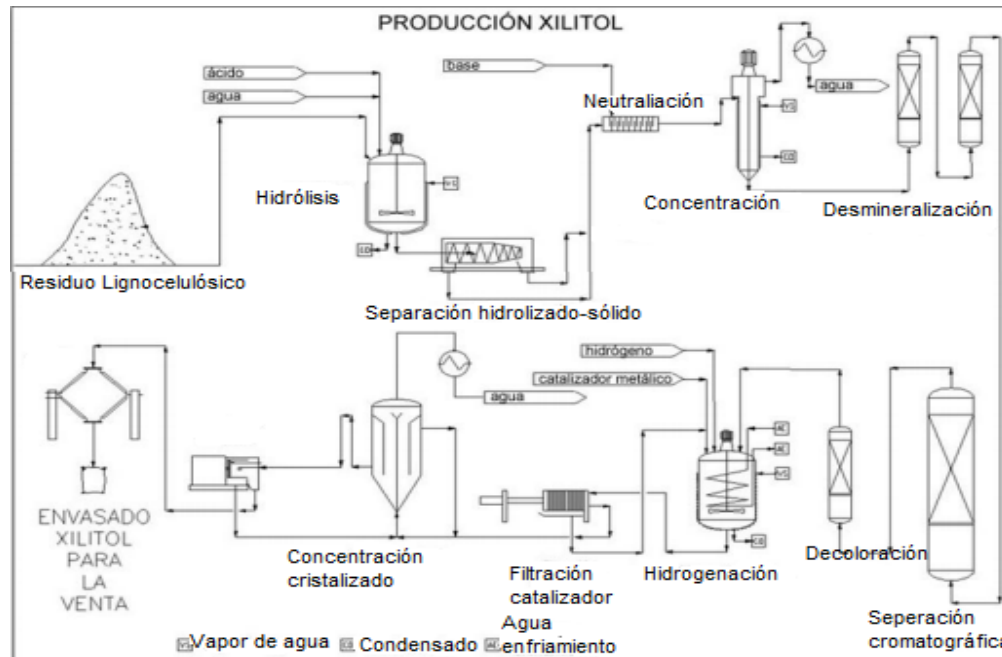


Figura 1.3 Producción química del xilitol (Martínez, 2013)

El residuo lignocelulósico es sometido a hidrólisis ácida y calor. Después de eliminar la etapa sólida, el medio hidrolizado (fase líquida) se neutraliza, concentra y desmineraliza. La xilosa del medio hidrolizado es separó por cromatografía y purifico nuevamente por decoloración. La operación principal del proceso es la hidrogenación catalítica, donde se sintetiza el xilitol en un reactor a alta presión y temperatura, el cual es obtenido y purificado por una serie de etapas de cristalización (Martínez, 2013).

Producción biotecnológica de xilitol

Una de las más prometedoras, utiliza microorganismos capaces de convertir las D-xilosas de las hemicelulosas en xilitol por medio de la fermentación de microorganismos. Los residuos agrícolas son materias primas con gran potencial para

producir xilitol debido a su alto contenido en xilanos presentes en forma de hemicelulosas. Varios estudios han explorado la producción biotecnológica de xilitol a partir de numerosos residuos agrícolas y se han obteniendo datos interesantes (Espinoza, 2020). En la Figura 1.4 se muestra la producción biotecnológica del xilitol.

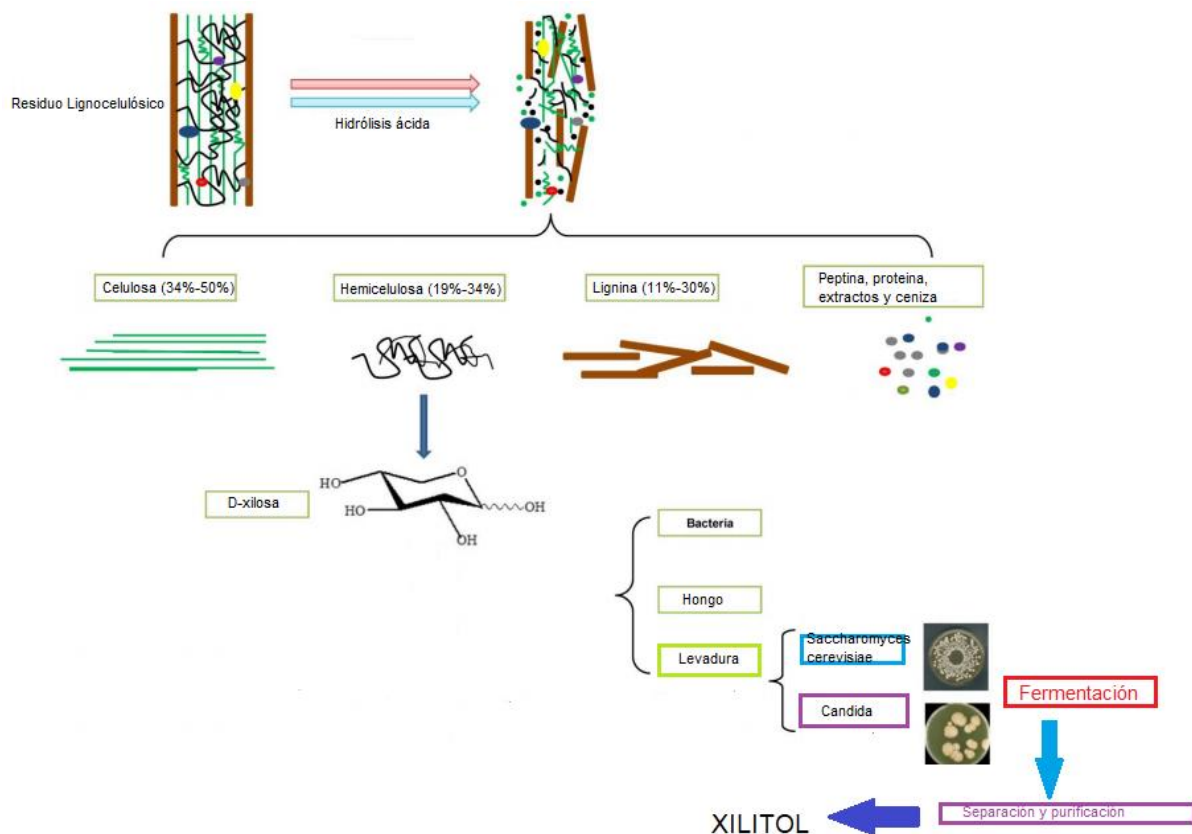


Figura 1.4 Producción biotecnológica de xilitol. Adaptado de (Cheng *et al.*, 2010)

Ambos métodos (la química y biológica) tienen un fin común, la producción de xilitol. El primer método obtiene una pureza superior al 98% pero debido a las severas condiciones del proceso de producción química del xilitol (80-140 °C, 31-40 atm, 3-5 h de reacción), los rigurosos procesos de purificación, la alta demanda energética y el moderado rendimiento de xilitol (entre el 50 y el 60 % de xilitol respecto a la xilosa total) hace que este método no sea tan factible (Espinoza, 2020). El segundo método tiene ventajas como que posee bajos costos, bajo consumo de energía, alta productividad y

rendimiento moderado (Rosales, 2018). En la Figura 1.5 se presenta un diagrama de ambos procesos y los pasos que conllevan para observar mejor una comparación entre los dos procedimientos.

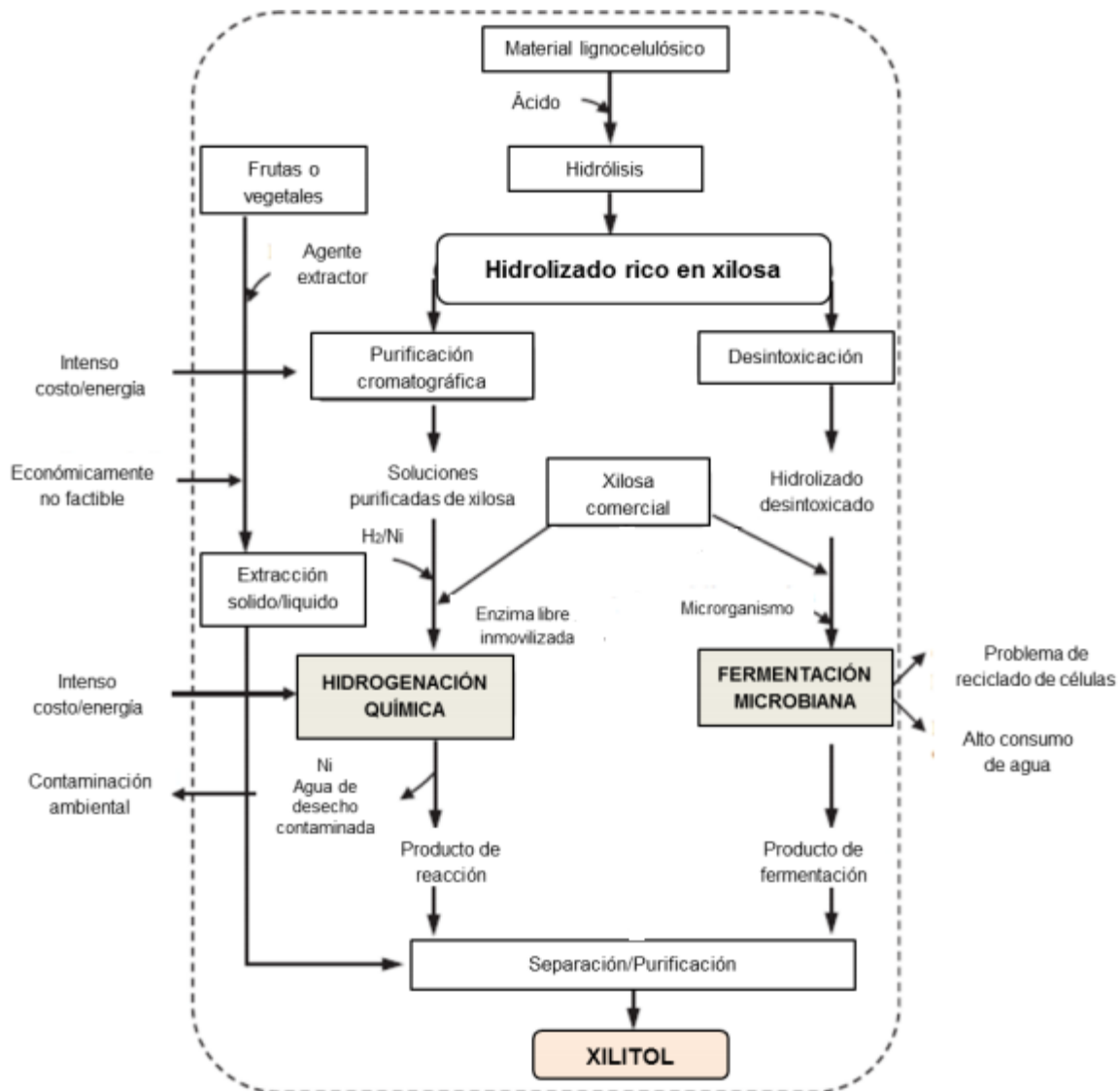


Figura 1.5 Proceso de producción de xilitol en 2 métodos. Adaptado de (Rosales, 2018)

1.2.3 Situación actual en el mercado del xilitol

El mercado mundial de xilitol se estima en 190.9 mil toneladas métricas, con un valor

de 725.9 millones de dólares en 2016 y se espera que llegue a 266.5 mil toneladas métricas con un valor de poco más de mil millones de dólares en 2022 como se muestra Figura 1.6 (Industry Experts, 2017).

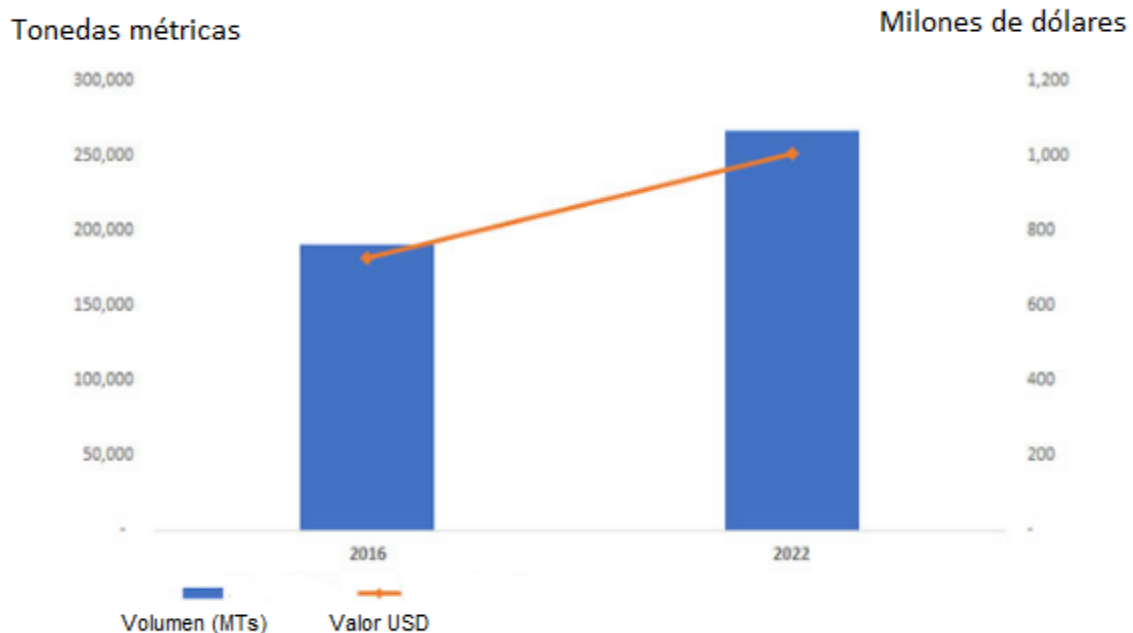


Figura 1.6 Mercado global del xilitol (Industry Experts, 2017)

El mercado mundial del xilitol está segmentado en cuatro grandes regiones: América del Norte, Europa, Asia-Pacífico y el resto del mundo. Los mercados regionales se analizan además para otros 15 países independientes en América del Norte: Estados Unidos, Canadá y México; Europa: Francia, Finlandia, Alemania, Italia, Rusia, España y Reino Unido; Asia: Australia, China, India, Japón, Corea del Sur y Australia. El mercado se analiza en todas estas grandes regiones por países clave y por los principales sectores de uso final, tanto en términos de volumen como de valor (Industry Experts, 2017). Hay varias empresas en México que lo producen por este sistema, como Comercial Ferbera, Sehyex, Comercializadora de la Industria Alimentaria, Austro-Corp, Química Alkano y Estraton México (Martínez, 2013).

1.3 Residuos Lignocelulósicos

Se definen como aquellos desechos o subproductos de residuos agrícolas (cultivos cosechados), que se generan de la creación de productos y han pasado por numerosos procesos para modificar su estado natural. El aprovechamiento integral de estos residuos puede contribuir a reducir los efectos adversos en el medio ambiente; por ejemplo, la contaminación generada durante la quema a cielo abierto de estos residuos, y al mismo tiempo, su transformación en productos útiles para algunas industrias ayudaría a reducir el coste de producción de cosméticos, medicamentos y aditivos alimentarios entre otros (Espinoza, 2020). Los materiales lignocelulósicos se componen de lignina, hemicelulosa, y celulosa (Bardales y Cabos, 2020).

1.3.1 Celulosa

La celulosa (Figura 1.7) representa alrededor de un tercio de la composición y es biosintetizada en el proceso de la fotosíntesis del vegetal, produciéndose gran cantidad anualmente de celulosa en el mundo. La celulosa es un homopolisacárido natural que consta de unidades de D-glucosa, enlazadas por uniones de 1,4'- β -D- glicosídicos, formando un polímero lineal que presenta un arreglo estructural, en el que sus grupos hidroxilos forman fuertes enlaces intramoleculares adquiriendo propiedades cristalinas (López *et al.*, 2016).

1.3.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa (Figura 1.7) es una estructura compleja de carbohidratos que consiste en polímeros de diferentes azúcares como xilosa y arabinosa (pentosas), manosa, glucosa y galactosa (hexosas) y ácidos de azúcar. La composición predominante de la hemicelulosa de la madera y cultivos agrícolas. La hemicelulosa tiene un peso molecular más bajo que la celulosa, y con cadenas laterales cortas que incluyen diferentes polímeros de azúcares, fáciles de degradarse y sirve como una relación entre la lignina y las fibras de celulosa (Díaz y Ordoñez, 2014).

1.3.3 Lignina

La lignina (Figura 1.7) es, después de la celulosa y la hemicelulosa, uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza y está presente en la pared celular. Las funciones de este componente es reforzar la estructura de la planta, la resistencia del agua para no dañar sus tallos, defensas contra un ataque microbiano y evita los efectos tóxicos provocados por especies químicas altamente reactivos (estrés oxidativo). Este componente no se disuelve en agua y es ópticamente inactiva lo que mejora su resistencia a la degradación. (Díaz y Ordoñez, 2014).

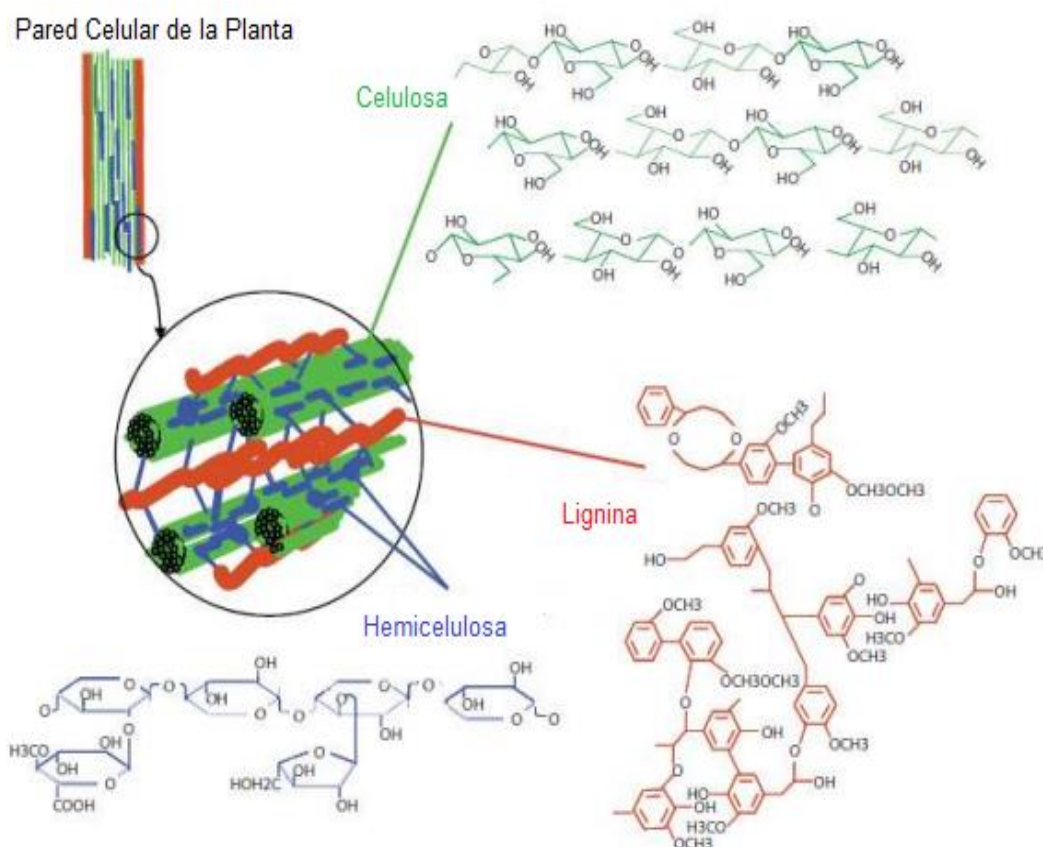


Figura 1.7 Composición de un material lignocelulósico (Polaina y MacCabe., 2007)

1.3.4 Residuos más empleados en la producción de xilitol

Las energías derivadas de fuentes naturales tienen la opción de utilizarse como materia prima para obtener xilosa, un ejemplo claro son los residuos ganaderos,

agrícolas y de madera, etc. En la Tabla 1.4 se muestran diferentes materias primas más utilizadas para su obtención.

Tabla 1.4 Residuos más comunes para producir xilitol

Residuo Lignocelulósico	Características		Referencia
Residuos de madera	Composición química		Vele <i>et al.</i> , 2021
	Madera blanda • Celulosa 39% • Hemicelulosa 26% • Lignina 35	Madera Dura • Celulosa 40% • Hemicelulosa 30% • Lignina 33 %	
	Rendimiento: 81% azúcares reductores totales		
Cascarilla de café	Composición química • Celulosa 43 % • Hemicelulosa 7 % • Lignina 9 % Rendimiento: 58% Azúcares reductores totales		Figueroa <i>et al.</i> , 2015
Paja de arroz	Composición química • Celulosa 43 % • Hemicelulosa 22% • Lignina 17 % Rendimiento: 18.33 g/L de Xilosa.		Martínez <i>et al.</i> , 2002
Bagazo de caña	Composición química • Celulosa 32 % • Hemicelulosa 7 % • Lignina 38 % Rendimiento: 22.71 g/L de xilosa.		Torres <i>et al.</i> , 2017

1.4 Pretratamiento ácido

La hidrólisis de los residuos lignocelulósicos con materia prima delicada a la

transformación química es un ante-requisito para producir compuestos sintéticos de mayor valor. Es un proceso importante para la gluconeogénesis, que forman la base para otros procesos posteriores para obtener bio-álcohol. Este método usualmente se hace a temperaturas bajas y altas; con ácidos diluidos como el clorhídrico (HCl) o con ácidos concentrados como el sulfúrico (H₂SO₄), que desde la antigüedad se han utilizado, en cambio recientemente se han utilizado otros ácidos como el nítrico (HNO₃) y fluorhídrico (HF). Las soluciones ácido soluble en celulosa pueden utilizarse en temperaturas bajas, debido a que se han mostrado mejores resultados en comparación con ácidos diluidos, en cambio, esto provoca a una gran sobreproducción de residuos neutralizados demasiado complicados de reutilizar y muy corrosivos.

Tratamientos ácidos severos también conducen a la degradación de azúcares a furanos como el furfural y el 5 hidroximetilfurfural (HMF), ácidos carboxílicos y sustancias húmicas insolubles, tratamientos ácidos menos severos previenen la degradación de azúcares, sin embargo, son menos eficientes (Vele *et al.*, 2021).

En la hidrólisis ácida la fase líquida se separa de la fase sólida por medio de filtración. La fracción líquida es rica en azúcares fermentables y la fracción sólida está compuesta principalmente de celulosa y lignina. La fase líquida se recolecta y se caracteriza determinando así el contenido de azúcares reductores entre los que se encuentran el componente de interés, el xilitol. Además, se generan subproductos de reacción que son el ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural etc. Esta fase líquida es fermentada en condiciones óptimas en el bioreactor (Chandler *et al.*, 2012).

1.4.1 Compuestos tóxicos de la hidrólisis ácida

Es necesaria una detoxificación del hidrolizado para poder tener resultados favorables durante la fermentación. Los compuestos que se crean durante la etapa de pretratamiento (hidrólisis ácida) de materiales lignocelulósicos, considerados tóxicos, se encuentran los ácidos alifáticos (levulínico, fórmico y acético), los furaldehídos (furfural, hidroximetilfurfural-HMF), fenólicos y furaldehídos. Durante la fermentación

de levaduras, estas son más vulnerables a compuestos inhibidores como furfural y compuestos fenólicos (Pineda *et al.*, 2012), ya que se caracteriza por menor productividad y rendimiento limitado, debido a la presencia de una gran variedad de estos componentes que actúan como inhibidores del metabolismo celular. Estos compuestos pueden alcanzar concentraciones altas y es cuando aparece la necesidad de eliminarlos previo a la fermentación (Oliva, 2003). En la Tabla 1.5 se muestran los efectos negativos causados por estos compuestos tóxicos y sus efectos.

Tabla 1.5 Principales inhibidores en la fermentación (Oliva, 2003)

Clasificación	Efectos	Observación
Furfural	Reducción de la tasa específica de crecimiento. Disminución de la producción de biomasa. Producen daños en la membrana plasmática celular. Inhibidores a la acción enzimática.	El furfural inhibe el alcohol deshidrogenasa, induciendo la formación de acetaldehído. En anaerobiosis el furfural se degrada a alcohol furfurílico y furoico.
Ácidos alifáticos	Disminución de la producción de biomasa. Reducción de la tasa específica de crecimiento. Muerte celular.	El mecanismo de inhibición de estos es aún confuso. Existen teorías tales como: Del acoplamiento Acumulación intracelular de aniones.
Compuestos fenólicos	Daño en la membrana plasmática celular. Descenso del rendimiento en etanol. Disminución de la producción de biomasa. Reducción de la tasa específica de crecimiento. Muerte celular.	Son los más tóxicos para los microorganismos. Su efecto inhibitorio es aún desconocido; al parecer afecta la célula alterando su especificidad. Se cree que actúan de manera similar que los alifáticos
Combinación de compuestos inhibidores	Furfural y ácido acético: Descenso de la tasa de crecimiento Disminución del rendimiento de biomasa. Descenso del rendimiento en etanol. Furfural, ácido acético y derivados de lignina: Descenso del rendimiento en etanol. Descenso de la tasa de crecimiento Disminución del rendimiento de biomasa	Estos efectos se conocen como “efecto sinérgico”, ya que el efecto combinado de estos compuestos en conjunto es más alto que el ocasionado por cada uno de manera individual.

1.5 Fermentación

La fermentación es el proceso en el cual los sustratos sólidos o líquidos son convertidos por microorganismos procariontes (bacterias) y eucariontes (microalgas, levaduras, hongos) en productos de alto valor agregado, útiles para el ser humano (Hernández *et al.*, 2019). Durante el transcurso de la realización del proceso es importante mantener el producto en un contenedor ya que ocurren una serie de reacciones químicas que pasan dentro del espacio antes mencionado, este recipiente metódicamente estructurado conocido como fermentador o biorreactor, donde ciertas soluciones entran en contacto para ser conocido como un medio de cultivo y son transformados por la acción de microorganismos consumiendo sustratos para crear biomasa. Estos fenómenos de crecimiento y formación de producto que tienen lugar durante el desarrollo del proceso pueden ocurrir de forma simultánea o independiente (Duarte, 1995). La fermentación se clasifica en dos tipos: Fermentación continuación y fermentación discontinua.

1.5.1 Fermentación Continua

En este tipo de fermentación, existe un sistema abierto. La solución que previamente fue suplementada con nutrientes y estéril, se va agregando con el paso del tiempo, con un porcentaje significativo de microorganismos que posteriormente se van eliminando del sistema. Es un proceso continuo que utiliza de manera adecuada los recursos previstos para este proceso, tanto materiales, reactivos y humanos. Sin embargo, requiere una atención mucho mayor que los modos de operación anteriores para lograr el mantenimiento de la estabilidad, por ejemplo, en la composición del sustrato, y de la esterilidad del sistema (Lázaro, 2013).

1.5.2 Fermentación discontinua

También conocida como proceso por lotes. Es decir, un sistema cerrado, en el que se inocula la solución con microorganismos que permiten la fermentación en condiciones

óptimas a volumen constante sin adición o ácidos o bases para controlar el pH de la muestra (Marín, 2018). La fermentación Batch depende de curvas de crecimiento que se muestran en la Figura 1.8.

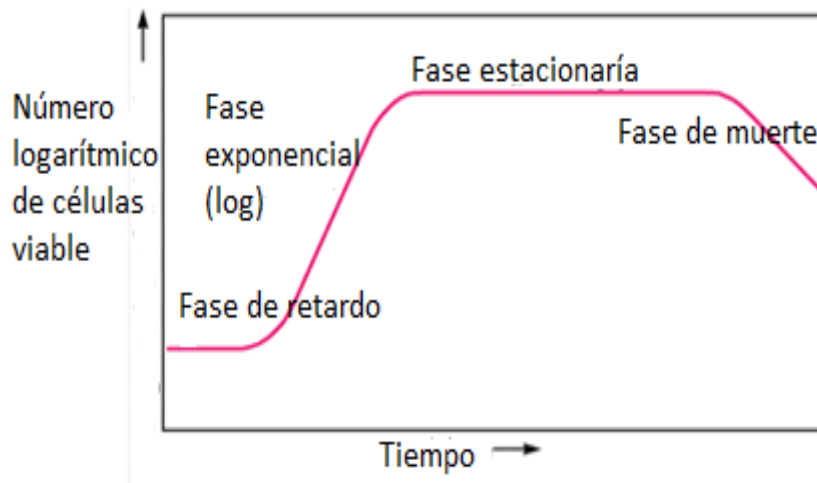


Figura 1.8 Fases de crecimiento celular en un reactor discontinuo (Martos, 2011).

Las fases de crecimiento se describen de la siguiente manera:

- Fase de latencia: En el transcurso de este paso no existe la partición celular en cambio hay un crecimiento de la masa microbiana propio. La duración de este proceso necesita de una gran ración de inóculo inicial, el tiempo y el estado fisiológico del microorganismo.
- Fase de crecimiento: La concentración de biomasa (x) empieza a acrecentar lentamente, posteriormente aumenta aceleradamente, hasta lograr una fase donde la actividad microbiana prolifera a una rapidez constante y máxima (μ_m). Este lapso figura como el tiempo en que ocurre el máximo potencial reproductivo de la célula. Existe un desarrollo proporcional: cada elemento de la célula se desarrolla al mismo tiempo con la velocidad y la formación media se mantiene constante.

- Fase de deceleración: Después de la etapa de crecimiento hay un periodo rápido de desaceleración provocado por el consumo total de algún nutriente que conforma el medio de fermentación (sustrato limitante) o debido a la alta concentración y producción de inhibidores causando la disminución de μ dándole un valor de 0. Esta etapa tiende a ser muy breve y repentino.
- Fase estacionaria: Los componentes celulares crecen al mismo ritmo y la composición promedio varía. El estrés causado por la ausencia de nutrientes o debido a la presencia de otros productos o venenos inhibidores que se producen un entorno adverso y produce una modificación de los microorganismos para aclimatarse a las recientes condiciones.
- Fase de muerte: Considerada como etapa final, la concentración celular disminuye por falta de energía almacenada o por autólisis. Al igual que el crecimiento, la muerte células es constante y, en un gráfico semilogarítmico, este período se representa con una línea recta (Martos, 2011).

En el caso de la producción de xilitol por medio de la fermentación a través de residuos lignocelulósicos como cascara de café o desechos de madera tienen un bajo costo y son de gran impacto. Los microorganismos empleados que presentan mejores resultados son las levaduras del género *Candida* (Gastélum, 2007).

1.6 Modo de operación del bioreactor

Un biorreactor es un dispositivo que provee un medio que contiene microorganismos activos y se utiliza a fin de lograr desarrollar células o tejidos en operaciones generales de caldo de cultivo con el objetivo de conseguir biomasa o varias sustancias de interés. Actualmente los productores industriales utilizan sensores y controladores de bioreactores para controlar y monitoriar cultivos, como se muestra en la Figura 1.9. Todos los datos generados son recogidos y almacenados por un ordenador que se encarga de almacenar y ejecutar los resultados obtenidos a la unidad de control para inocular las células o tejidos en el fermentador, en base a los parámetros utilizados definidos por algoritmos.

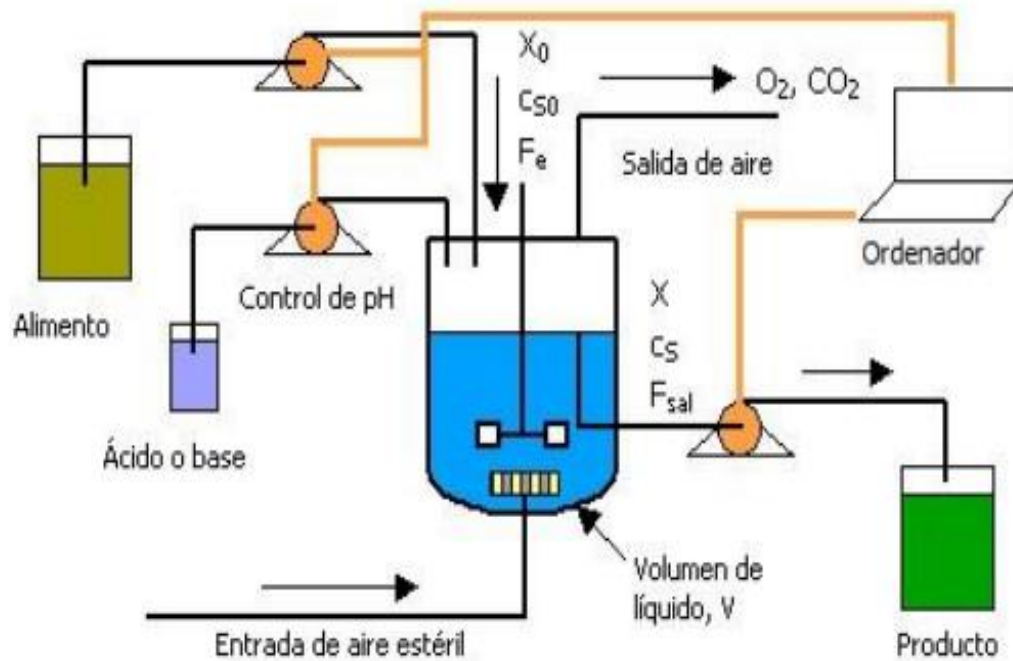


Figura 1.9 Esquematización de las partes de un biorreactor (Serrano, 2017).

Estos equipos pueden contener volúmenes pequeños (en mililitros) construidos con materiales de vidrio o para medios de cultivo en metros cúbicos, fabricados con acero inoxidable. Se busca que el biorreactor pueda contener el medio bajo las condiciones que se necesiten en cuestiones de crecimiento celular, pH, temperatura, agitación, suministración de oxígeno, etc. y poder monitorear y controlar el proceso. Para ello se utilizan los sensores del biorreactor que envían la información a un ordenador, que por ejemplo puede realizar los cálculos para predecir la densidad celular que hay en el biorreactor y enviar a los controladores las nuevas órdenes (Serrano, 2017).

1.6.1 Cultivo por lote

El cultivo discontinuo (por lote) o cultivo batch es el método de cultivo más simple, consiste en un recipiente cerrado en el que no existe aporte de nutrientes ni egreso de productos como se muestra en la Figura 1.10. El sustrato se agrega al comienzo del

proceso y los productos se eliminan solo al final del proceso. El coste de hacer funcionar un reactor discontinuo depende del tiempo que se tarde en alcanzar la concentración de producto deseado o el nivel de conversión de sustrato requerido. Por lo tanto, es importante poder determinar el tiempo requerido para completar las reacciones en el reactor discontinuo. En un cultivo batch el microorganismo, cuando se siembra en un medio de cultivo adecuado, crece hasta que se agota un nutriente esencial (sustrato limitante) o se acumulan subproductos tóxicos hasta niveles que inhiben el crecimiento (Martos, 2011).

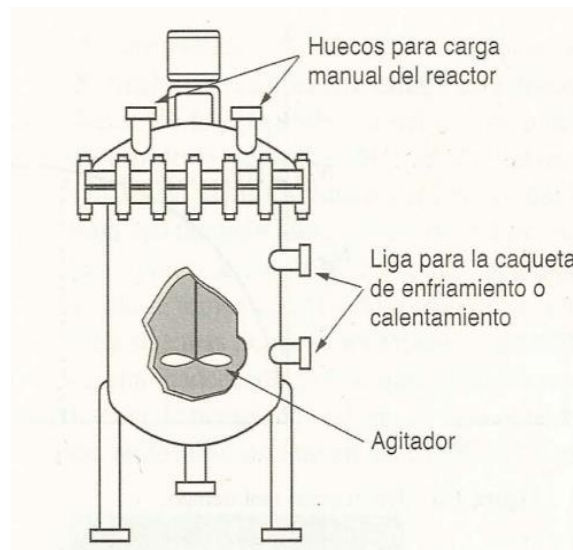


Figura 1.10 Reactor simple intermitente homogéneo (Fogler, 2008).

1.6.2 Cultivo continuo

Consiste en un sistema en el que se subministra el medio de cultivo junto con los productos de manera continua, como se muestra en la Figura 1.11. Este procedimiento trabaja a concentraciones bajas de nutriente limitantes en la zona de cultivos restringidos, donde ocurre la velocidad de crecimiento que es proporcional a la concentración del nutriente. Para hacer funcionar un cultivo continuo, se hace anteriormente un cultivo batch y posteriormente se alimenta en un medio fresco a un caudal (F).

El líquido que sale del biorreactor a un caudal F , tendrá células y la concentración de nutrientes será menor que en el caudal de entrada debido a que en parte fueron consumidos por los microorganismos (Martos, 2011).

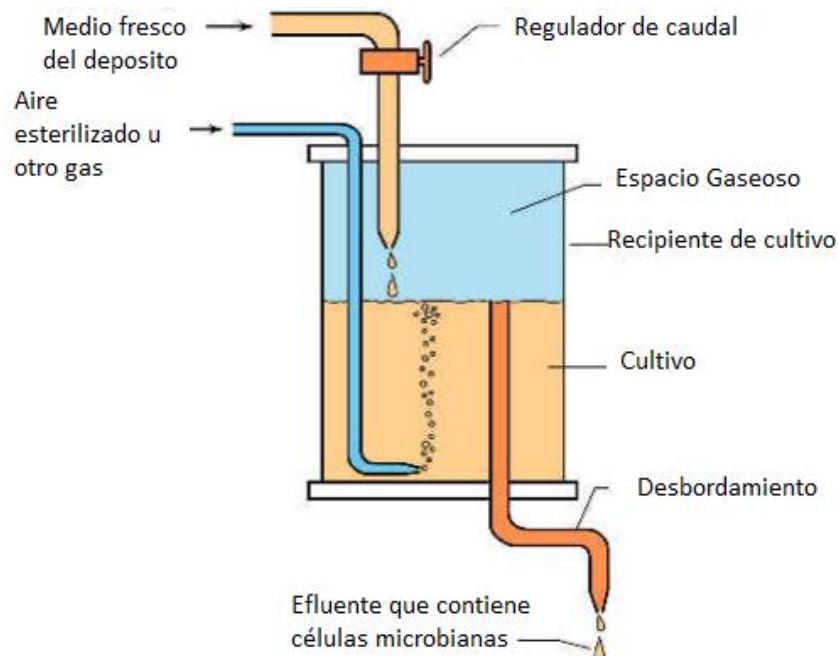


Figura 1.11 Biorreactor continuo (Martos, 2011).

1.6.3 Cultivo por lote alimentado

El termino cultivo batch alimentado se trata de una serie de cultivos que se nutren constantemente con el caldo de cultivo fresco o uno de los componentes que conforman el medio. Se debe de tomar en cuenta que los nutrientes que se utiliza en el proceso aportan un factor limitante de crecimiento, este método puede monitorear la tasa de crecimiento (μ) del microorganismo.

Por lo tanto, el objetivo de un cultivo batch alimentado es controlar la velocidad de crecimiento mediante la velocidad de alimentación del sustrato limitante (Martos, 2011). En la Figura 1.12 un reactor fed batch.

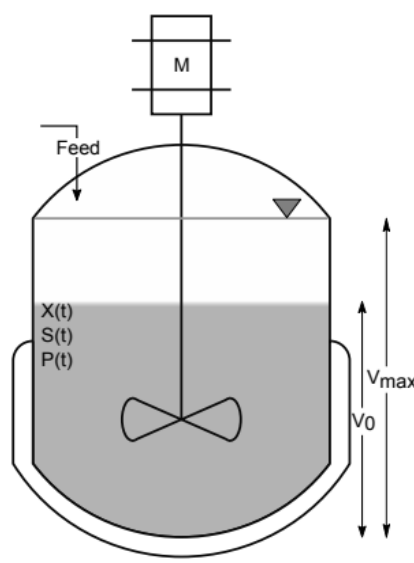


Figura 1.12 Esquema de Biorreactor Fed Batch (Ahmad *et al.*, 2018).

1.7 Factores que afectan el proceso fermentativo

Las estipulaciones de operación para las levaduras del género *Candida* son semejantes, cuando se inicia una fermentación con una nueva cepa se deben de examinar las condiciones en las que se maniobrara el proceso, las condiciones como los requerimientos de nutrientes, pH, temperatura y aireación son importantes durante el proceso ya que permiten que exista una buena adaptación de la levadura y así producir de manera adecuada el producto deseado y una buena eficiencia del proceso. En la producción biotecnológica de xilitol a partir de hidrolizados de residuos hemicelulósicos está limitada por diferentes factores que tienen un impacto en el rendimiento y productividad (Gastélum, 2007).

1.7.1 Microorganismos empleados en la producción de xilitol

Los microorganismos que pueden ayudar en la fermentación consumiendo xilosa para producir xilitol son variados entre las que se encuentran las bacterias del género *Corynebacterium*, *Enterobacter* y *Mycobacterium*, sin embargo, se han reportado

investigaciones donde las cantidades producidas son bajas y por tanto no se considera viable trabajar con este tipo de microorganismos; Otra opción pueden ser mohos y levaduras, estos segundos se han documentado como buenas productoras y eficientes durante la fermentación.

Por otro lado, las levaduras son las mejores productoras, se han estudiado principalmente las de género *Candida*, las cuales reducen la xilosa a xilitol; y en los últimos años se han estudiado otros géneros como *Debaromyces* y *Pichia*, que también han mostrado buena asimilación de xilosa (Ledezma *et al.*, 2018)

1.7.2 Composición del medio de cultivo

Puede variar dependiendo del material lignocelulósico hidrolizado, tipo de hidrólisis, concentración de la fuente de carbono, inhibidores presentes en el medio, nutriente adicionado, etc. Entre los principales puntos a considerar es de qué consiste, como el origen de los azúcares a fermentar, la salinidad del medio, la naturaleza y concentración de la fuente de nitrogenada.

Otro punto a considerar es la concentración inicial de sustrato. Por ejemplo, cuando aumenta la concentración de xilosa en el medio, la tasa de crecimiento disminuirá, a menos que aumente el nivel de aireación. Por otro lado, considerar el rendimiento de xilitol, éste es mayor a mayores concentraciones de xilosa. La concentración de oxígeno es una variable que depende de la concentración inicial de azúcares utilizadas. La aireación debe incrementarse con los azúcares iniciales (Gastelúm, 2007).

1.7.3 Requerimientos nutricionales.

La demanda de los nutrientes se encuentra delimitados por el patrón de metabolismo de la célula en el fermentador, otro factor clave son las condiciones de cultivo, ya sean anaeróbicas o aeróbicas; La Tabla 1.6 muestra los nutrientes más comunes utilizados durante la fermentación.

Tabla 1.6 Requerimientos nutricionales más comunes. Adaptado de (Santos y Faulk. 2019).

Nutriente	Función biológica	Efecto
Nitrógeno	Síntesis de proteínas	Estimular la multiplicación de levaduras. Prevenir la producción de H_2S .
Esteroles y ácidos grasos	Componentes de la membrana celular de la levadura	Mantener la actividad de la membrana de la levadura. Aumentar la resistencia de la levadura.
Tiamina	Coenzima	Estimular el crecimiento de la levadura. Reducir la producción de compuestos que combinan el SO_2 .
Mg-Zn	Coenzima	Mantener el metabolismo activo de la levadura
Potasio	Coenzima	Está unida al RNA de manera que los requerimientos de K aumentan con los factores que influyen en el aumento del RNA de las células, como la velocidad de crecimiento

1.7.4 Condiciones fisicoquímicas a emplear en la fermentación

Las levaduras necesitan unas determinadas condiciones para sobrevivir y progresar de manera adecuada y así proceder a la fermentación entre las que se encuentran características tales como pH, temperatura, transferencia de oxígeno, tipo de

operación del reactor. Los puntos a considerar son:

- Temperatura de trabajo: Para la producción de xilitol el rango es de 20 y 45 °C, aunque los valores óptimos tienen un rango de 28 a 30 °C.
- pH de operación: Dependerá siempre de la levadura empleada, los valores oscilan entre 4 y 6 (Gastelúm, 2007).

1.8 Levaduras

Las levaduras son hongos microscópicos del dominio Eukarya del reino Fungi, capaces de producir la fermentación, tienen una estructura nutricional heterogénea y una alta bioactividad en una amplia gama de hábitats. En las últimas décadas, los microbiólogos han prestado gran atención a las denominadas levaduras atípicas (González *et al.*, 2020), donde han sido reconocidas como las mejores productoras de xilitol (Martínez, 2013).

1.8.1 Tipos de levaduras para producción de xilitol

Los microorganismos que se consideran muy buenos productores de xilitol son las levaduras como se muestra en la Tabla 1.7 y las respectivas condiciones en las que pueden trabajar estos microorganismos. Las cepas de *Candida* han sido ampliamente estudiadas para la producción de xilitol, ya que tienen una ventaja sobre las de *S cerevisiae* por ser consumidoras naturales de D-xilosa y por mantener el equilibrio reducción-oxidación durante la acumulación de xilitol (Prakasham *et al.*, 2009).

Tabla 1.7 Producción de xilitol por diferentes levaduras y condiciones de fermentación utilizando diferentes residuos lignocelulósicos como materia prima

Microorganismos	Materia prima	Condiciones de fermentación	Rendimiento de conversión de xilosa en xilitol (gg ⁻¹)	Referencias.
<i>C. shehatae</i> HM 52.2	Cáscara de arroz	Tiempo de reacción 228 h Agitación 180 rpm Temperatura 30 °C Velocidad de aireación 0.33 vvm	0.11	Espinoza, 2020.
<i>C. tropicalis</i> CCTCC M2012462	Mazorcas de maíz	Tiempo de reacción 100 h, Agitación 200 rpm Temperatura 35°C, Velocidad de aireación 0.4 vvm	0.71	Espinoza, 2020.
<i>C. tropicalis</i>	Mazorcas de maíz	Tiempo de reacción 66 h, Agitación 200 rpm, Temperatura 30°C, pH 4.5	0.58	Espinoza, 2020.
<i>C. tropicalis</i> CICC1779	Mazorcas de maíz	Tiempo de reacción 24 h, Agitación 210 rpm, pH 6	0.77	Jia <i>et al.</i> , 2016.
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	Bagazo de caña de azúcar	Tiempo de reacción 144 h, Agitación 450 rpm, Temperatura 30°C, Velocidad de aireación 0.7 vvm	0.69	Vaz de Arruda, <i>et al.</i> , 2016.
<i>W. anomalus</i> WA-HF5.5	Arroz y cáscara de soja	Tiempo de reacción 72 h, Agitación 180 rpm, Temperatura 30°C, Velocidad de aireación 0.33 vvm	0.86	Sehnem <i>et al.</i> , 2016.
<i>Debaryomyces hansenii</i> and <i>C. guilliermondii</i>	Paja de canola	Tiempo de reacción 72 h, Agitación 200 rpm Temperatura 30°C	0.45-0.55	López <i>et al.</i> , 2016.
<i>C. guilliermondii</i> BL 13	Cáscara de soja	Tiempo de reacción 72 h, Agitación 180 rpm Temperatura 23-33°C	0.46	Cunha <i>et al.</i> , 2017.
<i>S. cerevisiae</i> YRH 396 and <i>S. cerevisiae</i> YRH 400	Cáscara de soja	Agitación 180-300 rpm, Temperatura 28°C, Velocidad de aireación 1 vvm, pH 5.5	0.45	Cortivo <i>et al.</i> , 2018.

1.8.2 Metabolismo de la xilosa en las levaduras

La primera etapa metabólica de la fermentación de xilosa, corresponde a la absorción de xilosa en el citoplasma de la levadura, que puede convertirse en una etapa restringida de la fermentación. La xilosa se introduce en la célula a través de transportadores de glucosa, lo que corresponde a las permeasas ubicadas en la membrana celular para transportar azúcares por difusión facilitada, como se muestra en la Figura 1.13. Debido a la alta afinidad de estos transportadores por la glucosa, la presencia de este azúcar retrasa severamente la captación de xilosa, cuando los dos azúcares están presentes en el mismo medio. (Meinander *et al.*, 1999) Incluso las levaduras no convencionales que usan xilosa como fuente de carbono tienen un sistema alternativo de absorción de dicho azúcar, donde el simportador permite el paso de xilosa permite que la xilosa atraviese la membrana mediante una fácil difusión debido a la fuerza motriz generada por un protón –ATPasa, esto se muestra en la Figura 1.13b (Weusthuis *et al.*, 1994).

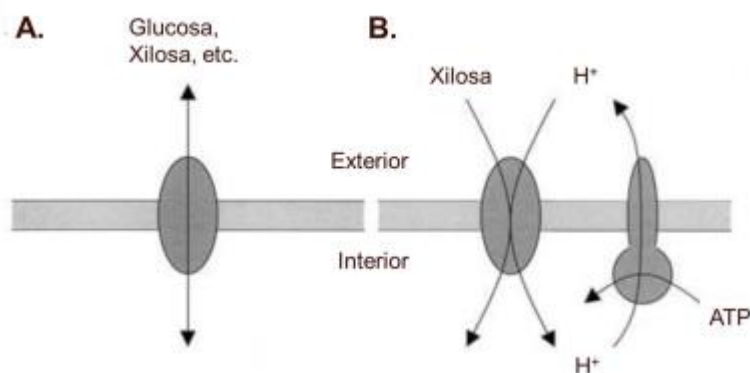


Figura 1.13 Mecanismos utilizados por las levaduras para la absorción de xilosa. (a): Difusión facilitada impulsada por el gradiente de concentración entre el medio extracelular y el citosol. (b): Sistema protón-xilosa impulsada por la fuerza motriz del transporte de protón, mantenido por una protón-ATPasa (Weusthuis *et al.*, 1994)

Durante este proceso, cuando la xilosa es introducida al metabolismo, se generan 3 reacciones (Figura 1.14). Todo esto con ayuda de la energía de la levadura, con

subproductos generados de glicerol, ácido acético o etanol. Las enzimas que participan en la vía metabólica de la xilosa en levaduras D-xilosa reductasa (XR), el xilitol deshidrogenasa (XDH) y la xilulokinasa (XK). La producción de xilitol es consecuencia de NADH intracelular bajo una limitación de oxígeno (Granström, 2002).

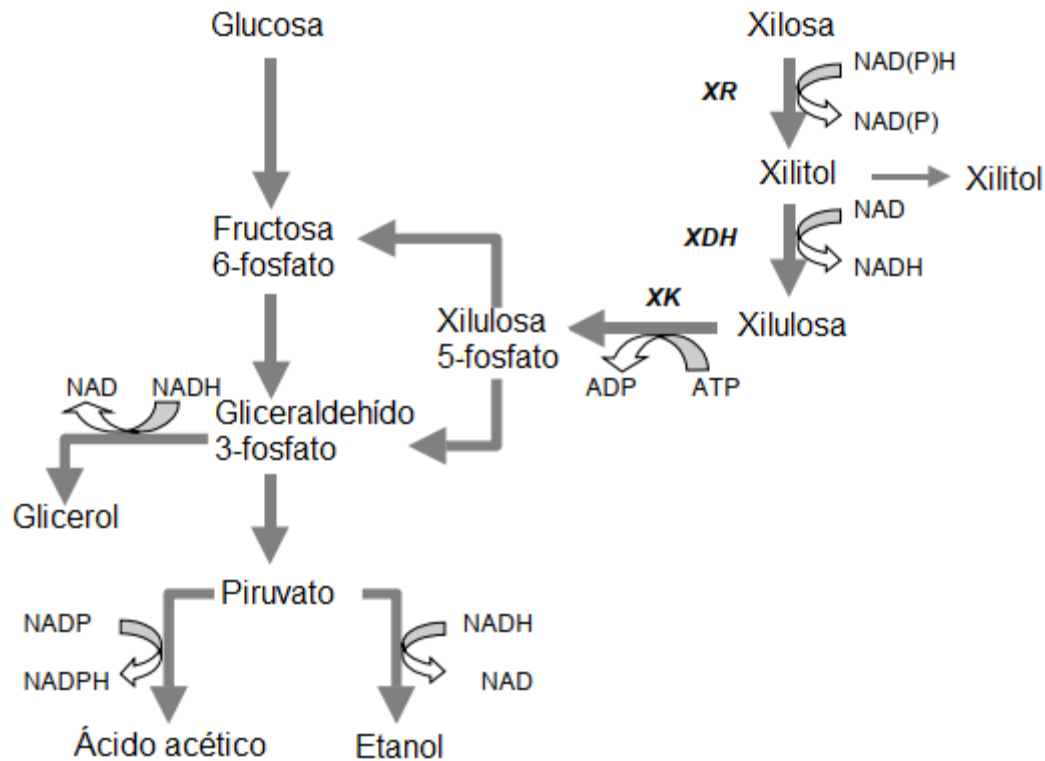


Figura 1.14 Metabolismo de la glucosa y xilosa en levaduras productoras de xilitol (Granström, 2002).

La xilosa es reducida a xilitol a partir de la D-xilosa reductasa (XR) usando como cofactor NADH o NADPH. Dependiendo de las condiciones ambientales, el xilitol es expulsado de la célula u oxidado a xilulosa a partir del xilitol deshidrogenasa (XDH) en presencia de NAD⁺. La xilulosa es fosforilada por la xilulokinasa con consumo de ATP, para incorporarse a la vía de las pentosas fosfato y, posteriormente, a la glucólisis (Granström, 2002).

1.8.3 Levadura *Candida Tropicalis* IEC5-ITV

Las levaduras del género *Candida* (*C. boidinii*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* y *C. shehatae*), son las más utilizadas para la producción de xilitol; La preferencia por el género *Candida* se debe al alto rendimiento de la producción de xilitol, y por ser eficiente incluso en condiciones de oxígeno limitado. Estos microorganismos pueden producir xilitol como metabolito intermedio de la xilulosa (Espinoza, 2019). Se presentan en la Tabla 1.8 las diferentes levaduras y las condiciones apropiadas en que pueden trabajar para producir xilitol.

Tabla 1.8 Estudios sobre la producción de xilitol de levaduras del género *Candida*.
(Adaptado de Martínez, 2013).

Levadura	Fuente de sustrato	$Y_{P/S}$ (g/g)	Tipo de reactor
<i>Candida guilliermondii</i>	Xilosa	0.78	Bioreactor de lote alimentado
<i>Candida boidinii</i>	Xilosa	0.45	Biorreactor Batch (V: 0.7 L)
<i>Candida tropicalis</i>	Hidrolizado de hemicelulósico de mazorca de maíz	0.44	Matraz (V: 50 mL)
<i>Candida guilliermondii</i>	Hidrolizado de bagazo de caña de azúcar	0.59	Biorreactor (V: 1.6 L)
<i>Candida magnoliae</i>	Xilosa	0.39	Bioreactor Batch (V: 1 L)
		0.57	Matraz (V: 250 mL)
<i>Candida parapsilosis</i>	Xilosa-Glucosa	0.63	Bioreactor (V: de 4 a 16 L)
<i>Candida guilliermondii</i>	Bagazo de caña	0.63	Matraz (V: 50 mL)
	Paja de arroz	0.52	
	Eucalipto	0.43	

Por ejemplo, la levadura *Candida tropicalis* (Figura 1.15), debido a que es particularmente acidófilo, es particularmente prometedor para la aplicación industrial, debido a la posibilidad de trabajar y se adapta a ser utilizado en condiciones no estériles (Tamburini *et al.*, 2015). Suele considerarse un patógeno oportunista, lo que limita su uso en la industria alimentaria. Tiene una importancia industrial potencial, debido a su alta de xilosa, la capacidad de producción de xilitol y la degradación de alcanos y ácidos grasos en sus peroxisomas. Su morfología cambia de cultivo de micelio a cultivo unicelular en función de la disponibilidad de oxígeno. *Candida tropicalis* es uno de los organismos modelo más comunes en los estudios de producción de xilitol (Granström, 2002).



Figura 1.15 Medio de cultivo clásico de referencia de levadura del género *Candida*. (Palacio y Cuétara, 2008)

En la Tabla 1.9 se muestran las condiciones óptimas para que el xilitol pueda ser producido por medio de *Candida tropicalis*, el rendimiento que se obtuvo durante el proceso en base a las características de la misma, la xilosa inicial empleada al comenzar y la productividad que se obtuvo.

Tabla 1.9. Producción de xilitol de *Candida tropicalis* (Granström, 2002).

Cepa	Rendimiento	Xilosa inicial	Productividad	Estrategia de proceso
Candida tropicalis	0.82	750	4.94	Reciclaje celular Extracto de levadura Alimentación de glu-xilo, Limite de O ₂ .
	0.64	172	2.67	Extracto de levadura, Límite de O ₂ .
	0.91	300	3.98	Alimentación de glu-xilo, Limite de O ₂ .
	0.82	127	3.26	Alimentación por lotes de glu-xilo. Límite de O ₂ .

1.8.4 Factores que influyen en la velocidad de crecimiento.

Ahora que se conoce el mecanismo de XDH por NADH intracelular, para poder realizar este proceso se necesita diversas variables del proceso, conocidas como factores de crecimiento o condiciones óptimas que mejoran el crecimiento de las levaduras durante el proceso.

- **Composición del medio:** Las condiciones adecuadas en las que la levadura debe crecer depende de la variación de nutrientes principales y vitaminas esenciales que pueden hacer que la productividad de la levadura mejore. Los nutrientes existentes en los medios de cultivo dan a la célula microbiana todos los ingredientes requeridos para que produzca más células semejantes a ella misma (Durango, 2007). Es adecuado examinar las delimitaciones del medio de fermentación que proporcione la mejor garantía de crecimiento, desarrollo de la levadura utilizada y la suma productividad del proceso. También es importante considerar las demandas nutricionales y ambientales que necesita la levadura.

La determinación de los requerimientos nutrimentales, ambientales y la composición, dependen de la estequiometría de crecimiento y formación de producto (Duarte, 1995).

Los sustratos son clasificados debido a la composición de los elementos, que pueden dividirse en dos medios, 1) sintéticos o llamados químicamente definidos, o, 2) medios complejos en el cual los ingredientes se encuentran compuestos de origen animal como pescado, sangre, extracto de carne etc., y de origen vegetal como harina de soya, extracto de levadura, macerado de maíz y peptonas. En el caso de la célula de levadura, para su correcto crecimiento ésta requiere de nutrientes como el nitrógeno (sales de amonio, sulfato de amonio y urea), fósforo (fosfato di amónico y ácido fosfórico), magnesio (sales de magnesio), potasio, calcio, azufre, hidrocarburos y trazas de hierro, zinc, cobre, manganeso y molibdeno (Durango, 2007).

- La aireación y agitación: La aireación está estrechamente relacionada con la actividad celular, la secreción de enzimas y la rapidez de la fermentación, aunque este factor se puede ver dificultado por la baja solubilidad del gas en el medio de fermentación líquido, sin embargo, esto puede corregirse si se hace una adecuada agitación durante el proceso. Generalmente el medio es aireado por aporte oxígeno (gas), que es el factor determinante para obtener altos rendimientos en el crecimiento de los microorganismos aeróbicos, ya que cuando se reduce el aporte de aire, los microorganismos se eliminan casi por completo su crecimiento deja o suprime casi completamente su multiplicación (Durango, 2007).
- Temperatura: Solamente una decena de especies pertenecientes al género *Candida* y entre ellas, *Candida tropicalis*, poseen la capacidad de adaptarse oscilan entre 25°C y 37°C.
- pH: en condiciones de aerobiosis en medios de cultivo a pH con rango entre 2.5 y 7.5 (Pardi y Cardozo, 2002).

1.8.5 Influencia de la transferencia de oxígeno

El aire es una opción muy recomendable para proporcionar aireación al medio de cultivo, esto porque genera buenos beneficios como bajo costo, y disponibilidad, pero un factor a considerar es que este arreglo debe ser lo suficientemente alta para satisfacer la demanda de las necesidades microbiológicas. Para que no haya limitaciones de transferencia de oxígeno, la velocidad de transferencia de oxígeno a los microorganismos (OTR) siempre debe ser mayor, o en un caso crítico, igual a la demanda de oxígeno (OUR) (Durango, 2007). La transferencia de oxígeno (masa) y la demanda de oxígeno están dadas por la ecuación 1.1 y 1.2 respectivamente

$$k_L a (C^* - C) = \text{OTR} \quad (1.1)$$

$$\text{OUR} = Q_{O_2} x \quad (1.2)$$

Dónde: $k_L a$ es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (g L^{-1}), C^* es la concentración de aire disuelto en la fase frontera gas-líquido (g L^{-1}), C es la concentración de aire disuelto en el seno de la solución ($\text{s}^{-1} \text{h}^{-1}$), OTR es la velocidad de transferencia de oxígeno ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$), Q_{O_2} es la demanda específica de oxígeno ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$) y x es la concentración de biomasa (g L^{-1}).

Cuando existe una concentración celular baja se refleja en la OTR ya que se muestra baja, esto ocurre aun cuando la levadura está en su mayor velocidad de requerimiento específico de oxígeno o " $Q_{O_2 \max}$ ", también se logra observar que cuando la concentración de oxígeno (C_{O_2}) se agranda existe una mayor proximidad al valor de saturación ($C_{O_2}^*$). Se puede deducir que el oxígeno es un factor no limitante para el correcto desarrollo de la levadura. Otra característica estrechamente relacionada es el aumento de la biomasa con respecto a OUR que también va aumentando, provocando una disminución de oxígeno disuelto, cuando existen concentraciones de operaciones definidas, la alta concentración celular hace que exista un valor de concentración

crítico de oxígeno disuelto (C_{crit}) que depende en gran medida de las características fisiológicas de la levadura utilizada, cuando esto ocurre el cultivo cuenta con suficiente cantidad de oxígeno requerido por la concentración microbiológica presente. A partir de este valor un incremento en la biomasa ya no dispone del oxígeno que necesita para su desarrollo normal (Durango, 2007).

La fermentación donde los microorganismos no requieren de oxígeno para sobrevivir, existe transferencia de masa que depende del k_{LA} (coeficiente de transferencia de oxígeno), constituido en el criterio de escalamiento, siendo un factor que depende de variables que se encuentran relacionados con diversas correlaciones. Este factor un parámetro importante para que exista un funcionamiento correcto del biorreactor, porque el valor varía dependiendo al tiempo transcurrido, diseño (diámetro, capacidad, potencia y agitación), características del medio de cultivo (densidad, viscosidad y composición), el tipo de microorganismo, temperatura, etc. y condiciones de operación del mismo y sirve para conocer la capacidad de aire en el fermentador, además son características importantes a considerar además del tiempo, de seleccionar un k_{LA} menor que el que se necesita pueden ocurrir errores.

Cuando se desea modificar el k_{LA} para aumentarlo, pueden realizarse diferentes cambios, algunos de ellos son: diluir el caldo de fermentación, aumentar la agitación (revoluciones por minuto, N), la aireación o la presión, cambiar el diámetro del impulsor o el número de baffles, disminuir la viscosidad, variar el tamaño del inóculo o aumentar la potencia por unidad de volumen (P/V) (Durango, 2007).

1.9 Antecedentes

Manjarres *et al.*, (2016), evaluaron el comportamiento de la levadura *Candida guilliermondii* ATCC 6260 en un medio hidrolizado ácido del raquis de palma con características de RSL 1:8 p/v, con una concentración de ácido sulfúrico al 2%, el cual fue suplementado con 4 g/L de extracto de levadura, 3 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0.1 g/L $CaCl_2 \cdot H_2O$. Se realizaron 2 fermentaciones con pH de 5 y 5.5,

concentración de inoculo de 3 y 5 g/L respectivamente y concentración de xilosa de 17 y 37 g/L, en matraces de 1000 mL a 200 rpm y 30°C durante 96 h. Las condiciones evaluadas son: la concentración de xilosa, rendimiento ($Y_{p/s}$) y formación de producto Q_p . Los resultados de la fermentación con mejores resultados son las siguientes: Biomasa de 5.5 g/L, concentración inicial de xilosa de 17 g/L, con un pH de 5.5, con concentración de inoculo del 3 g, con un $Y_{p/s}$ y Q_p de 0.094 g/g y 0.021 g/L.

Ledezma *et al.*, (2018) evaluaron la obtención de xilitol a partir de bagazo de sorgo, en medios detoxificados y sin detoxificar. El medio fue de bagazo de sorgo blanco con H_2SO_4 al 2, 4 y 6 %; con RSL DE 1:6, 1:8 y 1:10; El microorganismo utilizado fue de *D. hansenii* NRRL-Y-7426, con concentraciones de xilosa de 30, 40 y 50 gL⁻¹ de 30° C y 35 °C a 120 y 200 rpm, con duración de 96 h, con cinéticas realizadas cada 12 h. Por medio del simulador ANDEVA para el efecto de las variables independientes de la composición del hidrolizado y producción de xilitol, con medias de Fisher ($p \leq 0.05$). La concentración de xilitol para medios detoxificados fue de 28.8 gL⁻¹ a las 48h. Para el medio sin detoxificar la concentración de xilitol fue de 29.23 gL⁻¹, dando a entender que no existe diferencia entre la obtención de xilosa.

López *et al.*, (2018) evaluaron la posibilidad de utilizar el hidrolizado hemicelulósico de paja de colza como medio de fermentación para la producción de xilitol. Se utilizaron dos cepas de levadura, *Debaryomyces hansenii* y *Candida guilliermondii*, para este proceso de bioconversión y se comparó su rendimiento para convertir la xilosa en xilitol. Además, se evaluaron diferentes estrategias para la detoxificación del hidrolizado antes de su uso como medio de fermentación. También se realizaron ensayos en medios semidefinidos para verificar la influencia de hexosas en el metabolismo de la xilosa por parte de las levaduras. *Candida guilliermondii* mostró mayor tolerancia a los compuestos tóxicos que *Debaryomyces hansenii*. Los compuestos tóxicos presentes en el hidrolizado no fueron los únicos que afectaron al rendimiento de las levaduras, sino que la glucosa también tuvo un impacto negativo en su rendimiento. No fue necesario eliminar completamente los compuestos tóxicos

para obtener una conversión eficiente de xilosa en xilitol, donde con *Candida guilliermondii* se obtuvo un $Y_{P/S} = 0,55$ g/g y con *Debaryomyces hansenii* una $Y_{P/S} = 0,45$ g/g.

Gil *et al.*, (2019), presentaron la simulación en Aspen Plus del proceso para obtener arabinoxilanos (AX) a partir de bagazo de cebada, principal subproducto de la industria cervecera. Para realizar estos trabajos se realizó con la primera etapa donde ocurre la extracción de proteínas y la cascarilla de cebada con AX, en la segunda etapa se realiza un hidrolizado con enzimas por medio de AX separando la corriente líquida para extraer xilosa. Los resultados mostraron que la xilosa fue de 8.5 % con un rendimiento de 58%. Una biorrefinería en Colombia fue donde se realizó la simulación de este proyecto.

Martínez *et al.*, (2019), estudiaron el efecto de la concentración de H_2SO_4 en la hidrólisis de residuos de tallos de girasol a $95^\circ C$ y utilizando una relación líquido/sólido de 20. En una etapa posterior, los hidrolizados fueron fermentados a diferentes temperaturas con el objetivo de producir etanol y producción de etanol y xilitol. Se logró una conversión total de la hemicelulosa a una concentración de ácido de 0.5 mol/L; mientras que se necesitó una concentración de ácido de 2.5 mol/L para alcanzar el valor máximo en la conversión de la fracción de celulosa. El análisis de la cinética de hidrólisis ha permitido determinar el orden aparente de reacción que fue de 1.3. Los hidrolizados procedentes del proceso de hidrólisis con H_2SO_4 0.5 mol/L, una vez detoxificados, fueron fermentados a pH 5.5, temperaturas 30, 40 y $50^\circ C$ con la levadura *Hansenula polymorpha*, dando lugar a una captación secuencial de azúcares. En relación con los rendimientos de etanol y xilitol, los mejores resultados se observaron a $50^\circ C$ ($Y_{E/S}^0 = 0.11$ g/g; $Y_{X/S}^0 = 0.12$ g/g). Los rendimientos instantáneos de xilitol fueron mayores que en etanol, en las tres temperaturas ensayadas. Se analizaron diferentes compuestos fenólicos analizados en los hidrolizados; el hidroxitirosol fue el más abundante (3.79 mg/L).

Azizah, (2019) estudió la producción de xilitol a partir de residuos lignocelulósicos, utilizando a biotransformación enzimática de la xilosa en xilitol utilizando la enzima reductasa de la xilosa. La máxima producción de xilitol a partir de biomasa lignocelulósica fue entre 12,5 - 96,5 g/L con material de xilosa entre 21,5 -116,7 g / L. El máximo proceso de biotransformación puede alcanzar 82.69 %. Los parámetros que influyen en la producción de xilitol son el pH, la temperatura, la concentración de sustrato y la aireación.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

En la Figura 2.1, se presenta el diagrama de flujo del proceso que se siguió durante la investigación para lograr la obtención de xilitol en base las mejores condiciones tomando en cuenta dos diferentes variables, la velocidad de agitación y la concentración del inóculo, para posteriormente validarla en dos diferentes residuos ácidos.

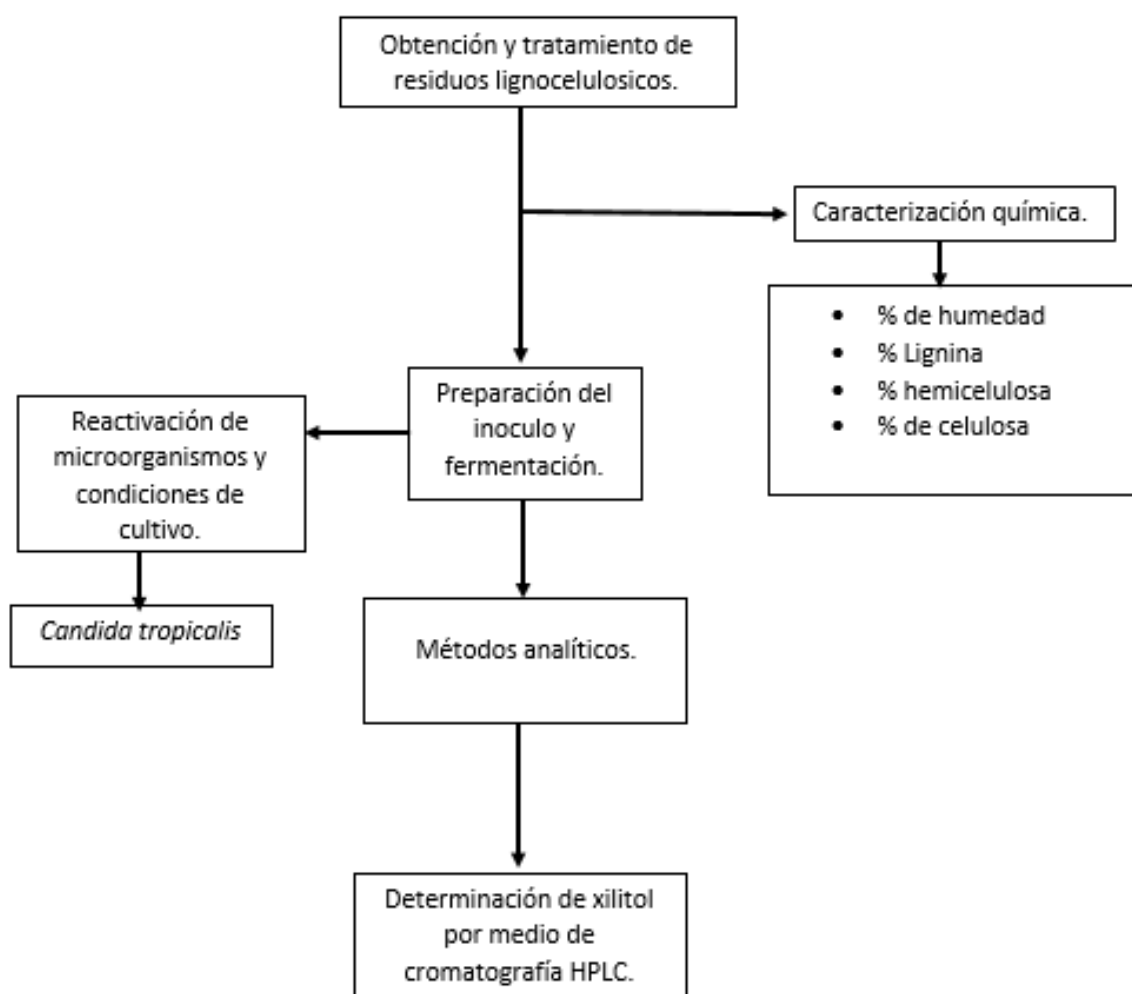


Figura 2.1 Metodología general del proceso de obtención de xilitol

2.1 Obtención y tratamiento de materia prima

Para el desarrollo de la presente investigación se obtuvo la cáscara de café de la comercializadora de café “Café aroma” que se encuentra ubicado en el municipio de Camerino Z. Mendoza. En el caso de la madera, se utilizó una mezcla de viruta de residuos de madera del tipo madera de cedro y encino.

2.2 Adecuación de la materia prima

Tratamiento de materia prima

El (Residuos de madera) RM se adquirió en la carpintería y este ya se encontraba triturado, tenía partículas de aproximadamente 0.7 cm x 0.5 cm, el tamaño era apropiado para la hidrólisis ácida y la caracterización de la materia prima por lo que ya no se requirió ninguna reducción de tamaño ni tamizado.

Humedad

Previamente a la determinación de humedad ambos residuos se secaron por radiación solar. El contenido de humedad presente en ambas muestras se determinó tomando una pequeña muestra posteriormente se realiza el procedimiento, por medio de la técnica especificada en el manual de operaciones de Termobalanza de la marca y modelo AMB-50, que consiste en pesar 0.5 gramos para colocarla en el aparato. Se utiliza la ecuación (2.1), el método completo se encuentra en el Anexo A.

$$\% \text{ Humedad} = 100 \% - ST \quad (2.1)$$

Donde ST es el número de sólidos totales determinados (%).

Se usó la técnica de National Renewable Energy Laboratory (NREL) (Sluiter *et al.*, 2012) y posteriormente se evaluó la composición porcentual de celulosa, hemicelulosa y lignina mediante HPLC. La muestra analizada tiene un peso de 300 ± 10.0 mg en

un tubo de ensaye, añadiendo ácido sulfúrico al 72%, mientras se realiza una agitación manual durante 1 min. Posteriormente se encubo la muestra y se agito la muestra cada 5 a 10 min. (Técnica completa en Anexos B).

2.3 Sembrado y mantenimiento de la cepa

Existen dos diferentes tipos de medio de cultivo. Conocidos como medio líquido en el medio de activación y medio sólido como medio de conservación en el cual la *Candida tropicalis* interactúa.

2.3.1 Medio de activación

Se realiza un medio sintético que se describe en la Tabla 2.1, el cual es un medio idóneo que contiene nutrientes para el crecimiento adecuado de la levadura *Candida tropicalis*.

Tabla 2.1 Composición del medio sintético para la *Candida tropicalis*.

Componente	Concentración (g/L)
Urea	3
KH ₂ PO ₄	5
Mg SO ₄ * 7 H ₂ O	0.4
Extracto de levadura	1
Xilosa	20

2.3.2 Medio de conservación

La cepa de *Candida tropicalis* es conservada a 4 °C en un medio sintético y debe sembrarse cada mes, los componentes se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Componentes del medio de conservación.

Componente	Concentración (g/L)
Xilosa	20
Extracto de levadura	10
Agar nutritivo	25

2.4 Preparación del inóculo

Se realizó la preparación del medio sintético en donde se tomaron 3 asadas de la levadura *Cándida tropicalis* del medio de conservación, y se sembró en un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contenía 100 ml del medio sintético. Se incubó en una incubadora marca STIK Modelo PS-B212 a 30 °C con un pH de 5.5 a 250 rpm con durante 24 h.

2.5 Fermentación por lote con medio sintético

El bioreactor que se utilizó durante este proceso es Applikon con unidad de control My-Control con una capacidad de 3 L. La fermentación se realizó con un volumen de 1 L del medio sintético. Las características de este equipo están dadas por un motor de agitación que contiene 2 paletas que hacen que la función de la turbidez sea suficiente para una agitación uniforme.

Las características del bioreactor se muestran en la Figura 2.2 y son las siguientes:

- Fermentador con una capacidad de 3 L: con un diámetro interno de 130 mm, altura interna 250 mm y una altura total de 290 mm. La manta calefactora de color naranja se envuelve alrededor del bioreactor y puede calentar hasta 80 °C, el motor de agitación tipo P100 con un rango de agitación de 0 a 2000 rpm, para la agitación se utilizan impulsores de turbina tipo Rushton y deflectores de 6 mm, para el suministro de aire se utiliza un sparger tipo L de 10 mm.

- Rotámetro o flujómetro marca Flux-O-Fly modelo FOM011: permite medir los flujos de aire correspondientes.
- Sistema de control My-control: control de velocidad de agitación, de espuma, nivel, pH, dO₂ y temperatura. Los electrodos de pH y oxígeno disuelto de la marca AppliSens.



Figura 2.2 Esquema del Bioreactor Applicon My Control (Manual del operador, 2008).

Las cinéticas de fermentación se realizaron con un volumen de 1 L de medio sintético que contiene 20 g/L de xilosa. Se simuló un caldo de cultivo en lugar del medio de hidrólisis, esto con el propósito de evitar que los componentes iónicos de los hidrolizados ácidos intervengan con la lectura del electrodo de oxígeno disuelto. Primero se realizó el medio de activación de la *Candida tropicalis*, se sembró la cepa en el medio de conservación en el medio sintético que se describió anteriormente y las mismas condiciones, El fermentador fue esterilizado con un volumen de 1 L, a 1.1 Psia durante 15 min. Una vez esterilizado se ajusta el pH entre 5.5 a 6 con perlas de NaOH. Se saturó el oxígeno en el medio durante 12 h. Posteriormente se inoculó el

fermentador, se inicia el cultivo por lote, y se determinan los consumos de los sustratos, los productos formados y el crecimiento celular. Se realizaron 4 experimentaciones con las características que se muestran en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3 Características y parámetros de fermentación utilizadas en este trabajo. (Carrera, 2021)

Muestra	OTR ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	kLa (h^{-1})	Aireación (vvm)	Velocidad de agitación (rpm)
MF1	11.3	1.44	0.1	200
MF2	73.47	9.36	0.5	200
MF3	110.5	14.04	1	200
MF4	33.1	4.32	1	100

Para iniciar el cultivo lote fermentado, se alimentó el fermentador con 1000 mL de medio estéril. La agitación y el flujo de aire fueron ajustados para los valores de OTR.

2.6 Hidrolisis ácida

La hidrólisis de los residuos lignocelulósicos para la Cáscara de café se trataron con un tiempo de operación de 44 min a una concentración de H_2SO_4 de 3.7 % v/v y RSL de 1:6 p/v. Para los residuos de madera se empleó un tiempo de 30 min a una concentración de H_2SO_4 al 3.45 v/v en RSL 1:3.36 p/v. Se trabajaron con muestras de 200 g utilizando vasos de precipitado de 1 L. (Morales, 2019)

Se realizó un prensado manual del material para extraer la mayor fracción de líquido. La fracción líquida es recolectada por lo que el siguiente paso es la fermentación de ésta. La fracción sólida es lavada de 3 a 6 veces tomando en cuenta el RSL para determinar la cantidad de agua para el lavado. El objetivo es que el residuo sólido ácido tenga un pH neutro y así poder desechar la muestra.

2.7 Fermentación de hidrolizado ácido

Para la validación se realizó la adaptación de la cepa a los componentes, se tomó el 10% del medio sintético de concentración de células y se inoculó en un matraz de 500 ml con una solución de 200 ml del medio hidrolizado (cáscara de café y residuos de madera, por separado), como último paso la muestra se pasa a la incubadora a 250 rpm a 30 °C y un pH de 5.5 durante 24 h. La fermentación se realiza con medio hidrolizado (obtenido de la sección 2.6) se filtró para poder eliminar los residuos sólidos, y neutralizarlo a un pH de 5.5. Se añadieron nutrientes al medio hidrolizado que están constituidos por 3 g/L de urea, 5 g/L de KH_2PO_4 y 0.4 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$.

2.8 Métodos analíticos

2.8.1 Determinación de biomasa

La concentración celular se calculó a través de una curva de calibrado previamente obtenida que relaciona el peso seco y la absorbancia de la suspensión de células. En esta técnica se determina la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 620 nm utilizando un espectrofotometro ThermoSpectronic Genesys 20. Las celdas son de cuarzo con 10 mm. Cuando el rango se encontró por debajo de 0.8 de absorbancia se realizaron diluciones necesarias. La biomasa generada se reporta en g/L y se calcula mediante la ecuación 2.2:

$$\text{Peso seco} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = 0.503 \times (DO) - 0.0005 \quad (2.2)$$

2.8.2 Conteo celular

Se calcula las células por unidad de volumen generalmente en millones de células por mililitro. El conteo se realizó por medio de la cámara de Neubauer. El microscopio utilizado es de la marca ZEISS con el objetivo 40X, es de campo claro. La cámara de recuento celular consiste en un cuadro, como se muestra en la Figura 2.3.

Se trata de un portaobjetos que tiene marcada una cuadrícula de dimensiones conocidas. Se toman 5 cuadros principales, cuatro de ellas ubicadas en las esquinas, con 16 cuadros en su interior, y uno en el centro, que a su vez contiene 16 cuadros en su interior.

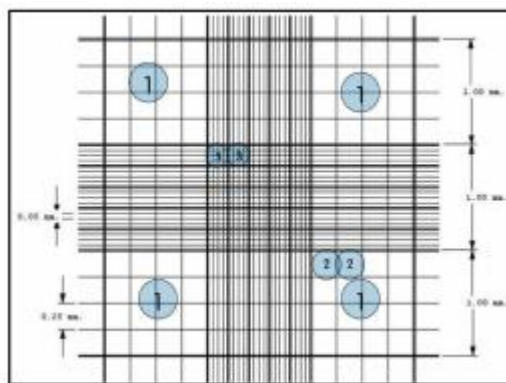


Figura 2.3 Detalle de rejilla de una cámara de Neubauer.

El procedimiento consistió en tomar una alícuota de la muestra previamente mezclada con azul de metilo, con una micropipeta y se mantuvo en posición vertical para colocar la gota en la cámara de Neubauer y encima de ella, un cubreobjetos, evitando el exceso, distribuyendo la muestra por capilaridad. Se colocó en el microscopio para iniciar el conteo. Cuando se observa al microscopio (en conteo manual) se cuentan las células que hay en los 5 cuadrados principales, las células que se tiñen en azul no son viables y las que no se tiñen son las viables. Del total de las células contadas, se calcula la media y así se determinó las células por unidad de área por medio de la siguiente Ec. 2.3:

$$X = \frac{N \times d (1 \times 10^6)}{4 \times n} \quad (2.3)$$

Dónde: N es el número de células contadas, d es la disolución (mL) y n es el número de cuadros grandes contados (5).

2.8.3 Viabilidad celular

Las muestras se sometieron a diluciones (1:2, 1:5, 1:10 etc según sea necesario) para obtener un rango de conteo entre ≥ 30 y ≤ 300 . Para calcular la viabilidad (%) se obtiene mediante la ecuación 2.4.

$$\%V = \frac{N_V}{N_T} (100) \quad (2.4)$$

Dónde: N_V es el número de células viables, N_T es el número de células totales.

2.8.4 Análisis de biomasa

La determinación de biomasa se realizó en base al conteo celular, anteriormente especificado en el punto 2.8.2. La cantidad de biomasa que existe en peso seco (g L^{-1}), se obtiene por medio de filtración y secado de cierto volumen de la muestra, normalmente 5 ml, en membranas de una porosidad determinada. Después a los datos obtenidos se le somete a una regresión lineal para generar correlaciones para *Candida tropicalis*.

2.8.5 Análisis de consumo de sustratos y formación de productos

Una vez iniciada la fermentación se realizan cinéticas cada 4 horas. La muestra es centrifugada a 10 000 rpm por 10 minutos. Las muestras son congeladas a 4° C para evitar crecimiento celular y una vez obtenidas todas las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se colocaron en el HPLC. Previamente la muestra fue tratada con BaO 0.3 M y ZnSO₄ L 5% p/v. Las características de la técnica fueron: Columna: Shodex SH1011, Fase empleada: H₂SO₄ 0.05 N, Velocidad de flujo 0.06 mL/min, Temperatura de columna: 55°C, Volumen de inyección 10 μL , durante 30 min.

2.9 Análisis de datos experimentales

2.9.1 Cálculo de rendimientos y productividades

La determinación del rendimiento de biomasa (g de biomasa/ g de sustrato), rendimiento de producto (g de producto/ g de sustrato) y el cálculo de productividad volumétrica (g de producto/ L⁻¹ * h⁻¹) se determinaron empleando las ecuaciones 2.5, 2.6 y 2.7 respectivamente.

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad (2.5)$$

Donde: X_f es la concentración final de biomasa (gL⁻¹), X_i es la concentración inicial de biomasa (gL⁻¹), S_i es la concentración inicial de sustrato (gL⁻¹), S_f es la concentración final de sustrato (gL⁻¹).

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (2.6)$$

Donde: P_f es la concentración final del producto (gL⁻¹), P_i es la concentración inicial del producto (gL⁻¹).

$$Q = \frac{P_f}{t_f} \quad (2.7)$$

Donde: P_f es la concentración de producto máximo alcanzado en el tiempo t_f (g/L), t_f es el tiempo de fermentación donde se alcanza la máxima concentración de producto (h).

2.9.2 Velocidades globales

La ecuación para la determinación de las velocidades globales se divide en consumo de sustrato (r_s), producción de biomasa (r_x) y producción de producto (r_p) y se muestran en las ecuaciones 2.8 a 2.10 respectivamente.

Consumo de sustratos (r_s):

$$r_s (gl^{-1}h^{-1}) = \frac{dS}{dt} \quad (2.8)$$

Producción de biomasa (r_x):

$$r_x (gl^{-1}h^{-1}) = \frac{dX}{dt} \quad (2.9)$$

Producción de producto (r_p):

$$r_p (gl^{-1}h^{-1}) = \frac{dP}{dt} \quad (2.10)$$

2.9.3 Velocidades específicas

Estas se dividen en 3 diferentes tipos, velocidad específica de crecimiento (μ), de formación de producto (V_p), de consumo de sustrato (V_s) y se calculan mediante las siguientes ecuaciones.

Velocidad específica de crecimiento (μ):

$$\mu (h^{-1}) = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (2.11)$$

Velocidad específica de formación de producto (V_p):

$$V_P(gg^{-1}h^{-1}) = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (2.12)$$

Velocidad específica de consumo de sustrato (V_s):

$$V_s(gg^{-1}h^{-1}) = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (2.13)$$

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Composición química de las muestras RCC y RM

Los resultados de la experimentación por medio de la técnica NREL se muestran en la Tabla 3.1. Las muestras se realizaron por duplicado en muestra seca sin ningún tipo de tratamiento, obtenido de los lotes de donde se tomaron las muestras para su posterior hidrolizado.

Tabla 3.1 Composición de residuos lignocelulósicos de RCC y RM.

Componente	RCC	RM
Humedad (%)	5.93	9.65
Celulosa (%)	28.08	47.88
Hemicelulosa (%)	10.28	17.54
Lignina (%)	9.34	9.86

La muestra de RM está constituida por diferentes tipos de madera dura y blanda no controlada, entre las que se encuentran madera de Pino, Súchil y cedro. En base a Gómez *et al.*, (2012) el contenido de hemicelulosa es similar a este trabajo. El contenido de hemicelulosa es similar a este trabajo y se puede observar que la composición de hemicelulosa 10.28% es más elevada, que la reportada por Torres *et al.*, (2017), esto muestra una gran ventaja debido a la extracción de azúcares fermentables, mientras que resulta evidente que la celulosa presente es de 47% mayor que la reportada por Torres *et al.*, (2017). La cantidad de Lignina es 9.34 % menor que la reportada por Rosales *et al.*, (2016) mejorando el proceso, dado que es menor la barrera de la pared celular y así penetrar el componente estructural y poderla aprovecharla.

Las variaciones pueden cambiar dependiendo de la cosecha y las condiciones en las que se almaceno, además de los tratamientos que tuvo la planta como los fertilizantes,

el tipo de biomasa y el lugar de crecimiento, en la Figura 3.1 se aprecian las distintas variaciones de composición con respecto a distintas investigaciones.

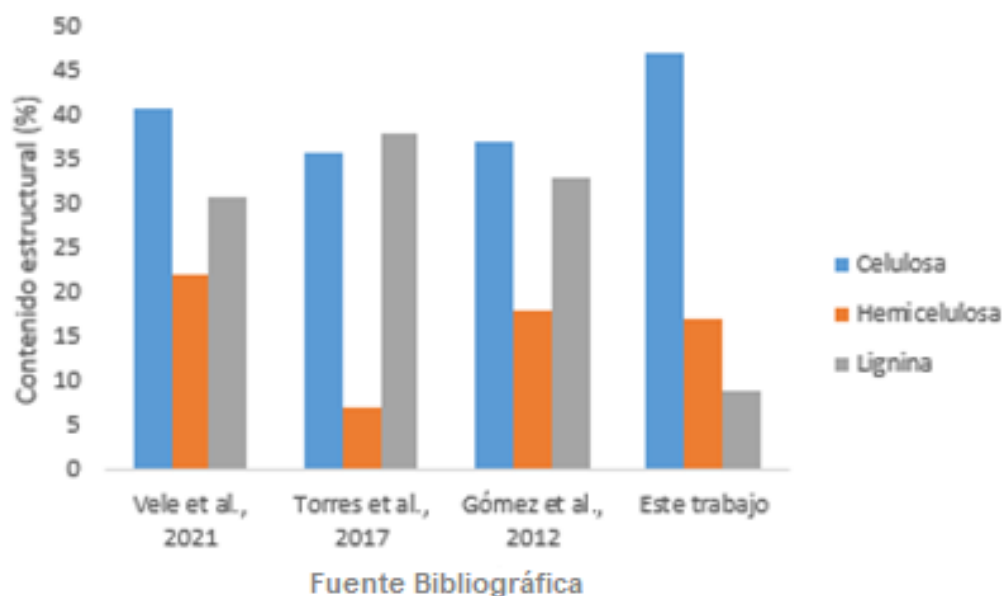


Figura 3.1 Comparación de composición Lignocelulósica de RM

La muestra RCC está compuesta un 12% del grano, que a su vez está constituido por una gran fuente de celulosa, hemicelulosa y lignina. En base a López *et al.*, (2020) reportó el contenido y hemicelulosa fue de 35% y 18% respectivamente, en comparación con este trabajo, que el componente más rico es celulosa con 28.8%, además de una hemicelulosa de 10.28%, donde queda en evidencia que resulta menor ambos componentes con una reducción de entre 10% a 5%. Por otra parte, Barrera y Sánchez en (2020) reportaron una Lignina de 23% en comparación con el 9 % que se obtuvo de la lectura de este trabajo, lo que muestra un porcentaje menor. Los datos obtenidos evidencian que los valores se pueden tomar en cuenta como significativos en hemicelulosa y celulosa dentro de la cascarilla de café. En la Figura 3.2 se muestra un análisis y comparación de diferentes bibliografías de la composición de RCC.

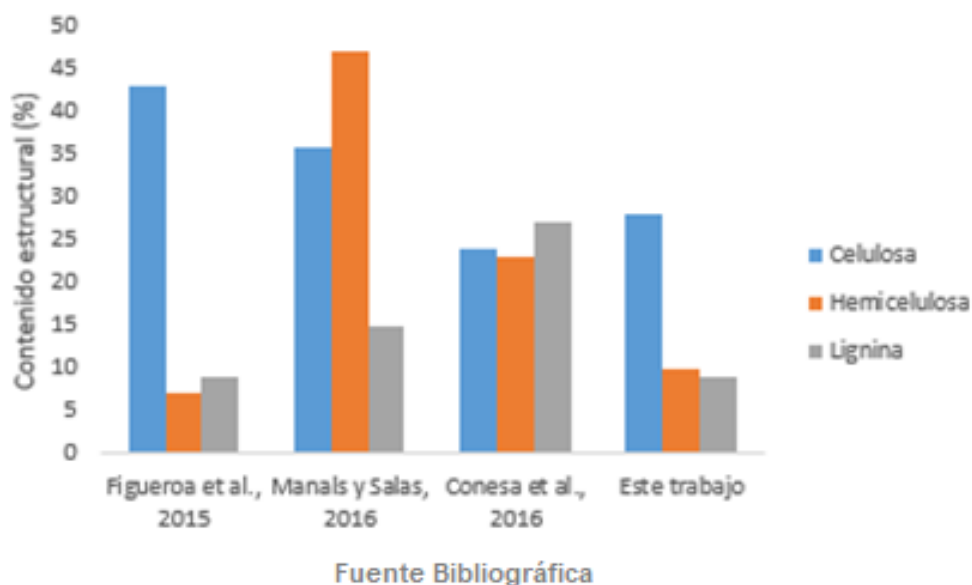


Figura 3.2 Comparación de composición Lignocelulósica de RCC

El menor porcentaje de lignina se presenta en este trabajo, adicionalmente se observa que RCC muestra un elevado contenido de celulosa en todos los marcos bibliográficos.

3.2 Análisis de los factores durante la fermentación de xilosa.

Las experimentaciones se realizaron con un 1 Litro de medio sintético estéril, se inició con un 10% de inóculo viable, aireando el fermentador previamente entre 8 y 12 horas antes de la fermentación para saturar de oxígeno el medio, se realizaron cuatro fermentaciones (MF1, MF2, MF3 y MF4), de acuerdo a las condiciones establecidas en la Tabla 2.3.

Los comportamientos de las cuatro fermentaciones se muestran en la Figura 3.3. La fermentación MF4 es un procedimiento que se realiza como prueba confirmatoria de los datos obtenidos de Carrera (2021) y son comparados con las fermentaciones MF1, MF2 y MF3.

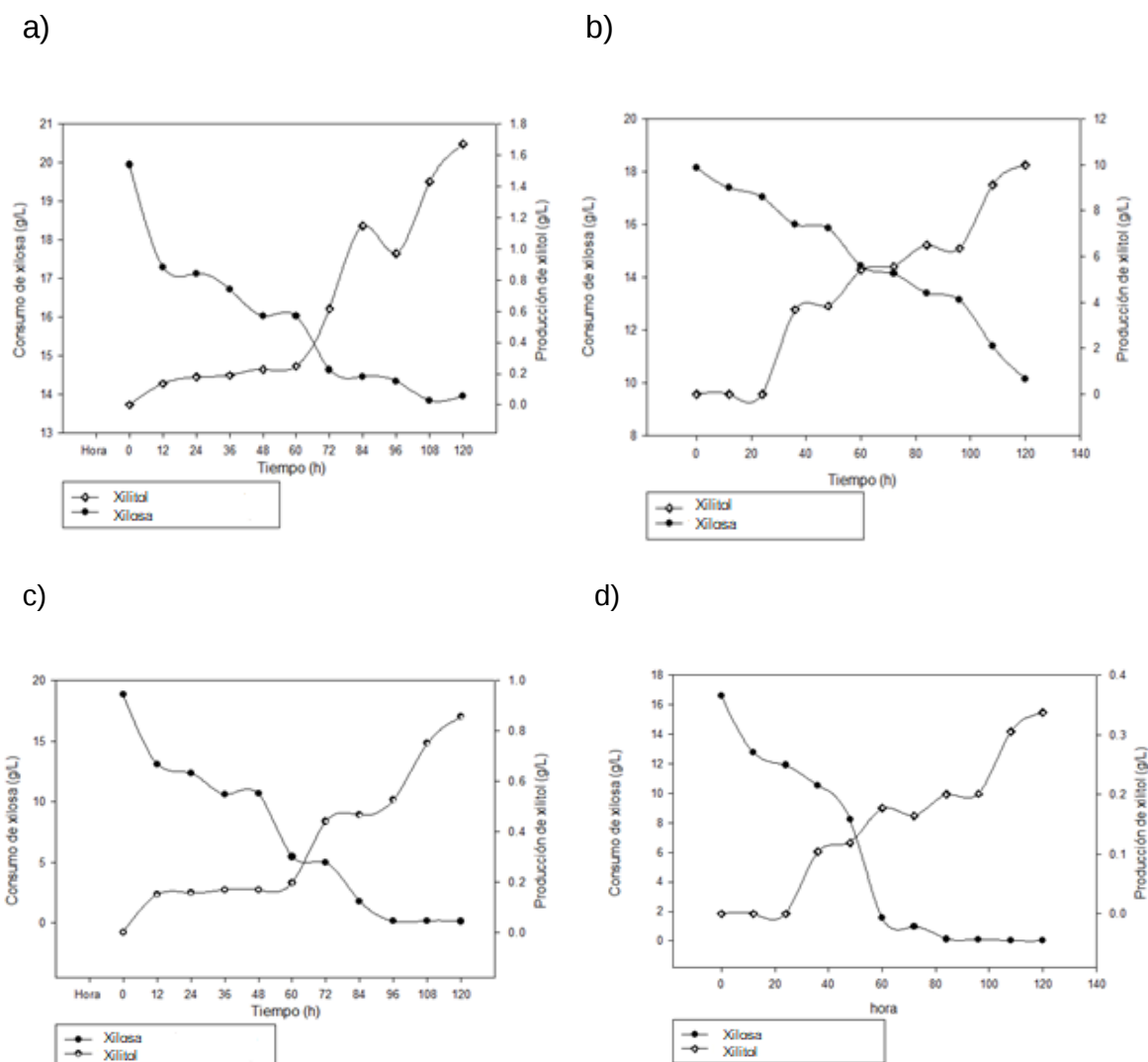


Figura 3.3 Consumo de xilosa para a) MF1 (11.3 gL⁻¹h⁻¹), b) MF2 (73.47 gL⁻¹h⁻¹), c) MF3 (110.5 gL⁻¹h⁻¹) y d) MF4 (33.1 gL⁻¹h⁻¹) en un medio sintético de *Candida tropicalis* IEC5-ITV.

Se observa en la Figura 3.3 que en los cuatro casos el consumo de xilosa inicia a partir de la cuarta hora, con mayor eficacia en una aireación de 0.1 VVM de la prueba MF1 en las primeras 12 horas de la fermentación. Todos los puntos evaluados el consumo del sustrato se mantuvo a partir de la hora 20 y la hora 45, no se mostró ningún valor representativo el cual mostrara algún cambio en el valor de pH. En la Figura 3.3 a) se observa que el consumo de xilosa en MF1 no se convirtió en su totalidad a xilitol lo que

puede evidenciar que la producción de xilitol no fue la ideal, en cambio para las pruebas MF3 y MF4 el sustrato se consumió en su totalidad. En la prueba MF2 existe un consumo constante de sustrato en toda la fermentación, en esta prueba solo se consumió un 50% de la totalidad de xilosa existente. La producción de xilitol inicia a partir de la hora 10 en MF1 y MF2, en tanto MF3 y MF4 la producción de xilitol inicia a las 24 horas.

La producción de xilitol fue de 1.6712 g/L a las 120 horas en MF1, para MF2 fue de 9.9862 g/L, en MF3 fue de 0.8556 g/L y para MF4 fue de 0.4212 g/L, el análisis de la información indica que a niveles de agitación bajos existe poca productividad de producto, además de que la aireación a niveles muy bajos y muy elevados generan estrés en la levadura provocando así repercusiones en la ingesta de xilosa y convertirlo a xilitol, dejando en evidencia que el nivel de aireación de 0.5 vvm y una agitación de 200 rpm existe mejor producción de xilitol.

Jia *et al.*, (2016) presentaron una producción de xilitol con *C. tropicalis* iniciando con duración de 40 horas, la máxima producción de xilitol se presentó en la hora 35, con una producción de 2.2 g/L, las condiciones de operación fue de 6.0 de pH a 210 rpm las primeros 24 horas y 180 rpm las 14 horas restantes, las variaciones de condiciones de operación que Jia *et al.*, (2016) presentó podría afectar en comparación con este trabajo ya que se mantuvo la agitación lineal y un pH aún más bajo de 5.5.

Se analizó entonces que cuando ocurre la máxima producción de xilitol, la xilosa tiende a disminuir, siendo un metabolito primario que está estrechamente relacionado con el desarrollo de la levadura; Utilizando *Candida tropicalis* que usa la xilosa como fuente de carbono para crecer de manera correcta. Todo esto tiende a relacionarse con el tiempo óptimo de fermentación para poder conocer las fases del microorganismo y así conocer cuando la xilosa disminuye. Otros factores a considerar que podrían afectar la producción de xilitol puede ser la fuente de nitrógeno, la tasa de aireación, el tamaño y edad de inóculo. Carrera, (2021) documento que a altas cantidades de inóculo existe un alto consumo de xilosa en etapa inicial de la fermentación y por tanto no fue

adecuado para la fermentación estudiando valores de 2.77%, 1.76% y 2.23 %. Es por ello que en el presente trabajo se realizó con un 10% de inóculo para poder tener mejor producción de xilitol, ya que según lo documentado por Xu *et al.*, (2019) a concentraciones altas se utiliza una baja proporción para el crecimiento celular lo que resultaba beneficioso para la producción de xilitol.

Por otro lado, Camargo (2015) realizó investigaciones con fermentaciones con pH de 5.5, 200 rpm y 30° C utilizando *Candida guilliermondii* FTI 20037 y se observó una rápida formación de xilitol después de 24 horas de fermentación, un período en el que la concentración de células ya había alcanzado niveles muy altos. La mayor producción de xilitol en 3 pruebas diferentes fue de 15.45 g/L, 11.29 g/L y 6.21 g/L, lo que resulta interesante dejando la incógnita de que levadura es mejor productora de xilitol. Las curvas de crecimiento de biomasa se observan en la Figura 3.4 en donde se muestra la producción de biomasa en las 4 diferentes fermentaciones durante el tiempo.

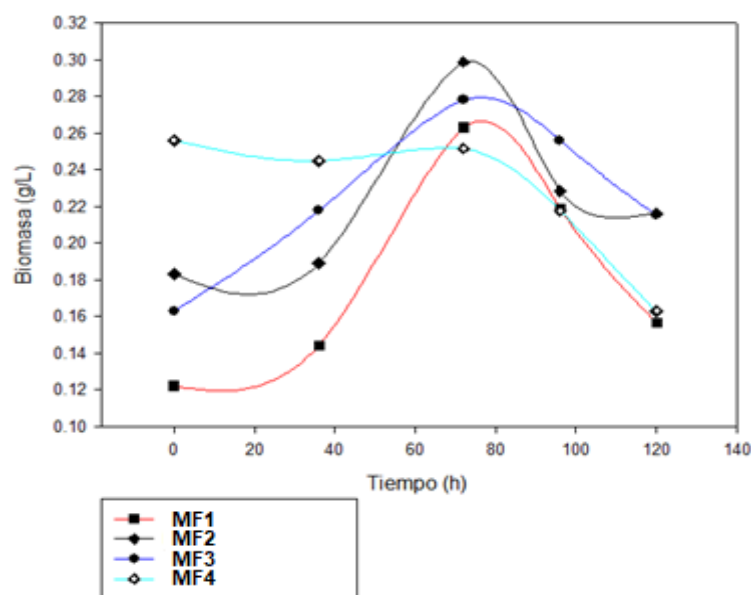


Figura 3.4 Cinética de crecimiento de biomasa en medio sintético de las 4 pruebas de fermentación.

En relación al rendimiento de biomasa y producción celular mostraron que la mayor

producción de las levaduras fue a las 72 h para los cuatro casos. En la prueba MF3 se muestra una curva de crecimiento en donde se observa una fase de adaptación prolongada hasta la hora 36, en cambio el comportamiento de la levadura en MF4 muestra una disminución del crecimiento conforme el tiempo transcurría. Se observó que al incrementarse la transferencia de oxígeno aumento la concentración celular con al menos un 23%, además de que la disminución de agitación y aireación hace más lenta la producción de biomasa.

Los resultados de los parámetros de Y_p/s , Y_x/s , Q_P , consumo de fuente de carbono (xilosa) y producción de producto de interés (xilitol) en cada una de las OTR's de cada procedimiento. Se observa que la fermentación en MF2 presenta mejores resultados en el rendimiento de producto Y_p/s , en cambio para MF1 se obtuvieron valores muy pequeños de Y_p/s , esto debido a la moderado subministro de oxígeno puede existir un estrés de la levadura que provocó que las funciones metabólicas de la misma no se desarrollaran de manera adecuada.

Manjarres *et al.*, (2016) produjo xilitol por medio de *Candida guilliermondii* trabajo con condiciones de fermentación de pH de 5.5, concentración inicial de xilosa de 17g/L y se produjo la mayor concentración de xilitol de 6.7 g/L con condiciones, Y_p/s y Q_p fueron de 0.094 g/g y 0.021 g/L.h, respectivamente.

Manjarres *et al.*, (2021) trabajaron con *Candida tropicalis*, evaluando las condiciones que afectan la fermentación de xilosa y la producción de xilitol tomando en cuenta cuatro parámetros importantes: el tamaño del inóculo ($3-7 \text{ gL}^{-1}$), la concentración de xilosa inicial ($20-40 \text{ gL}^{-1}$), pH (4-6) y el volumen de los medios (26-40 mL), las condiciones óptimas resultantes del estudio fueron de pH 5.6, volumen de 26 mL, sustrato inicial de 21 gL^{-1} y una biomasa inicial de 5.2 gL^{-1} . Teniendo un rendimiento de producción de xilitol de 0.35 gg^{-1} , y una máxima producción de xilitol de 5.6 gL^{-1} después de 96 h de fermentación.

Tabla 3.2 Condiciones de fermentación empleadas para la producción de xilitol y parámetros fermentativos

Parámetros	OTR (mgO ₂ /Lh)			
	11.3 gL ⁻¹ h ⁻¹	73.47 gL ⁻¹ h ⁻¹	110.5 gL ⁻¹ h ⁻¹	33.91 gL ⁻¹ h ⁻¹
Xilosa inicial (g/L)	19.9425	18.1412	18.8337	20.7375
Xilosa final (g/L)	13.9437	10.1462	0.1375	0
Xilitol inicial (g/L)	0	0	0	0
Xilitol final (g/L)	1.6712	9.9862	0.08553	0.4212
Rendimiento de biomasa Y _{x/s}	0.2785	0.0062	0.0026	0.0024
Rendimiento de producto Y _{p/s}	0.0083	1.2490	0.0457	0.0203
Productividad Q _p	0.0139	0.0832	0.0071	0.0035

Vallejo *et al.*, (2013) realizaron un estudio de producción de xilitol utilizando *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis*, la mayor producción de xilitol fue de 3.10 y 4.56 gL⁻¹ para *C. guilliermondii* y *C. tropicalis*, respectivamente, después de 120 h, la concentración del inóculo de 3.23 y 3.89 gL⁻¹ para *C. guilliermondii* y *C. tropicalis*, respectivamente, y condiciones de aerobiosis.

3.2.1 Efecto de la OTR

El estudio de las condiciones de OTR se realizó en 4 fermentaciones (MF1, MF2, MF3 y MF4) cuyas características se muestran en la Tabla 2.2, todas con una duración de 120 h.

En la Figura 3.5 se observa que a menores cantidades de aireación y por tanto bajas tasas de transferencia de oxígeno existe una baja producción de xilitol. En cambio a

una mayor aireación existe una mejor producción de xilitol y esto puede ser debido a que existe una mejora del crecimiento de la levadura en el medio, sin embargo se demuestra que a mayor agitación y aireación aún más elevados la levadura tiende a estar en constante estrés lo que causó un bajo rendimiento como se muestra en la fermentación MF3 de $OTR\ 110.5\ gL^{-1}h^{-1}$, por lo que recomienda moderar la aireación y la agitación. También se observa que a valores bajos de aireación y agitación existe una lenta producción del producto. Analizando los resultados se analiza que la producción de xilitol es altamente influenciada por el oxígeno suministrado durante el proceso.

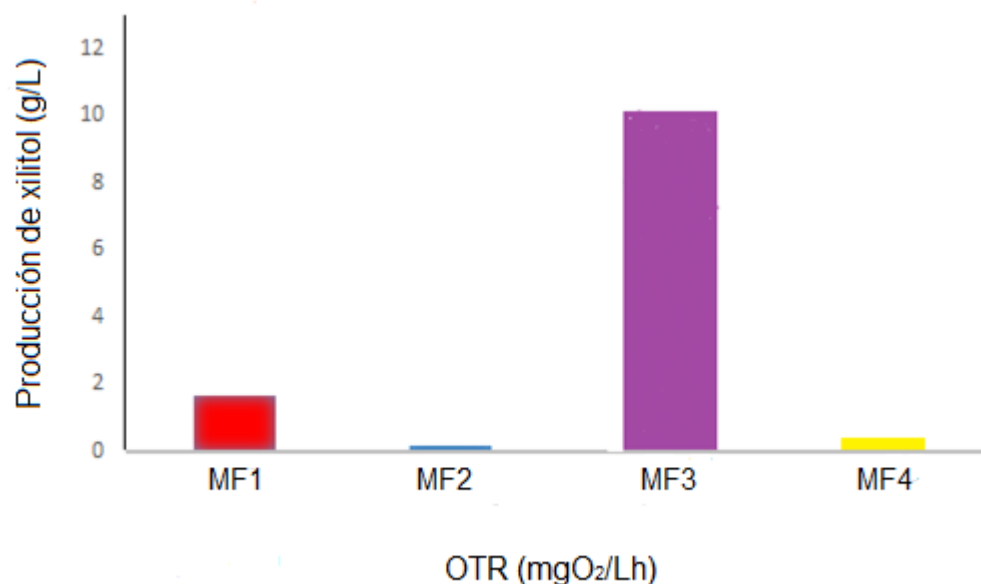


Figura 3.5 Efecto de la aireación sobre la producción de xilitol

Comparando las 4 pruebas evaluadas queda demostrado que los valores obtenidos de esta investigación en cuestión de rendimiento, productividad y producción de xilosa son en parámetros bajos en comparación con otras fuentes bibliográficas, la aireación, la agitación y el porcentaje de inóculo son parámetros que se tiene que retomar más a fondo para futuras investigaciones y poder llegar a la optimización de producción de xilitol con la levadura *Candida tropicalis* IEC5-ITV.

3.3 Validación del proceso fermentativo en hidrolizado ácido

Se utilizaron las mismas condiciones de OTR, agitación y % de inóculo del medio sintético para el medio hidrolizado de RM y RCC con parámetros de aireación de 0.5 vvm y una agitación de 200 rpm con una concentración de inóculo de 10%, el cual demostró mejores resultados en los cuatro niveles anteriores presentados.

El proceso se llevó a cabo en un volumen de un litro de medio hidrolizado con las características anteriormente presentada en la sección 2.6, a una temperatura de 30 °C, en un medio estéril. El reactor fue polarizado y se sometió en aireación durante 8 horas para saturarlo de oxígeno.

3.3.1 Fermentación de hidrolizados ácidos lignocelulósicos de RM y RCC para la producción de xilitol

La fermentación de hidrolizado ácido de RM y RCC muestreó cada 12 horas, observando el comportamiento y crecimiento de la levadura en el medio, los resultados del consumo de xilosa y producción de xilitol se muestran en la Figura 3.6, donde se alcanzaron valores máximos de xilosa de 7.35 g/L para RCC y 1.35 g/L de RM, observándose la presencia de glucosa en concentraciones de 6.8 g/L y 1.30 g/L, respectivamente.

Para ambos hidrolizados se puede observar que la xilosa no se consumió en su totalidad. Para la cinética de RCC se puede observar que la producción de xilitol fue más elevada en comparación con los resultados obtenidos de RM. En la Figura 3.6a se observa que el consumo de xilosa inicio a la cuarta hora, empezando con 27.55 g/L, posteriormente no hubo aparente cambio entre la hora 60 y hora 100, en cambio la máxima producción de xilitol se obtuvo a la hora 120 con 7.35 g/L. En cambio en la Figura 3.6b se observa poca productividad de xilitol de un 18% en comparación con el

hidrolizado de RCC, evidenciando así que para la fermentación con hidrolizado de RM tuvo una menor eficiencia en producción de xilitol debido a la falta de nutrientes para poder maximizar el correcto crecimiento de la levadura y así generar una máxima producción de xilitol.

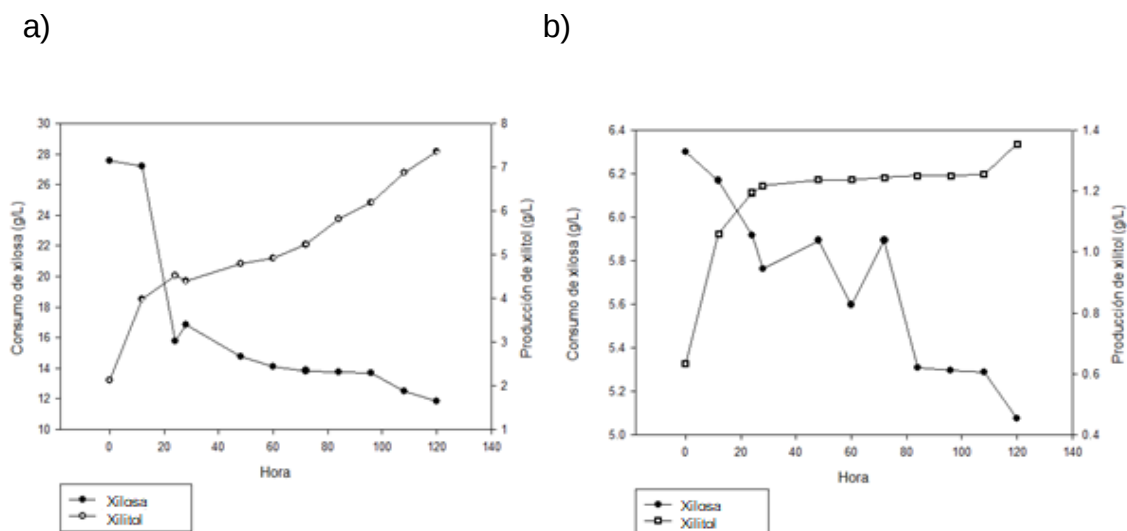


Figura 3.6 Consumo de xilosa y producción de xilitol con una OTR de $73.47 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ de hidrolizado de RCC e hidrolizado de RM, por medio de *Candida tropicalis* IEC5-ITV

En la Tabla 3.3 se presentan las comparaciones de los parámetros encontrados entre ambas fermentaciones de hidrolizados de RCC y RM; El mayor rendimiento de producto ($Y_{p/s}$), fue obtenido del RCC con un valor de 0.275 g/g el cual representa un incremento del 601.7 % (0.0457) mayor que la fermentación de RM.

Tabla 3.3 Parámetros de las cinéticas de las fermentaciones de RM Y RCC

Parámetros	OTR de 73.47 gL ⁻¹ h ⁻¹	
	RCC	RM
Xilosa inicial (g/L)	27.552	15.755
Xilosa final (g/L)	11.857	12.687
Xilitol inicial (g/L)	2.127	0.0632
Xilitol final (g/L)	7.35	1.355
Rendimiento de biomasa $Y_{x/s}$	0.009	0.018
Rendimiento de producto $Y_{p/s}$	0.332	0.235
Productividad Q_p	0.199	0.052
Eficiencia de la fermentación η_f	36.76%	26.025 %

Camargo *et al.*, (2015) realizaron pruebas de fermentación con tres diferentes hidrolizados de forraje de sorgo utilizando la levadura *Candida guilliermondii* a partir de una concentración de nutrientes de sales, en donde se obtuvo un rendimiento máximo de xilitol y una productividad máxima de 0.35 g/g y 0,16 gL⁻¹h⁻¹, y se obtuvieron valores más bajos de 0.12 g/g y 0.063 gL⁻¹h⁻¹ respectivamente, que son concentraciones menores a los dos cultivos analizados en esta investigación.

Manjarres *et al.*, (2016) realizaron experimentaciones con residuos lignocelulósicos de raquis de palma de aceite enriquecido con 4 g/L de extracto de levadura, 3g de (NH₄)₂SO₄/L, 0.5 g/MgSO₄ * 7 H₂O/L y 0.1 CaCl₂* 2 H₂O/L, obteniendo valores de $Y_{p/s}$ y Q_p de 0.094 g/g y 0.021 gL⁻¹h⁻¹ respectivamente, con una concentración inicial de xilosa de 17 g/L. Otros estudios sobre hidrolizados de residuos agroindustriales utilizando levaduras del género *Candida* han hallado un rendimiento de 0.81 g/g y una

productividad de 0.60 g/L, durante 96 h, en un pH de 5.5 y 30° C.

La formación de etanol está directamente relacionada con la concentración de glucosa que se encuentra en el medio hidrolizado, todo esto debido a que existieron limitadas condiciones de oxígeno disuelto en el medio hace que las levaduras tienden a convertir la glucosa en etanol y una pequeña porción de xilosa en etanol, el consumo de glucosa durante el proceso es un factor importante a considerar ya que la presencia en grandes cantidades de este componente puede causar una reducción en los rendimientos y productividades. Cuando la glucosa aparece en la fermentación puede ser ventajoso pues la adición de este componente como fuente de carbono adicional mejora el proceso en general, pero si existen adiciones extras durante la fermentación reduce la velocidad de consumo de xilosa y la productividad de xilitol debido al sistema de transporte prefiere la glucosa como hexosa en lugar de xilosa. El comportamiento del consumo de glucosa, formación de etanol y metabolitos secundarios (glicerol, ácido acético y furfural) se muestran en las Figuras 3.7 y 3.8.

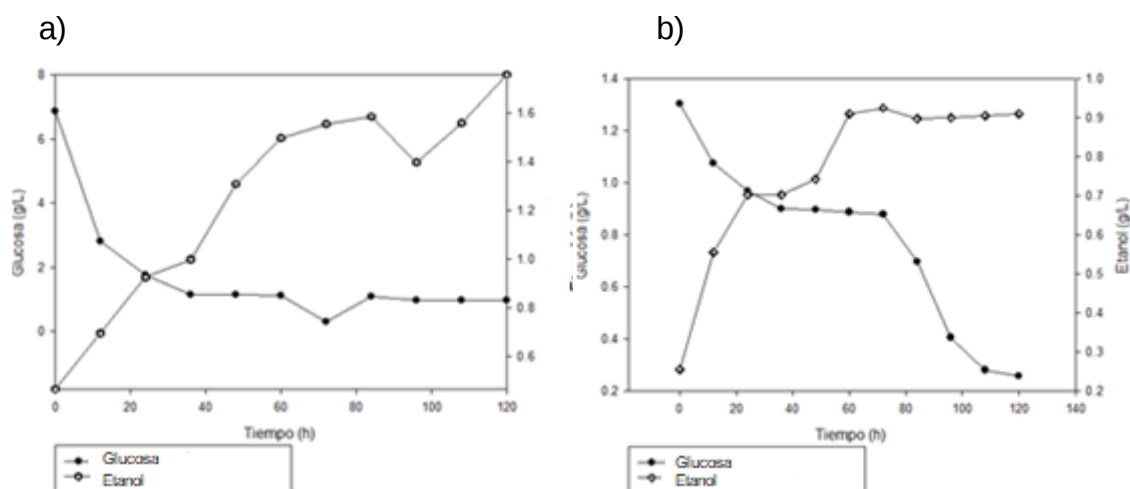


Figura 3.7 Consumo de glucosa y producción de etanol con una OTR de $73.47 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ de a) hidrolizado de RCC y b) hidrolizado de RM, empleando *Candida tropicalis* IEC5-ITV

El RCC contenía más glucosa en el medio con una presencia de 6.8675 g/L, en comparación con los 1.3025 g/L que contiene RM, lo que representa un 542.43% de

glucosa en RCC con respecto a RM, es por ellos que la producción de etanol RCC fue superior con una presencia de 1.7575 g/L, con respecto a 0.91 g/L de etanol presente en RM. La aparición de glicerol durante el proceso donde se observa una concentración máxima de 0.88 g/L para el hidrolizado de RCC y 0.51 g/L para el hidrolizado de RM, puede aparecer debido al estrés a la que la levadura es sometida, además debido a los componentes tóxicos que se encuentran en el medio hidrolizado puede existir la presencia de este metabolito, la limitación de oxígeno que puede desacoplar el consumo de xilosa y produce una pequeña cantidad de glicerol.

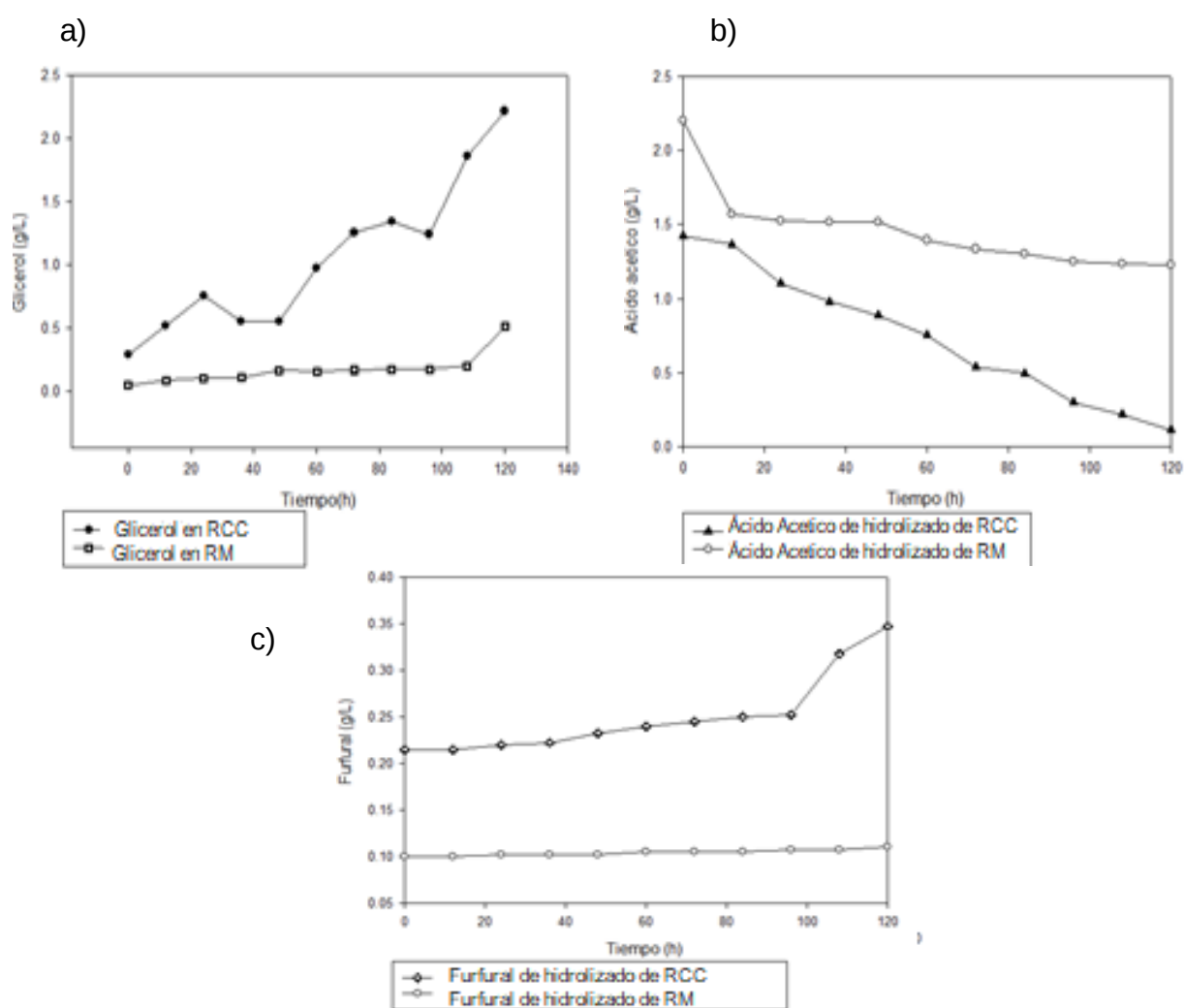


Figura 3.8 Fermentación de hidrolizado ácido con una OTR de $73.47 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ de RCC y RM en
a) Formación de Glicerol, b) Consumo de ácido acético y, c) Producción de Furfural,
empleando *Candida tropicalis* IEC5-ITV.

Otro factor a considerar y que puede tener impacto en el proceso de producción de xilitol, es la presencia y concentración de ácido acético. Las concentraciones finales que se presentaron para ambos casos fueron de 0.1120 y 1.2250 para RCC y RM, respectivamente. La aparición de estos componentes en su forma disociada puede ser una posible ventaja, ya que, si existe presencia de su forma no disociada de este metabolito, esto provoca que el componente pueda entrar en la célula a través de la membrana citoplasmática favoreciendo una serie de hechos y efectos tóxicos, como la disminución de pH (Cortivo *et al.*, 2018). Para el proceso para el hidrolizado de RCC existen bajas concentraciones de ácido acético lo que genera una gran ventaja ya que esto genera que no existan variaciones de pH significativas y estables. Concentraciones mayores de 2g/L de ácido acético pueden influir en el crecimiento celular.

Otro componente de interés durante la fermentación es la formación de furfural, este componente junto con el ácido acético, se genera de la descomposición de lignina y provoca como inhibidor del desarrollo de la levadura en este caso de la levadura *Candida tropicalis*, al reducir el metabolismo; como se puede apreciar en la Figura 3.8, las concentración final de furfural son de 0.3475 g/L para RCC considerándose una concentración relativamente elevada para RCC pudiendo repercutir en la producción de xilitol Para RM la concentración final de furfural fue de 0.110 g/L, manteniendo en valores bajos durante el proceso, no existiendo variaciones significativas. . Las concentraciones mínimas inhibitorias del furfural, la cual varía con la levadura, van desde 0.28 a 3 g/L (Parejo *et al.*, 1998) lo que demuestra que ambas fermentaciones se encuentran en parámetros aceptables.

Existe una relación estrecha entre el ácido acético y furfural, Greetham *et al.*, (2020) menciona que a una concentración baja de ácido acético ejerce un efecto antagónico contra furfural, lo cual permite que la levadura crezca bajo condiciones de estrés y por tanto no pueda cumplir sus funciones correctamente.

Ledezma *et al.*, (2018) realizaron experimentación con residuos lignocelulósicos utilizando levaduras *Debaryomyces hansenii* a partir de bagazo de sorgo en medios hidrolizados en medios detoxificados y sin detoxificar. Los resultados de concentración de furfural fueron de 7.97 g/L para muestras sin detoxificar, y 2.27 g/L para muestras detoxificadas, en comparación con las muestras analizadas de este trabajo que fueron concentraciones inferiores aún en comparación con las muestras detoxificadas, lo que demuestra que los hidrolizados de RCC y RM contienen pequeñas concentraciones de furfural.

3.3.2 Efecto del pH durante la fermentación

Con la finalidad de conocer si la producción de xilitol producida por la levadura *Candida tropicalis* IEC5-ITV es altamente influenciada por el parámetro del pH este fue monitoreado durante la fermentación, de los dos medios hidrolizados de RM y RCC. El comportamiento del pH se muestra en la Figura 3.9 observándose que en ambas fermentaciones no existieron cambios aparentes.

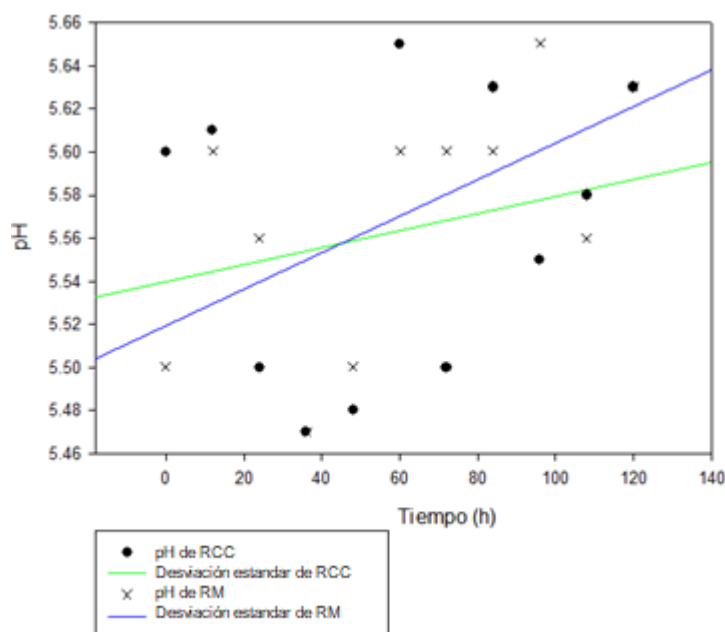


Figura 3.9 Lecturas de cinéticas de hidrolizado de RM y RCC, evaluando el pH con respecto al tiempo.

Para el hidrolizado de RCC el comportamiento estable con una $R^2=0.33$, con una variación estable de ± 0.16 , para RM la $R^2=0.055$, con una variación estable de ± 0.18 .

La variación del pH en ambos casos puede deberse a la producción de ácido acético (que siendo un ácido débil se disocia fácilmente con el pH), durante la fermentación que posteriormente es asimilada por *Candida tropicalis*.

Tamburini *et al.*, (2015) mencionaron que *Candida tropicalis* tiene el mejor rendimiento de xilitol en la escala de pH de 5.5, ya que dicha levadura no comparte la característica común con las otras especies de *Candida* u otras levaduras productoras de xilitol, donde el gradiente electroquímica de H^+ a través de la membrana plasmática, necesaria para la captación de azúcares, podría verse afectado por las variaciones de pH externo, haciendo que el transporte de xilosa desde la masa hasta el interior de la célula sea el paso limitante de la fermentación.

Por otro lado, Gastelum (2007) expone mediante una serie de pruebas donde experimento con 5 variaciones de pH *Candida guilliermondii* FTI 20037 *Candida guilliermondii* FTI 20037 iniciales, de 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 y temperaturas de 30°, 34° y 38° C, en un medio hidrolizado de bagazo de caña, donde demostró que a temperatura de 30° C, no existió variación de pH inicial y esto no repercute en el consumo de xilosa, y dando como mejor resultado en la producción de xilitol el pH 5.5.

CONCLUSIONES

Y

RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

La prueba con OTR de $73.47 \text{ gL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (MF2), a una aireación de 200 rpm, teniendo una aireación de 0.5 vvm, obtuvo mayor concentración de xilitol con 9.9862 g/L, sin embargo, para las otras 3 pruebas de $11.3 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $110.5 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y $33.1 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, se obtuvieron valores de xilitol de 1.6712 g/L, 0.8556 g/L y 0.4212, respectivamente.

El rendimiento de biomasa mostró que al incrementarse la transferencia de oxígeno se incrementó la concentración celular en cambio la disminución de agitación y aireación hace más lenta la producción de biomasa. Para la producción de xilitol en hidrolizado de RCC se una concentración de 7.35 g/L con una OTR de $73.47 \text{ gL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y para RM se obtuvieron valores de 1.35 g/L, demostrando que RCC es un componente que mejores azúcares fermentables pudo asimilar la levadura *Candida tropicalis*, a pesar de que en la composición química el RM contiene más hemicelulosa con un 17.58 %, con respecto a RM con 10.28 %. Además, el hidrolizado de RCC presento mejor concentración de Glucosa de 6.86575 g/L, lo que genero mayor producción de Etanol con 1.7575 g/L, en comparación con RM que tuvo 1.3025 g/L de Glucosa con una producción de Etanol de 0.91 g/L.

De manera general la producción de xilitol por medio de la levadura *Cándida tropicalis* IEC5-ITV cumple con la función de consumo de xilosa para producir xilitol, en la prueba de medio sintético, en condiciones de temperatura, pH, y agitación controlados, se debe de tomar en cuenta que para condiciones de hidrolisis ácida, se tienen que tomar más cuidado con los productos secundarios generados ya que se producen inhibidores que pueden alterar la producción de xilitol, como pueden ser: glucosa, ácido acético, etanol, glicerol, furfural, etc y esto generaría un cambio en comparación con los resultados obtenidos en el medio sintético.

RECOMENDACIONES

- Realizar un diseño de experimentos para las velocidades de transferencia y velocidad, y así obtener una optimización de producción de xilitol.
- Utilizar el RCC en investigaciones de producción de xilitol, ya que fue el residuo lignocelulósico que mejor resultados presento.
- Tomar en cuenta que en hidrolizados ácidos existen inhibidores que pueden afectar la producción de xilitol, por lo que se recomienda detoxificar el medio antes de la fermentación para reducir estas toxinas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad A., Gao W., Engell A. 2018. A Study of Model Adaptation in Iterative Real-Time Optimization of Processes with Uncertainties. Computers and Chemical Engineering. 122 (4):218-227. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2018.08.001>
- Azizah N. 2019. Biotransformation of Xylitol Production from Xylose of Lignocellulose Biomass Using Xylose Reductase Enzyme: Review. J Food Life Sci 3(2):103-11. DOI: <https://doi.org/10.21776/ub.jfls.2019.003.02.06>
- Barrera J., Sanchez P. 2020. Evaluación de la cascarilla de café como sustituto a las grasas utilizadas en la elaboración de Brownies. Tesis de grado. Departamento de ingeniería química Universidad de los Andes. Colombia.
 - <http://hdl.handle.net/1992/44612>
- Bardales C., y Cabos J. 2020. Enriquecimiento proteico de los principales residuos lignocelulósicos agroindustriales de la Región La Libertad con la asociación mixta de *richoderma reesei*, *Chaetomiun cellulolyticum* y *Candida utilis* para alimentación animal. Arnaldoa. 27(1): 99-114. DOI:10.22497/arnaldoa.271.27104
- Camargo D., Sene I., Loreto D., De Almeida M. 2015. Xylitol bioproduction in hemicellulosic hydrolysate obtained from sorhum forage biomass. Appl. Biochem Biotechnol. 175: 3628-3642.DOI 10.1007/s12010-015-1531-4
- Carrera, 2021. Estudio del efecto de la producción de xilitol, a partir de residuos lignocelulósicos. Tesis de grado. Maestría en Ciencias de Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.
- Cavagnari B. 2019. Edulcorantes no calóricos: características específicas y evaluación de su seguridad. Arch Argent Pediatr. 117 (1): 1-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.5546/aap.2019.e1>
- Cerioni J., Nichio N., Santori G. 2019. Producción de xilitol a partir de la hidrogenación de xilosa en fase acuosa con catalizadores de níquel. 5° Jornada ITE. 679-684. Facultad de Ingeniería- UNLP.

DOI:<https://1library.co/document/zpwjvr7y-produccion-xilitol-partir-hidrogenacion-xilosa-acuosa-catalizadores-niquel.html>

- Chandler C. Villalobos N., González E., Arenas E., Mármol Z., Ríos J., Aiello C. 2012. Hidrolisis acida diluida en dos etapas de bagazo de caña de azúcar para la producción de azúcares fermentables. *Multiciencias*. 12(3): 245-253.
 - DOI: <https://biblat.unam.mx/hevila/Multiciencias/2012/vol12/no3/1.pdf>
- Cheng K., Zhang J., Chavez E., Li J. 2010. Integrated production of xylitol and ethanol using corncob. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2): 411–417. DOI: 10.1007/s00253-010-2612-5.
- Cortivo, P. R. D., Hickert, L. R., Hector, R., y Ayub, M. A. Z. 2018. Fermentation of oat and soybean hull hydrolysates into ethanol and xylitol by recombinant industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* under diverse oxygen environments. *Industrial crops & products*. 113, 10-13. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.010>
- Cunha F., Hickert L., Rech R., Dillom A., Záchia M. 2017. Fermentation of hexoses and pentoses from hydrolyzed soybean hull into ethanol and xylitol by *candida guilliermondii* BL 13. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 34(4): 927-936. DOI: [dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20170344s20160005](https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170344s20160005)
- Díaz L., y Ordóñez., 2014. Tranformación de biomasa en biocombustibles de segunda generación. *Madera y Bosques*. 20(3): 11-24. DOI: <https://www.scielo.org.mx/pdf/mb/v20n3/v20n3a2.pdf>
- Duarte, A. 1995. Introducción a la ingeniería Bioquímica. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Pag. 88. https://kupdf.net/download/introduccion-a-la-ingenieria-bioquimica-alberto-duarte-torres_5c6783d4e2b6f568211082ce_pdf
- Durango L. 2007. Evaluación y escalamiento de la producción de levaduras nativas tipo *Saccharomyces spp.* A nivel de laboratorio. Tesis de grado. Universidad Eafit. Medellin, Colombia.
- Espinoza J. 2020. Biotechnological production of xylitol from agricultural waste. *Revista de Ciencia Biológicas y de la Salud por la Universidad de Sonora*. 12(1):126-134. DOI: <https://doi.org/10.18633/biotech.v22i1.1160>

- Figueroa E., Pérez F., Godínez L. 2015. La Producción y el consumo del café. ECOFAN. Informe ECOFAN. España. Pag: 139. ISBN 978-607-8324-49-1
- Fogler S. 2008. Elementos de ingeniería de las reacciones químicas. Cuarta edición. Pearson Educación. México. SBN: 978-970-26-1198-1
- García J., Gracia M., Casado F., García A. 2013. Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. Nutrición Hospitalaria. 28(4): 17-31. ISSN (Versión electrónica): 1699-5198
- Gastélum E. 2007. Producción de xilitol por la levadura IEC5-ITV a partir de hidrolizado de bagazo de caña en cultivo por lote-alimentado. Tesis de grado. Maestría en ciencias en ingeniería bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. México.
- Gil A., Morales J., Rojas L., Narváez P. 2019. Process simulation for xylitol production from brewer's spent grain in a Colombian biorefinery Part 1: Xylose production from arabinosyls extracted by the alkaline pretreatment of BSG. Ingeniería de investigación. 39 (1): 15-23. DOI:10.15446/ing.investig.v39n1.70080
- Gómez E., Ríos L., Peña J. 2012. Madera, un Potencial Material Lignocelulósico para la Producción de Biocombustibles en Colombia. Información Tecnológica Vol. 23(6), 73-86. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642012000600009>
- González J., Aguilar L., Matus G., Pardo J., Flores A., Segal C. 2020. Levaduras adaptadas al frío: el tesoro biotecnológico de la Antártica. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 23:1-14. DOI: <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.267>
- Granström T. 2002. Biotechnological production of xilitol with *candida* yeasts. Technical Biochemistry Report 2. Universidad Tecnológica de Helsinki, Departamento de Tecnología Química. Finlandia. ISBN 951-22-5992-3
- Greetham, D., Adams, J. y Du, C. (2020). The utilization of seawater for the hydrolysis of macroalgae and subsequent bioethanol fermentation. Scientific Reports, 10(1). DOI:10.1038/s41598-020-66610-9

- Gutierrez J., Reyes H., Castañeda J. 2017. Análisis fisicoquímico de las hojas de eucalipto camaldulensis y su hidrolizado, como sustrato en la producción de xilitol. Entre Ciencia e Ingeniería. 11(22): 76-83. ISSN 1909-8367
- Manual del operador. 2008. My- Control por Biorreactores esterilizables en autoclave 1-3 L. 2008. Versión de software mE.2.5.X;
- Hernandez D., Ferrera R., Alarcón A. 2019. *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. Chileam J. Agric. Anim. Sci, ex Agro-Ciencia. 35(1): 98-112. ISSN 0719-3890
- Industry Experts. 2017. Xylitol – A global Market Overview. <https://industry-experts.com/verticals/food-and-beverage/xylitol-a-global-market-overview>
- Jia H., Shao T., Zhong C., Li Hengxiang., Jiang M., Zhou H., Wei P. 2016. Evaluation of xylitol production using corncob hemicellulosic hydrolysate by combining tetrabutylammonium hydroxide extraction with dilute acid hydrolysis. Carbohydrate. 151(2016): 676-683. DOI:10.1016/j.carbpol.2016.06.013.
- Lázaro, 2013. Tecnología de los bioprocesos – Diseño de biorreactores y fermentadores. Tecnologías críticas para la industria (TIC). FARMAESPAÑA INDUSTRIA. Manual de laboratorio. España. <https://www.yumpu.com/es/document/read/35961459/tecnologia-de-los-bioprocesos-diseno-de-fermentadores-y-biorreactores>
- Ledezma E., Ruiz R., Bastos G., Montes N., Roa V., Rodriguez G. 2018. Producción de xilitol a partir de hidrolizados ácidos no detoxificados de bagazo de sorgo por *Debaryomyces hansenii*. AGROCIENCIA. 52: 1095-1106. ISSN 2521-9766
- López A., Bolio G., Veleza L., Solórzano M., Acosta G., Hernandez M., Salgado S., Córdova S. 2016. Obtención de celulosa a partir de bagazo de caña de azúcar (*Saccharum spp*). Agroproductividad. 9(7): 41-45. https://www.researchgate.net/publication/306031507_Obtencion_de_celulosa_a_partir_de_bagazo_de_cana_de_azucar_Saccharum_spp_Agroproductividad

- López J., Romero I., Cara C., Castro E., Mussatto S. 2018. Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* from rapeseed straw hemicellulosic hydrolysate. *Bioresource Technology*, 247: 736–743 DOI: 10.1016/j.biortech.2017.09.139.
- López A., Aristizábal D., Restrepo A., López M. 2020. Germinado semillas para la investigación. Una estrategia de futuro en Risaralda. Editorial Universidad Tecnológica de Pereira. Colección de trabajos de investigación. ISBN: 978-958-722-494-8
- Mäkinen K. 1978. *Biochemical Principles of the Use of Xylitol in Medicine and Nutrition with Special Consideration of Dental Aspects*. Springer Basel A.G. USA. 30: 11-12. DOI: 10.1177/00220345000790060101
- Manjarres K., Arias M., Molina Y., Betancur M., Rodríguez E. 2016. Producción de xilitol por *Candida guilliermondii* a partir de fermentación de residuos de palma de aceite. *U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*.19 (2):403-409.
 - DOI: <https://doi.org/10.31910/rudca.v19.n2.2016.94>
- Manjarres K., Otero N., Rodríguez E., Arías M. 2021. Producción de xilitol a partir de hidrolizados de raquis de palma por *Candida tropicalis*: optimización de las condiciones de fermentación. *Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación científica*. 24(2): 1894. DOI: <https://doi.org/10.31910/rudca.v24.n2.2021.1894>
- Manzur F., Morales M., Ordosgoitia J., Quiroz R., Ramos Y., Corrales H. 2019. Impacto del uso de edulcorantes no calóricos en la salud cardiometabólica. *Rev. Colomb. Cardiol.* 27(2):103-108. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rccar.2019.11.003>
- Marín T. 2018. Producción de bioetanol a través de la fermentación en batch de la cáscara de mango (*Mangifera indica*) usando como inóculo la *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de grado. Facultad de Ingeniería y ciencias Básicas. Colombia.
- Martínez E., Villareal M., Almeida J., Solenzal A., Canilha L., Mussatto S. 2002. Uso de diferentes materias primas para la producción biotecnológica de xilitol. *CYTA-Journal of Food*. 3(5): 295-301.

- Martínez R. 2013. Caracterización fermentativa de la producción de xilitol por *candida magnoliae* utilizando hidrolizados de semilla de tamarindo como sustrato. Tesis de grado. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán, México.
- Martínez., Olivares L., Sánchez S. 2019. Production of bioalcohols and antioxidant compounds by acid hydrolysis of lignocellulosic wastes and fermentation of hydrolysates with *Hansenula polymorpha*. Engineering in Life Sciences.19:522-536. DOI:10.1080/11358120209487742
- Martos M. 2011. Modo de operación de biorreactores. Cuaderno teórico Unidad temática IV. Universidad Nacional de Misiones. Argentina. ISBN 978-950-579-212-2
- Meinander N., Boels I., Hahn B. 1999. ermentation of xylose/glucose mixtures by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing *XYL1* and *XYL2* from *Pichia stipitis* with and without overexpression of *TAL 1*. Bioresource Technology. 68: 79-87. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00085-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00085-6)
- Narváez A. 2018. Efecto inhibitorio del extracto de propóleo edulcorado con xilitol a diferentes concentraciones sobre *Streptococcus mutans*. Tesis de grado. Universidad central del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Morales J., 2019. Estudio de la producción de etanol mediante cultivo por lotes y continuo. Tesis de grado. Maestría en Ciencias de Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.
- Oliva J. 2003. Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por capor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyes marcianus*. Tesis de grado para obtener el título de doctorado. Universidas de complutense de Madrid. España.
- Palacio A., Cuétara M., Infecciones por hongos invasores en imágenes. Ars Médica. JAZ Editors, S.L España. ISBN: 978-84-9751-356-2
- Pappu J., y Gummadi S. 2016. Multi response optimization for enhanced xylitol production by *Debaryomyces nepalensis* in bioreactor. Biotech. 6 (151): 1-10.

DOI 10.1007/s13205-016-0467-x

- Pappu J., y Gummadi S. 2017. Artificial neural network and regression coupled genetic algorithm to optimize parameters for enhanced xylitol production by *Debaryomyces nepalensis* in bioreactor. Biochemical Engineering Journal. 120(2017): 136-145. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.01.010>
- Parajó, J. C., Domínguez, H. y Domínguez, J. M. 1998. Biotechnological production of xylitol. Part 2: Operation in culture media made with commercial sugars. Bioresource Technology. 65; 203-212. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00036-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00036-4)
- Pardi G., Cardozo E. 2002. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis Bucal. Acta odontologica. 40(1): 9-17. ISSN 0001-6365.
- Peydro M., Ghilotti J., Iraola C., Vela N. 2019. El xilitol como prevención de la caries dental: dónde obtenerlo y cómo consumirlo. Revista Labor Dental Clínica. 20(2): 32-54. ISSN 1888-4040
- Pineda J., Johnny O., Gómez M., Fontalvo J. 2012. Remoción de los inhibidores de la fermentación etanólica usando membrana de polidimetilsiloxano. (PDMS) por pervaporación. Revist ION. 25(1): 51-59. ISSN 0120-100X
- Polaina J., MacCabe A. 2007. Industrial Enzymes. Structure, function and applications. Springer. España. ISBN 978-1-4020-5376-4 (HB)
- Prakasham R., Sreenivas R., Hobbs P. 2009. Current trends in biotechnological production of xylitol and future prospects. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy. 3(1): 8-36. ISSN 0973-8916
- Rosales M., Honorato S., Santos B., Pérez M., Colotl G., Sánchez V. 2016. Composición química de las hojas y ramas de cedrela odorata L. de dos plantaciones forestales como fuente de materia prima lignocelulósica. Madera y bosques. 22(2):131-146. DOI: <https://doi.org/10.21829/myb.2016.2221330>
- Rosales F. 2018. Evaluación comparativa entre xilitol y sorbitol, como alternativas para la diversificación de la industria azucarera. Cengicaña. Centro Guatemalteco de investigación y capacitación de caña de azúcar. Disponible

en: https://www.researchgate.net/publication/328643271_evaluacion_comparativa_entre_xilitol_y_sorbitol_como_alternativas_para_la_diversificacion_de_la_industria_azucarera.

- Rowe R., Sheskey P., Owen S. 2006. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Fifth Edition. Pharmaceutical Press. UK. ISBN 1 58212 058 7 (USA).
- Santos J., y Faulk M. 2019. Nutrición de la levadura. Manual enartis, Larson división Vinícola
- Sehnem N., Hickert L., Cunha F., Morais M., Záchia M. 2016. Bioconversion of soybean and rice hull hydrolysates into ethanol and xylitol by furaldehyde-tolerant strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus*, and their cofermentations. Biomass Conv. Bioref. 7: 199-206. DOI:10.1007/s13399-016-0224-8
- Serrano J. 2017. Monitorización y control básico de biorreactores. TFG en ingeniería Informática, Escuela de Ingeniería. Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- RSluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D., Crocker D. 2012. Determination of structural carbohydrates and linnin in biomass. Laboratory analytical procedure (LAP). Technical Report NREL/TP-510-42618.
 - Contract No. DE-AC36-08GO28308
- Tamburini E., Costa S., Marchetti M., Pedrini P. 2015. Optimized Production of Xylitol from Xylose Using a Hyper-Acidophilic *Candida tropicalis*. Biomolecules 5(1), 1979-1989. DOI: 10.3390/biom5031979
- Torres D., Morales S., Quintero J. 2017. Evaluación de pretratamientos químicos sobre materiales lignocelulósicos. Ingeniare. Revista chilena de ingeniería. 25(4): 733-743. ISSN 0718-3305
- Vallejo M., Chade M., Medvedeff M., Area M., Felissia F. 2013. Producción biotecnológica de xilitol utilizando *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis*. Jornadas científicas tecnológicas. Universidad Nacional de Misiones. Argentina.
- Vaz de Arruda p., Dos Santos J., Lacerda R., Virgínio D., Kiyomi C, Moraes G., Nolasco J., Cruz J, Vaz C., Almeida M. Scale up of xylitol production from

sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 47: 297-302.

- Vele M, Abril M, Zalamea T., Pinos V. 2021. Mini revisión: aplicación de líquidos iónicos en hidrólisis ácida de material lignocelulósico para la obtención de azúcares. Ciencia en desarrollo. 12(1): 1-13. DOI:10.1016/j.jiec.2016.11.046
- Xu, L., Liu, L., Li, S., Zheng, W., Cui, Y., Liu, R., y Sun, W. 2019. Xylitol production by *Candida tropicalis* 31949 from sugarcane bagasse hydrolysate. *Sugar Tech.* **21**, 341- 347. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12355-018-0650-y>
- Weusthuis R., Pronk J., Peter J., Broel V., Johannes P., 1994. Chemostat cultivation as a tool for studies on sugar transport in yeasts. American Society for Microbiology. 58(4): 616-630. DOI: 10.1128/mr.58.4.616-630.1994.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A

Metodología por: Manual de operación de Termobalanza AMB-50 (P.N. 6157, español, Revisión L6, marzo 2006)

Procedimiento:

1. Conectar la termobalanza a la toma de corriente.
2. Se realiza un manteniendo del platillo mecánico.
3. Se presiona el botón "Tare", para tarar la balanza.
4. Depositar la muestra a la cual se le determinará la humedad, la cantidad de muestra recomendada debe de ser alrededor de ± 0.5 g (peso marcado por la propia termobalanza).
5. Se cerró la tapa de la termobalanza para comenzar el proceso oprimiendo el botón "start".
6. La termobalanza se deja encendida mientras calcula la humedad de la materia prima, alrededor de 20 minutos.
7. Al finalizar el tiempo establecido, la termobalanza proporcionará un número en su pantalla, el cual corresponde al número de Sólidos Totales, este dato debe anotarse debido a que se utilizará posteriormente.
8. Se limpia perfectamente el platillo metálico que contiene la muestra seca y se vuelve a colocar en la termobalanza.
9. La humedad de la muestra se calcula mediante la ecuación 1.1

$$\% \text{Humedad} = 100\% - ST \quad (1.1)$$

Dónde: *ST* es el Número de sólidos totales determinados (%).

ANEXO B

Caracterización de RM y RCC por el método NREL.

Este procedimiento utiliza una hidrólisis ácida de dos pasos para fraccionar la biomasa en formas que sean más fáciles de cuantificar. La lignina se fracciona en material insoluble en ácido y material soluble en ácido, este procedimiento se utiliza, posiblemente junto con otros procedimientos, para determinar la cantidad de carbohidratos estructurales y lignina en una muestra de biomasa sólida.

Terminología.

- ODW= Peso seco del horno. Peso de la biomasa corregido matemáticamente por la cantidad de humedad presente en la muestra en el momento del pesaje.
- Lignina insoluble en ácido= el residuo que queda en un crisol filtrante de porosidad media tras una hidrólisis de dos pasos.
- Hidratos de carbono estructurales= hidratos de carbono poliméricos, concretamente celulosa y hemicelulosa.

Interferencias

Este procedimiento ha sido optimizado para el rango de tamaño de partícula.

La desviación a un tamaño de partícula menor puede resultar de partículas puede dar lugar a un sesgo bajo en el contenido de hidratos de carbono (y, en consecuencia, a un sesgo alto de lignina) debido a la excesiva degradación de los hidratos de carbono. La desviación a un tamaño de partícula mayor también puede dar lugar a un sesgo bajo en contenido de hidratos de carbono (y, en consecuencia, un alto sesgo de lignina) debido a la hidrólisis incompleta de azúcares poliméricos a azúcares monoméricos.

Las muestras con un contenido de cenizas superior al 10 % en peso pueden no ser

adecuadas para este procedimiento, ya que la de cenizas, ya que la muestra puede contener tierra u otros minerales que interfieran pueden catalizar reacciones secundarias.

Las muestras con un contenido de humedad superior al 10 % en peso pueden no ser adecuadas para este procedimiento, ya que el exceso de humedad interferirá con las concentraciones de ácido apropiadas.

Las muestras deben secarse (secadas al aire o al horno a menos de 40°C) antes de este procedimiento.

Las muestras que contengan proteína harán que la lignina insoluble en ácido sea alta, a menos que la proteína se contabilice en el análisis gravimétrico a menos que la proteína se tenga en cuenta en la determinación gravimétrica del material insoluble en ácido.

Este procedimiento no es adecuado para muestras que contengan ácido, base o catalizador añadido.

Aparatos

- Balanza analítica, con una precisión de 0.1 mg.
- Horno de secado por convección, con control de temperatura de 105 ± 3 °C.
- Horno de mufla, equipado con un termostato, ajustado a 575 ± 25 °C o equipado con un programa de rampa opcional.
- Baño de agua, ajustado a 30 ± 3 °C.
- Autoclave, adecuado para autoclavar líquidos, ajustado a 121 ± 3 °C.
- Instalación de filtración, equipada con una fuente de vacío y adaptadores de vacío para crisoles.
- Desecador con desecante.

- Sistema de HPLC equipado con detector de índice de refracción y las siguientes columnas:
- Columna Shodex sugar SP0810 o Biorad Aminex HPX-87P (o equivalente) con forma iónica forma iónica H^+/CO_3^- columna de guarda adecuada.
- Columna Biorad Aminex HPX-87H (o equivalente) equipada con una columna de guarda adecuada.
- Espectrofotómetro UV-Visible, matriz de diodos o de longitud de onda única, con cubetas de cuarzo de alta pureza de 1 cm de longitud de trayecto.
- Bureta automática, capaz de dispensar 84,00 mL de agua, opcional.

Reactivos y materiales

Reactivos

- Ácido sulfúrico, 72% p/p (gravedad específica 1,6338 a 20°C) - (también disponible comercialmente como reactivo para la determinación del flúor, de Fluka #00647).
- Carbonato de calcio, grado de reactivo ACS.
- Agua purificada, filtrada a 0,2 μm .
- Estándares de alta pureza: D-cellobiosa, D(+)glucosa, D(+)xilosa, D(+)galactosa, L(+)arabinosa y D(+)manosa.
- Segundo conjunto de estándares de alta pureza, como los enumerados anteriormente, de una fuente diferente (fabricante o lote), que se utilizará para preparar estándares de verificación de la calibración (CVS).

Materiales

- Estándar de control de calidad, bien caracterizado, como un estándar de biomasa del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) u otra muestra bien caracterizada de composición similar a las muestras que se analizan.

- Tubos de presión, con una capacidad mínima de 90 mL, de vidrio, con tapones de teflón a rosca y juntas tóricas (tubo de vidrio Ace # 8648-30 con tapón #5845-47, o equivalente).
- Varillas agitadoras de teflón de tamaño adecuado para los tubos de presión y aproximadamente 5 cm más largas que los los tubos de presión.
- Crisoles filtrantes, 25 mL, porcelana, porosidad media, Coors #60531 o equivalente.
- Frascos, boca ancha, 50 mL.
- Frascos de filtración, 250 mL.
- Matraces Erlenmeyer de 50 mL.
- Pipetas ajustables, que cubran rangos de 0,02 a 5,00 mL y 84,00 mL.
- Papel de pH, rango 4-9.
- Jeringas desechables de 3 mL, equipadas con filtros de jeringa de 0,2 μ m.
- Frascos de automuestreador con sellos superiores de engarce para ajustar.

Consideraciones y riesgos de ES&H

- El ácido sulfúrico es corrosivo y debe manipularse con cuidado.
- Tenga cuidado al manipular los tubos de presión calientes después de sacarlos de la autoclave, ya que los presurizados pueden provocar un peligro de explosión.
- Cuando coloque los crisoles en un horno o los retire, utilice el equipo de protección personal adecuado, incluyendo guantes resistentes al calor.
- Opere todo el equipo de acuerdo con el manual y los Procedimientos de Operación Segura del NREL.
- Siga todos los procedimientos aplicables de manipulación de productos químicos del NREL.
- Muestreo, muestras de ensayo y unidades de ensayo
- Se debe tener cuidado para asegurar que se toma una muestra representativa para el análisis.

- Se debe realizar el LAP "Preparación de las muestras para el análisis de la composición de la biomasa" antes de este análisis. Las muestras deben tener un contenido mínimo de sólidos totales del 85%.
- El LAP "Determinación de extractivos en la biomasa" debe realizarse antes de este análisis si extractivos están presentes en la muestra.
- El LAP "Determinación de Sólidos en la Biomasa" debe realizarse al mismo tiempo que se pesan las muestras para este análisis.
- Este procedimiento es adecuado para muestras que han sido secadas al aire o liofilizadas. Las muestras secadas a una temperatura de 45°C o superior no son adecuadas para este procedimiento.

Procedimiento

Preparar la muestra para el análisis e hidrolizarla.

1.- Colocar un número adecuado de crisoles filtrantes en el horno de mufla a 575 ± 25 °C durante un mínimo de cuatro horas. Retirar los crisoles del horno directamente en un desecador y enfriar durante un período de tiempo determinado, se recomienda una hora. Pesar los crisoles con una precisión de 0,1 mg y registrar este peso. Es importante mantener los crisoles en un orden determinado, si no están marcados con identificadores. Las calcomanías de marcado permanente

Las calcomanías permanentes están disponibles en Wale Apparatus. No marque el fondo del crisol de filtración crisol de filtración con un marcador de porcelana, ya que esto impedirá la filtración.

2.- Volver a colocar el crisol en el horno de mufla a 575 ± 25 °C y calcinar hasta alcanzar un peso constante. El peso constante se define como menos de $\pm 0,3$ mg de cambio en el peso tras una hora de recalentamiento del crisol.

3.- Pesar $300,0 \pm 10,0$ mg de la muestra o del patrón de control de calidad en un tubo de ensaye tarado. Registrar en el peso con una precisión de 0,1 mg. Marcar el tubo de ensaye con un rotulador permanente. "Determinación de los sólidos totales en la biomasa" debe realizarse al mismo tiempo, para medir con precisión el porcentaje de

sólidos para la corrección. Cada muestra debe ser analizada en duplicado, como mínimo.

4.- Agregue 3.00 ± 0.01 mL de ácido sulfúrico al 72% a cada tubo de presión. Utilice una Se realiza una agitación para mezclar durante un minuto, o hasta que la muestra esté bien mezclada.

5.- Colocar el tubo de ensaye en un baño de agua a 30 ± 3 °C e incubar la muestra durante 60 ± 5 minutos. Agitar la muestra cada 5 a 10 minutos sin sacar la muestra del baño. La agitación es esencial para asegurar un contacto uniforme entre el ácido y las partículas y una hidrólisis uniforme.

6.- Una vez completada la hidrólisis de 60 min, retirar los tubos del baño de agua. Diluir el ácido a una concentración del 4% añadiendo 84.00 ± 0.04 ml de agua destilada. Se vierte el contenido de los tubos de ensaye en cada uno de los frascos de 250 mL con tapa de baquelita utilizando parte de los 84 mL para la dilución. Se mezcla la muestra invirtiendo el tubo varias veces para eliminar la separación de fases entre capas de ácido de alta y baja concentración.

Nota: El volumen de la solución al 4% será de 86.73 mL, como se demuestra en siguientes cálculos.

- Densidad 72% $\text{H}_2\text{SO}_4 = d_{72\% \text{ H}_2\text{SO}_4} = 1.6338$ g/mL
- Densidad $\text{H}_2\text{O} = d_{\text{H}_2\text{O}} = 1.00$ g/mL
- Densidad 4% $\text{H}_2\text{SO}_4 = d_{4\% \text{ H}_2\text{SO}_4} = 1.025$ g/MI

a. El peso de 3.00 ml de H_2SO_4 al 72% es:

$$3.00 \text{ ml } 72\% \text{ H}_2\text{SO}_4 \times d_{72\% \text{ H}_2\text{SO}_4} = 4.90 \text{ g H}_2\text{SO}_4 \text{ al } 72\%$$

b. La composición de 3 ml de H_2SO_4 al 72% es:

$$4.90 \text{ g } 72\% \text{ H}_2\text{SO}_4 \times 72\% \text{ (peso ácido)} = 3.53 \text{ g ácido}$$

$$4.90 \text{ g H}_2\text{SO}_4 \text{ al } 72\% \times 28\% \text{ (agua en peso)} = 1.37 \text{ g de agua}$$

c. La concentración de H_2SO_4 después de la dilución es:

$$3.53 \text{ g ácido} / (84.00 \text{ g H}_2\text{O} + 4.90 \text{ g H}_2\text{SO}_4 \text{ al } 72\%) = 3.97\% \text{ H}_2\text{SO}_4 \text{ (p/p)}$$

d. El volumen total de solución presente después de la dilución es:

$$(4.90 \text{ g de H}_2\text{SO}_4 + 84.00 \text{ g de H}_2\text{O}) \times (d_{4\% \text{H}_2\text{SO}_4})^{-1} = 86.73 \text{ ml}$$

7.- Preparar un conjunto de normas de recuperación del azúcar (SRS) que se tomarán a través de la hidrólisis restante y se utilizarán para corregir las pérdidas debidas a la destrucción de azúcares durante la hidrólisis ácida diluida. SRS debe incluir D - (+) glucosa, D - (+) xilosa, D (+) galactosa, - L (+) arabinosa y D - (+) manosa. Las concentraciones de azúcar SRS deben elegirse para que se parezcan más a las concentraciones de azúcares en la muestra de ensayo. Pesar las cantidades requeridas de cada azúcar, a 0.1 mg más cercano, y agregar 10.0 ml de agua desionizada. Añadir 348 μl de ácido sulfúrico al 72%. Transfiera el SRS a un tubo de presión y la tapa firmemente.

7.1 No se requiere un SRS nuevo para cada análisis. Se puede producir una gran cantidad de patrones de recuperación de azúcar, se filtran a través de filtros de 0.2 μm , se dispensan en alícuotas de 10.0 mL en recipientes sellados y se etiquetan. Pueden almacenarse en un congelador y retirarse cuando sea necesario. Descongele y vórtice el SRS congelado antes de usarlo. Si se usan SRS congelados, se añade la cantidad apropiada de ácido a la muestra descongelada y se agita en vórtice antes de transferirla a un tubo de presión.

8.- Colocar los tubos de ensayo en la autoclave. Autoclave las muestras selladas y las normas de recuperación de azúcar durante una hora a 121 °C. Después

de completar el ciclo de autoclave, deje que los hidrolizados se enfríen lentamente a temperatura ambiente cercana antes de retirar las tapas. (Si no se lleva a cabo la etapa 2.1 extraiga una alícuota de 10 mL del licor para usar en la etapa 5)

Analizar la muestra para la lignina insoluble en ácido.

1.- Filtrar en vacío la solución de hidrolizada después de terminado el ciclo en la autoclave a través de crisoles filtrantes previamente pesados. Capture el filtrado en un matraz filtrante.

2.- Transferir una alícuota, aproximadamente 50 ml, en una botella de almacenamiento de muestras. Esta muestra se usará para determinar lignina soluble en ácido, así como carbohidratos. La determinación de lignina soluble en ácido debe realizarse dentro de las 6 h siguientes a la hidrólisis. Si el licor de hidrólisis debe almacenarse, se debe almacenar en un máximo de dos semanas. Es importante recoger la alícuota de licor antes de continuar con el paso 3.

3.- Utilizar agua destilada para transferir cuantitativamente todos los sólidos restantes del tubo de ensaye al crisol filtrante. Enjuague los sólidos con un mínimo de 50 ml de agua destilada. Se puede usar agua destilada caliente en lugar de agua a temperatura ambiente para disminuir el tiempo de filtración.

4.- Secar el crisol y el residuo insoluble en ácido a 105 ± 3 °C en la estufa hasta que se consiga un peso constante, usualmente un mínimo de cuatro horas.

5.- Retirar las muestras de la estufa y enfriar en un desecador durante una hora. Registrar el peso del crisol y el residuo seco a 0.1 mg.

6.- Colocar los crisoles y el residuo en el horno de mufla a 575 ± 25 °C durante 2h. Esperar un tiempo específico, alrededor de 6 h, a que baje la temperatura

hasta 100° C.

7.- Retirar cuidadosamente el crisol del horno directamente en un desecador y enfríelo durante un tiempo de 30 min. Pesar los crisoles y la ceniza a 0.1 mg más cercano y registrar el peso. Coloque los crisoles de nuevo en el horno y la ceniza a un peso constante.

Analizar la muestra para la lignina soluble en ácido como sigue.

1.-En un espectrofotómetro UV-Visible, ejecutar un fondo de agua destilada o ácido sulfúrico al 4%.

2.- Usando la alícuota de licor de hidrólisis obtenida en la etapa 2.2, mida la absorbancia de la muestra a una longitud de onda apropiada en un espectrofotómetro UV-Visible. Consulte la Tabla B1 para conocer los valores de longitud de onda sugeridos.

Tabla B1: Longitudes de onda sugerida para el espectro UV

Tipo de Biomasa	Lambda Max (nm)	Absortividad a Lambda máx. (L / g cm)	Longitud de onda recomendada (nm)	Absortividad a longitud de onda recomendada (nm)
Pinus Radiata - NIST SRM 8493	198	25	240	12
Bagasse NIST SRM 8491	198	40	240	25
CornStover-NREL fuente de alimentación suministrada	198	55	320	30
Populus deltoides NIST SRM 8492	197	60	240	25

Diluir la muestra según sea necesario para llevar la absorbancia al rango de

0.7-1.0, registrando la dilución. Se puede usar agua destilada o ácido sulfúrico al 4% para diluir la muestra, pero el mismo disolvente debe usarse como blanco. Registre la absorbancia a tres decimales. La reproducibilidad debe ser de ± 0.05 unidades de absorbancia. Analizar cada muestra por duplicado, como mínimo. (Este paso debe realizarse dentro de las seis horas siguientes a la hidrólisis.)

3.- Calcule el peso en seco del horno (ODW) de la muestra libre de extractivos, usando el contenido promedio de sólidos totales.

$$ODW = \text{Muestra peso aire seco} \times \text{sólidos} \frac{\text{totales}}{100} \quad (\text{B1.1})$$

4.- Calcular la cantidad de lignina soluble en ácido presente en la muestra mediante el cálculo con la ecuación B.1.2

$$\%ASL = \frac{UV \text{ abs} \times \text{Volumen de filtración} \times \text{Disolución}}{\epsilon \times \text{muestra de ODW} \times \text{Pathlength}} \quad (\text{B1.2})$$

Dónde: UVabs es la absorbancia UV-Vis promedio para la muestra en la longitud de onda apropiada (ver Tabla B2)

Líquido de hidrólisis en volumen = volumen de filtrado (86.73 ml)

$$\text{Disolución} = \frac{\text{Mutres de volumen} + \text{Disolución del volumen}}{\text{Muestra de volumen}} \quad (\text{B1.3})$$

Donde: ϵ es la Absortividad de la biomasa a una longitud de onda específica (ver tabla B1), la Muestrade ODW es el peso de la muestra (mg) y Pathlength es la trayectoria de la celda UV-Vis (Ancho de la celda en cm).

Analizar la muestra para los carbohidratos estructurales.

1.- Preparar una serie de normas de calibración que contengan los compuestos que se van a cuantificar, haciendo referencia a la Tabla B.2 para el rango de concentración sugerida. Utilice un punto de cuatro calibraciones. Si los

estándares se preparan fuera de los rangos sugeridos, el nuevo rango para estas curvas de calibración deben ser validado.

Tabla B.2 Intervalos de concentración sugeridos para normas de calibración

Componente	Rango de concentración sugerido (mg/ml)
D-celobiosa	0.1-4.0
D(+)glucosa	0.1-4.0
D(+) xilosa	0.1-4.0
D(+)galactosa	0.1-4.0
L(+)arabonosa	0.1-4.0
D(+)manosa	0.1-4.0
CVS	Medio del rango lineal, la concentración no es igual a un punto de calibración (se sugiere 2.5)

2.- Preparar un estándar independiente de verificación de calibración (CVS) para cada conjunto de normas de calibración. Utilice reactivos de una fuente o lote distintos de los utilizados en la preparación de los estándares de calibración. Prepare el CVS a una concentración que caiga en medio del rango validado de la curva de calibración. El CVS debe analizarse en la HPLC después de cada conjunto de calibración ya intervalos regulares a lo largo de la secuencia, agrupando grupos de muestras. El CVS se utiliza para verificar la calidad y la estabilidad de la (s) curva (s) de calibración a lo largo de la ejecución.

3.- Usando el licor de hidrólisis obtenido en la etapa 2.2, transfiera una alícuota de aproximadamente 20 ml de cada licor a un matraz Erlenmeyer de 50 ml.

4.- Utilizar carbonato de calcio para neutralizar cada muestra a pH 5-6. Evite neutralizar a un pH mayor que 6 monitorizando con papel pH. Añadir el carbonato de calcio lentamente después de alcanzar un pH de 4. Remueva la muestra con frecuencia. Después de alcanzar el pH 5-6, detener la adición de carbonato cálcico, dejar reposar la muestra y decantar el sobrenadante. El pH del líquido después de la sedimentación será aproximadamente 7. (Nunca se debe permitir que las muestras excedan un pH de 9, ya que esto

dará como resultado una pérdida de azúcares).

5.- Preparar la muestra para el análisis de HPLC pasando el líquido decantado a través de un filtro de 0.2 μm a un vial de muestreo automático. Sellar y etiquetar el vial. Prepare cada muestra por duplicado, reservando uno de los duplicados para su análisis posterior si es necesario. Si es necesario, las muestras neutralizadas se pueden almacenar en el refrigerador durante tres o cuatro días. Después de este tiempo, las muestras deben considerarse comprometidas debido al potencial crecimiento microbiano. Después del almacenamiento en frío, verificar las muestras de la presencia de un precipitado. Las muestras que contengan un precipitado deben ser filtradas de nuevo, mientras estén frías, a través de un filtro de 0.2 μm .

6.- Analizar los patrones de calibración, CVS y muestras por HPLC usando una columna de azúcar Shodex SP0810 o BioradAminex HPX-87P equipada con la columna de protección apropiada.

Condiciones de HPLC:

- Volumen de inyección: 10-50 μL , dependiendo de la concentración y los límites del detector
- Fase móvil: Agua de grado HPLC, 0.2 μm filtrada y desgasificada
- Caudal: 0.6 ml/min
- Temperatura de la columna: 80-85 ° C
- Temperatura del detector: lo más cerca posible de la temperatura de la columna
- Detector: índice de refracción
- Tiempo de ejecución: 35 min

7.-Compruebe los cromatogramas de la muestra de ensayo respecto a la presencia de celobiosa y azúcares oligoméricos. Los niveles de celobiosa mayores de 3 mg/ml

indican hidrólisis incompleta. Las muestras frescas deben ser hidrolizadas y analizadas.

8.- Verificar los cromatogramas de la muestra de ensayo con respecto a la presencia de picos eluyendo antes de celobiosa (tiempo de retención de 4-5 min usando las condiciones recomendadas). Estos picos pueden indicar altos niveles de productos de degradación del azúcar en la muestra anterior, lo que es indicativo de una hidrólisis excesiva. Todas las muestras de los lotes que muestren evidencia de hiperhidrólisis deben tener muestras frescas hidrolizadas y analizadas.

Analizar la muestra con respecto al contenido de acetilo, si es necesario.

1.- Preparar ácido sulfúrico 0.005 M (0.01 N) para su uso como fase móvil de HPLC. En un matraz aforado de 2 l, añadir 2.00 ml de ácido sulfúrico normalizado 10 N y llevar al volumen con agua de grado HPLC. Filtrar a través de un filtro de 0.2 μ m y desgasificar antes de usar. Si no se dispone de ácido sulfúrico 10N, también se puede usar ácido sulfúrico concentrado. 278\mu l de ácido sulfúrico concentrado llevado al volumen en un matraz aforado de 1 L con agua de grado HPLC también producirán ácido sulfúrico 0.005 M.