

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Trabajo Final de Graduación bajo la modalidad de Proyecto para optar por el Grado de
Licenciatura en Ingeniería de Alimentos

**“Evaluación de la cepa *Candida guilliermondii* en la producción de xilitol a nivel de
laboratorio, a partir de diferentes concentraciones de xilosa comercial y xilosa
extraída de desechos agroindustriales de piña”**

María Belén Rojas Acosta
Carné: A75567

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
San José, Costa Rica

2013

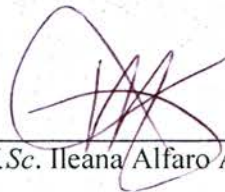
HOJA DE APROBACIÓN DEL TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.

Elaborado por:


María Belén Rojas Acosta

Aprobado por:



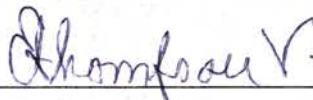
M.Sc. Ileana Alfaro Alvarez

Presidente del Tribunal



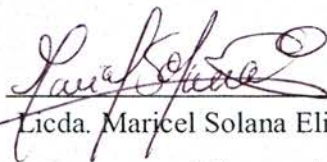
M.Sc. Alicia Hernández Peñaranda

Directora del proyecto



Lic. Eduardo Thompson Vicente

Asesor del proyecto



Licda. Maricel Solana Elizondo

Asesora del proyecto



Ph.D. Ana Mercedes Pérez Carvajal

Profesor Designado

DEDICATORIA

A mis padres María Eugenia y Carlos, por su apoyo y ser el mejor ejemplo a seguir. A mis hermanas Marian y Karla por enseñarme tanto en la vida. A mi novio Luis por darme fuerzas para creer en mí.

AGRADECIMIENTOS

Primero agradezco a Dios, por fortalecerme, por iluminarme en el camino de esta meta y darme el don de la vida.

Al Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA), al Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot), a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica y al Fondo de Incentivos del CONICIT por financiar y coordinar este proyecto.

A mis padres (Carlos y María Eugenia) por su apoyo incondicional y por confiar siempre en mí.

A Marian por ser mi hermana mayor y maestra.

A Karla por ser mi hermana menor, mi compañera de sonrisas, la que siempre me recibe con un abrazo y la que tanto me ha enseñado en la vida.

A mi novio Luis por su escucha y consejo, por siempre estar ahí y enseñarme a disfrutar cada momento de la vida.

A *M.Sc.* Alicia Hernández, Lic. Eduardo Thompson y Licda. Maricel Solana por guiarme y confiar en mí en la realización del proyecto.

A Javier Barboza y Andrés Sánchez por ayudar a coordinar este proyecto y toda la colaboración brindada.

A mis amigas Min, María y Dani por haber adoptado el papel de hermanas durante toda la vida universitaria.

A Zaida y Yuli por ser las amigas de toda la vida y apoyarme en todo momento.

A mis amigas incondicionales Oni, Marijo, Adri, Mari(ela), Mari(ana), Andre, Lola, Ale, Raque por compartir y construir conmigo tan buenos momentos en la vida universitaria, que extenderemos a través del tiempo.

A Hazel, Elisa, Glenda y Diego por ser mis compañeros y amigos del CIPRONA, por brindarme gratos momentos y siempre estar dispuestos a escucharme.

“El secreto de la felicidad es simple: averigua qué es lo que te gusta hacer y dirige tus energías en esa dirección” Robin Sharma

ÍNDICE GENERAL

HOJA DE APROBACIÓN DEL TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE CUADROS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN	xv
1. JUSTIFICACIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. Objetivo general	5
2.2. Objetivos específicos.....	5
3. MARCO TEÓRICO	6
3.1. Producción de piña en Costa Rica	6
3.2. Carbohidratos.....	7
3.2.1. Carbohidratos como fuente de energía	8
3.2.2. Carbohidratos como edulcorantes.....	8
3.3. La xilosa como fuente de carbono en procesos fermentativos	10
3.3.1. Obtención de la xilosa por hidrólisis química	11
3.4. Características físicas y químicas del xilitol.....	12
3.5. Propiedades del xilitol de interés comercial	12
3.6. Producción de xilitol.....	14
3.6.1. Etapas de producción biotecnológica de xilitol con la levadura <i>Candida guilliermondii</i>	15
3.6.2. Factores que afectan la producción biotecnológica de xilitol.....	17
3.6.2.1. Concentración de xilosa inicial	17
3.6.2.2. Fuente de obtención de la xilosa y pureza del sustrato	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
4.1. Localización del estudio.....	20

4.2.	Materiales.....	20
4.2.1	Microorganismo	20
4.2.2	Medios de cultivo	20
4.2.2.1	Medio de mantenimiento de la cepa.....	20
4.2.2.2	Medio para la propagación de la cepa <i>Candida guilliermondii</i>	21
4.3.	Metodología para procesos de fermentación.....	22
4.3.1	Cinética de fermentación de <i>Candida guilliermondii</i> con xilosa comercial como sustrato	22
4.3.1.1	Preparación del inóculo	23
4.3.1.2	Equipo de fermentación.....	23
4.3.1.3	Curva de crecimiento del microorganismo	24
4.3.1.4	Toma de muestra y tiempo de muestreo	24
4.3.2	Evaluación del proceso fermentativo al variar la concentración inicial de xilosa comercial	24
4.3.2.1	Crecimiento del microorganismo	25
4.3.2.2	Toma de muestra y tiempo de muestreo	25
4.3.2.3	Diseño experimental para la evaluación de la fermentación al variar la concentración inicial de xilosa comercial.....	26
4.3.3	Producción de xilitol y otros metabolitos al variar la concentración inicial de xilosa extraída de los residuos de piña.....	27
4.3.3.1	Medio de fermentación.....	28
4.3.3.2	Toma de muestra y tiempo de muestreo.....	29
4.3.3.3	Diseño experimental para la evaluación de la fermentación al variar la concentración de xilosa extraída de residuos de piña	29
4.3.4	Métodos de análisis	30
4.3.4.1	Determinación de la concentración celular	30
4.3.4.2	Determinación de la concentración de xilosa, xilitol, glucosa, galactosa, etanol y ácido acético	30
4.3.4.3	Cálculo de la xilosa consumida, velocidad de crecimiento celular, el rendimiento y productividad de xilitol.	31
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33

5.1	Comportamiento cinético de la levadura <i>Candida guilliermondii</i>	33
5.2	Evaluación de las fermentaciones al variar la concentración inicial de xilosa en un medio sintético	38
5.2.1	Evaluación de la concentración celular de la levadura <i>Candida guilliermondii</i>	39
5.2.2	Evaluación de la concentración de xilosa comercial residual	41
5.2.3	Evaluación del rendimiento, productividad y concentración de xilitol producido	43
5.2.4	Evaluación de la concentración de etanol producido	51
5.3	Evaluación del proceso fermentativo al variar la concentración inicial de xilosa extraída de residuos de piña y su comparación con xilosa comercial	54
5.3.1	Evaluación de la concentración celular de la levadura <i>Candida guilliermondii</i> en fermentaciones iniciadas con xilosa comercial y con xilosa extraída de residuos de piña-.....	55
5.3.2	Evaluación de la concentración de xilosa residual	58
5.3.3	Evaluación de la concentración de xilitol producido.....	63
5.3.4	Evaluación de la concentración de etanol producido	66
6.	CONCLUSIONES.....	70
6.1	Evaluación del comportamiento cinético de la levadura, el consumo de xilosa y la producción de metabolitos.	70
6.2	Evaluación de la capacidad de producción de xilitol de la cepa <i>Candida guilliermondii</i> al variar la concentración inicial de xilosa comercial a nivel de laboratorio.....	70
6.3	Evaluación de la producción de xilitol de la cepa <i>Candida guilliermondii</i> utilizando xilosa extraída de los residuos de piña a nivel de laboratorio y comparación con la fermentación realizada con xilosa comercial pura.	71
7.	RECOMENDACIONES	72
8.	REFERENCIAS	74
9.	APÉNDICE	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales categorías y tipos de edulcorantes (OIA, 2012).	9
Figura 2. Estructura química de la D-xilosa (Belitz & Grosch, 1997).	11
Figura 3. Estructura química del D-xilitol (González <i>et al.</i> , 2011).	12
Figura 4. Metabolismo simplificado de las levaduras en la conversión de la xilosa en xilitol y otros metabolitos (Granström <i>et al.</i> , 2007).	16
Figura 5. Cepa <i>Candida guilliermondii</i> en placa con agar YPD y prueba de tinción de Gram realizada a la misma, vista con el lente 100X al microscopio.	21
Figura 6. Preparación del medio para propagar la cepa <i>Candida guilliermondii</i>	22
Figura 7. Equipo de fermentación: vista frontal e interior del agitador orbital con matraces de 125 mL.	23
Figura 8. Equipo de fermentación necesario para realizar la curva de crecimiento de la levadura <i>Candida guilliermondii</i> y la variación de la concentración inicial de xilosa comercial.	25
Figura 9. Variación promedio (n=3), de la concentración de xilosa, xilitol, etanol y concentración celular, en la curva de crecimiento de la cepa <i>Candida guilliermondii</i> , en un sistema de fermentación por lote a nivel de laboratorio a partir de 60g/L de xilosa comercial, a 30 °C y 200 rpm.	34
Figura 10. Variación promedio (n=3) en la concentración celular (log#cel/mL), de la levadura <i>Candida guilliermondii</i> , con el tiempo de fermentación, para tratamientos con diferentes niveles de concentración inicial de xilosa comercial.	39
Figura 11. Variación promedio (n=3) en la concentración celular (log#cel/mL), al transcurrir el tiempo de fermentación, evaluado con la levadura <i>Candida guilliermondii</i> , en tratamientos con diferentes concentración inicial de xilosa comercial.	40
Figura 12. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilosa a diferentes tiempos de fermentación y concentraciones iniciales de xilosa comercial, con la levadura <i>Candida guilliermondii</i>	42
Figura 13. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilitol, al variar la concentración inicial de xilosa en un medio de fermentación sintético, con	

la levadura <i>Candida guilliermondii</i> , en un periodo de 50 a 100 h de proceso.	44
Figura 14. Variación promedio (n=3) en el de rendimiento de xilitol, al variar la concentración inicial de xilosa en un medio de fermentación sintético, con la levadura <i>Candida guilliermondii</i> , en un periodo de 50 a 100 h de proceso.	46
Figura 15. Variación promedio (n=3) en la productividad de xilitol, al variar la concentración inicial de xilosa en un medio de fermentación sintético, con la levadura <i>Candida guilliermondii</i> , en un periodo de 50 a 100 h de proceso.	47
Figura 16. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilitol a diferentes tiempos del proceso de fermentación, independientemente de la concentración inicial de xilosa comercial, con la levadura <i>Candida guilliermondii</i> en un medio sintético.....	48
Figura 17. Variación promedio (n=3) en la productividad de xilitol a diferentes tiempos del proceso de fermentación, independientemente de la concentración inicial de xilosa comercial, con la levadura <i>Candida guilliermondii</i> en un medio sintético.....	49
Figura 18. Variación promedio (n=3) en la concentración de etanol al transcurrir el tiempo de fermentación, evaluado con la levadura <i>Candida guilliermondii</i> , en tratamientos con diferentes concentraciones iniciales de xilosa comercial.....	52
Figura 19. Variación promedio (n=3) en la concentración celular a diferentes tiempos del proceso de fermentación, independientemente de la concentración inicial y del tipo de xilosa, con la levadura <i>Candida guilliermondii</i>	55
Figura 20. Variación promedio (n=3) en la concentración celular con dos tipos de xilosa, independientemente de la concentración inicial de xilosa comercial, en un periodo de 29 a 70 h de proceso, con la levadura <i>Candida guilliermondii</i>	56

Figura 21. Variación promedio (n=3) en la concentración celular con dos tipos y dos concentraciones iniciales de xilosa al transcurrir el tiempo de fermentación con la levadura <i>Candida guilliermondii</i>	57
Figura 22. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilosa residual, al iniciar la fermentación con dos concentraciones iniciales de xilosa (60 y 70 g/L) y dos tipos de xilosa (comercial y extraída), en un periodo de 29 a 70 h de proceso.	59
Figura 23. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilosa, xilitol, etanol, glucosa, ácido acético y concentración celular durante un proceso de fermentación, por lote, de 70 horas, empleando una concentración inicial de 60 g/L de xilosa extraída de residuos hemicelulósicos de piña.....	60
Figura 24. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilosa, xilitol, etanol, glucosa, ácido acético y concentración celular durante un proceso de fermentación, por lote, de 70 horas, empleando una concentración inicial de 70 g/L de xilosa extraída de residuos hemicelulósicos de piña.....	61
Figura 25. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilosa al evaluar de dos tipos de xilosa durante tres tiempos de fermentación, independientemente de la concentración inicial de xilosa en el medio.....	62
Figura 26. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilitol producido, según el tipo de xilosa empleado en la fermentación a las 29, 50 y 70 horas e independientemente de la concentración de xilosa inicial en el medio.	63
Figura 27. Variación promedio (n=3) en la concentración etanol al evaluar dos concentraciones iniciales de xilosa a las 29, 50 y 70 horas de fermentación, independientemente del tipo de xilosa empleado.	67
Figura 28. Variación promedio (n=3) en la concentración de etanol para dos tipos de xilosa a las 29, 50 y 70 horas de fermentación, independientemente de la concentración inicial de xilosa en el medio.	68
Figura 29. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilosa, xilitol, etanol y concentración celular durante el proceso de fermentación, por lote, de 100 horas, utilizando una concentración inicial de 20 g/L de xilosa comercial.	83

- Figura 30. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilosa, xilitol, etanol y concentración celular durante el proceso de fermentación, por lote, de 100 horas, utilizando una concentración inicial de 40 g/L de xilosa comercial. 83
- Figura 31. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilosa, xilitol, etanol y concentración celular durante el proceso de fermentación, por lote, de 100 horas, utilizando una concentración inicial de 60 g/L de xilosa inicial comercial..... 84
- Figura 32. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilosa, xilitol, etanol y concentración celular durante el proceso de fermentación, por lote, de 100 horas, utilizando una concentración inicial de 70 g/L de xilosa comercial. 84
- Figura 33. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilosa, xilitol, etanol y concentración celular durante el proceso de fermentación, por lote, de 100 horas, utilizando una concentración de 100 g/L de xilosa comercial. 85

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I. Composición química de la cáscara de piña seca y molida, variedad MD2 (Ramírez <i>et al.</i> , 2012).....	7
Cuadro II. Edulcorantes bajos en calorías (OIA, 2012).	10
Cuadro III. Composición de hidrolizados hemicelulósicos concentrados obtenidos de diferentes materias primas. HMF= hidroximetilfurfural (Martínez <i>et al.</i> , 2002).....	19
Cuadro IV. Velocidad de crecimiento de la levadura <i>Candida guilliermondii</i> al variar la concentración inicial de la xilosa comercial, en la fase logarítmica del ciclo de vida, correspondiente al periodo entre las 0 y 22 horas del proceso de fermentación.....	41
Cuadro V. Velocidad promedio (n=3) de crecimiento de la levadura <i>Candida guilliermondii</i> al variar la concentración inicial y el tipo de la xilosa.....	58
Cuadro VI. Variación en los promedios*(n=3) de la concentración de xilosa, concentración de etanol, concentración de xilitol, concentración celular, rendimiento y productividad de xilitol durante una fermentación con la levadura <i>Candida guilliermondii</i> en un medio sintético.....	86
Cuadro VII. Valores F y cuadrado medio del error (CME) para determinar el efecto de la variación de la concentración de xilosa inicial en un medio de fermentación sintético, y del tiempo de proceso sobre el rendimiento de xilitol, la productividad de xilitol, concentración de xilosa, concentración de etanol, concentración de xilitol y concentración celular de la cepa <i>Candida guilliermondii</i>	88
Cuadro VIII. Comparación de los promedios de concentración de xilitol, rendimiento de xilitol y productividad de xilitol, mediante la prueba de Tukey, en el proceso de fermentación durante cuatro tiempos de muestreo (50, 70, 77 y 100 h), al variar la concentración inicial de xilosa en un medio de fermentación sintético.....	89

- Cuadro IX. Comparación de los promedios de concentración de xilitol, rendimiento de xilitol y productividad de xilitol, mediante la prueba de Tukey, al variar la concentración de xilosa inicial, para cada uno de los tiempos de muestreo (50, 70, 77 y 100 horas) realizados durante el proceso de fermentación sintético..... 89
- Cuadro X. Variación en los promedios*(n=3) de la concentración de xilosa, concentración de etanol, concentración de xilitol, concentración celular, concentración de glucosa, concentración de galactosa, concentración de ácido acético, rendimiento de xilitol y productividad de xilitol en una fermentación con la levadura *Candida guilliermondii* en un medio con hidrolizado de residuos hemicelulósicos de piña..... 90
- Cuadro XI. Valores F y cuadrado medio del error (CME) para determinar el efecto de la variación de la concentración y del tipo de xilosa inicial en cada uno de los tiempos evaluados sobre el rendimiento de xilitol, la productividad de xilitol, concentración de xilosa, concentración de etanol, concentración de xilitol y concentración celular de la cepa *Candida guilliermondii*..... 91
- Cuadro XII. Comparación de los promedios de la concentración celular, mediante la prueba de Tukey, al variar el tiempo del proceso de fermentación. 92
- Cuadro XIII. Comparación de los promedios de concentración de concentración celular, mediante la prueba de Tukey, al variar la el tipo de xilosa utilizada en el proceso de fermentación (comercial o extraída). 92

LISTA DE ABREVIATURAS

#: número	mm: milímetro
\$: dólar estadounidense	NAD ⁺ : nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
%: porcentaje	NADH: nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
<: menor que	NADP ⁺ : nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
>: mayor que	NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
°C: grados Celsius	O: oxígeno
µm: micrómetro	p: probabilidad
Acetil Co-A: acetil coenzima A	pH: grado de acidez
ADP: adenosín difosfato	rpm: revoluciones por minuto
ANDEVA: análisis de varianza	XDH: xilitol deshidrogenasa
ATP: adenosín trifosfato	XR: xilosa reductasa
a _w : actividad del agua	YPD: Yeast Peptone Dextrose (agar)
C: carbón	α: alfa
cal: caloría	β: beta
FAO: Food and Agricultural Organization	Δ: diferencia mínima deseada
g: gramos	
GRAS: Generally Recognized as Safe	
H: hidrógeno	
h: hora	
HPLC: high performance liquid chromatography	
J: julio	
JMAF: jarabe de maíz de alta fructosa	
L: litro	
log: logaritmo	
min: minuto	
mL: mililitro	

RESUMEN

El presente proyecto evaluó la producción de xilitol, a nivel de matraz, con xilosa comercial ($\geq 99\%$ de pureza) y con xilosa extraída de residuos de cáscara de piña, con el fin de buscar una alternativa de aprovechamiento de este material. El xilitol es un edulcorante natural considerado una de las alternativas más valiosas como sustituto de la sacarosa, al proporcionar igual dulzura que la sacarosa con un 40% menos de calorías. Además de ser considerado apto para diabéticos y destacar por su capacidad anticariogénica.

El microorganismo utilizado fue una cepa de levadura natural de la variedad *Candida guilliermondii* (ATCC número 201935). Se tomó como base la metodología utilizada por Arce (2004), Milanés (2007) y Solana (2011) en sus estudios relacionados con producción de xilitol, empleando una levadura genéticamente modificada.

Se estudió el consumo de xilosa y la producción de xilitol y otros metabolitos, específicos para la levadura seleccionada, mediante una curva de crecimiento a nivel de matraz de 125 mL. Se evaluaron cinco concentraciones de xilosa comercial en el medio de fermentación, para determinar las mejores condiciones para la producción de xilitol. Una vez seleccionados estos parámetros, se estudió la fermentación utilizando xilosa extraída de residuos lignocelulósicos de piña mediante un proceso de hidrólisis, como sustrato. Las variables respuesta de la evaluación del comportamiento cinético de la levadura fueron el rendimiento de producción de xilitol expresado como concentración de xilitol producido/concentración de xilosa consumida, productividad ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), la concentración de xilitol y de etanol producidos, la concentración de xilosa consumida y la población final de la cepa. Se determinó que el comienzo de la fase estacionaria de la levadura, a las 22 horas de proceso, coincide con el inicio en la producción de xilitol.

La mejor condición en la producción de xilitol al utilizar como sustrato la xilosa comercial, se presentó con una concentración inicial de 60 y 70 g/L de xilosa comercial con rendimientos del 66 y 67%, respectivamente. Asimismo, se determinó que la productividad de xilitol es mayor entre las 50 y 70 h de fermentación, con valores de 0,36 y 0,32 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente. Por esta razón, se decide evaluar estas concentraciones hasta las 70 h de fermentación con el sustrato de xilosa extraído de residuos de piña.

No se logró producir xilitol con la xilosa extraída de los residuos de piña con ninguna de las concentraciones evaluadas. Tampoco se evidenció un aumento en la población celular, el consumo de xilosa, glucosa y/o galactosa, ni la producción de otros metabolitos.

1. JUSTIFICACIÓN

Desde el año 2008, Costa Rica es el mayor exportador de piña en el mundo, circunstancia que aportó el 80% del total de importaciones de esta fruta realizadas por Estados Unidos (Roldán, 2008), equivalente a 654.656 toneladas de piña, la cual pasó a 820.009 toneladas en el 2011 (COMEX, 2012).

Asimismo, en el 2011 la Cámara Nacional de Productores y Exportadores de Piña (CANAPEP) reportó que el área cultivada de piña corresponde a 45.000 ha, en donde del total, 22.500 ha se ubican en la zona norte, 14.400 ha en el Caribe y 8.100 ha en la zona sur (Barquero, 2011). Incluso, Rodríguez (2012) señala que PROCOMER en un estudio denominado “Ampliando las relaciones comerciales con Europa: el caso Noruega”, menciona a la piña como un producto potencial para ser exportado a Noruega, lo cual mejoraría la oferta exportable costarricense.

Por otra parte, anualmente se generan y acumulan grandes cantidades de residuos vegetales y agroindustriales, lo cual provoca un serio problema de contaminación ambiental y pérdida de aprovechamiento como fuente potencial de valor agregado (Martínez *et al.*, 2002). En Costa Rica se producen 11.000 toneladas métricas de desechos al día, en donde el 30% corresponde a material orgánico (Vargas, 2010).

Para el caso específico de la piña, se estima que del total de la producción, un 75 a 80% cumple con los requisitos para ser exportado como fruta fresca, el resto (15 a 25%) se considera fruta de rechazo y es destinado al mercado nacional o a los procesos de industrialización (Montero & Cerdas, 2005). Tejeda *et al.* (2010) reportan que un 41% del fruto corresponde a cáscara y forma parte de un alto porcentaje de desecho agroindustrial.

Debido a lo anterior, actualmente se desarrollan diversos estudios para el aprovechamiento del desecho agroindustrial de la piña, tomando en cuenta que este tiene un alto contenido de fibra y compuestos tales como arabinosa, manosa, galactosa, glucosa y además xilosa en un 36% del total de azúcares (Larrauri *et al.*, 1997). Esta es una de las razones de interés por las cuales se ha venido trabajando en el estudio de producción de

xilitol a partir de xilosa extraída de residuos de piña en el Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA).

El xilitol se considera una de las alternativas más valiosas como sustituto natural del azúcar común (sacarosa), al proporcionar el 100% de la dulzura de la sacarosa con un 40% menos de calorías y un aporte calórico de 2,4 calorías por gramo (FDA, 2004). Ha despertado interés a nivel mundial por sus efectos beneficiosos asociados a la salud, tales como el uso seguro en diabéticos, la prevención de la otitis media aguda y la capacidad anticariogénica, siendo esta la característica de mayor auge en el mercado y vital en los países de tercer mundo, debido a la alta incidencia de caries en sus habitantes.

Este producto, se utiliza en las formulaciones de los alimentos para mejorar el color y el sabor, pues es estable durante la fabricación de los mismos. El mercado de aplicación en la industria alimentaria es muy amplio: puede combinarse con otros azúcares en productos como yogures, mermeladas, gelatinas, pudines, gomas de mascar, confites, mentas, chocolates, caramelos, leche condensada, salsa de tomate y otras salsas en general (Harris, 2003).

El proceso de producción de xilitol por vía fermentativa, se ha venido estudiando desde hace varios años en el CIPRONA. Según el estudio realizado por Arce (2004), a nivel de laboratorio en matraces de 125 mL y con la levadura modificada genéticamente denominada “Cepa X”, al variar la concentración inicial de la levadura, la proporción glucosa:xilosa (fuente de carbono) y el volumen de trabajo (aireación), se obtiene un 100% de rendimiento cuando la fermentación se realiza a 30°C, con agitación a 100 rpm, una concentración inicial de glucosa de 20 g/L y de xilosa de 10g/L, un nivel de aireación 1:5 (volumen de recipiente versus volumen del cultivo), y una concentración inicial del inóculo ya sea de $2,3 \times 10^5$ #cel/mL o de $1,5 \times 10^5$ #cel/mL.

Por su parte, Milanés (2007), tomando en cuenta el estudio realizado por Arce (2004) y empleando la misma cepa, evaluó el efecto de la adición de etanol y de distintos niveles de aireación sobre la producción de xilitol, a nivel de un bioreactor de 2,2 L con un volumen de trabajo de 1,5 L. El tratamiento que generó mayor rendimiento, de 0,93 g xilitol/g xilosa

inicial, se obtuvo empleando una velocidad de agitación de 250 rpm, sin adición de etanol y con 94 horas de fermentación. En este caso, pese a que el rendimiento en la producción de xilitol fue ligeramente menor al estudio previo en erlenmeyer de 125 mL, uno de los principales logros fue obtener un escalamiento del proceso 60 veces mayor que el realizado por Arce con resultados muy similares.

En el mismo trabajo, además se estudió el efecto de la aireación mediante el nivel de agitación en el medio de fermentación. Se determinó que la producción máxima de xilitol se produce con una agitación de 250 rpm para un volumen de trabajo de 1,5 L y utilizando la “Cepa X”, donde los máximos en producción de xilitol y de productividad se logran en valores intermedios de la tasa de aireación.

Solana (2011) también utilizó la cepa X, para diseñar un sistema de fermentación aireado con un volumen de 2 L, con el fin de producir xilitol de forma alternativa y comparar los resultados obtenidos previamente al utilizar un bioreactor de 2 L. Previo al escalamiento, se evaluaron varias concentraciones de xilosa inicial en el medio y se seleccionó una concentración de 22,08 g/L, por ser una de las condiciones con más alto rendimiento, con mayor concentración de xilitol final en el medio y que implicaba menor gasto de reactivos; pues posteriormente se requería del xilitol obtenido para evaluar operaciones de purificación.

Se debe destacar que Arce (2004), Milanés (2007) y Solana (2011), en sus trabajos, realizaron fermentaciones con un microorganismo genéticamente modificado, denominado “Cepa X”, el cual no cuenta con la enzima xilitol deshidrogenasa (XDH) responsable de transformar el xilitol en xilulosa. En estos casos, se enfatizó la ventaja de obtener altos rendimientos en la producción de xilitol, debido a que este compuesto se acumula durante el proceso de fermentación, contrario a lo que sucede cuando se emplean cepas naturales como *Candida guilliermondii*.

Sin embargo, los alimentos producidos a partir de organismos genéticamente modificados, son los más cuestionados en la historia de la tecnología de alimentos. Se hace referencia a un aumento de alergias, a peligros de aparición de resistencia a antibióticos,

generación de cáncer o retardos en el desarrollo inmunitario asociado con la posible transferencia de los genes transgénicos a alguna bacteria de la flora intestinal del humano (Vidal, 2010). No hay pruebas ni datos experimentales que apoyen estas dudas, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) afirma que dichos alimentos no deberían constituir ningún riesgo. Pero existe una realidad incuestionable en cuanto al rechazo social por este tipo de alimentos, que limita el desarrollo de este mercado, condición que genera un problema económico mundial (Vidal, 2010). Por este motivo, se decidió establecer nuevas condiciones de producción de xilitol con una levadura natural.

La producción de xilitol a partir de residuos de piña, consiste en un proceso biotecnológico donde se emplea la levadura natural *Candida guilliermondii*, en busca de un mayor aprovechamiento de los desechos, contribuyendo a solucionar problemas de contaminación y pérdida económica en el país, debido a la poca utilización del potencial del desecho de piña. Además, se fomenta el desarrollo sostenible de la región, racionalidad en el manejo de subproductos y, en general, se aporta conocimiento y tecnología para el sector agro-alimentario (Herazo *et al.*, 2007).

En el transcurso del presente trabajo, fue necesario estudiar la cinética de fermentación de la cepa *Candida guilliermondii*, ya que en su metabolismo, a diferencia del que presenta la “Cepa X” utilizada por Arce (2004), Milanés (2007) y Solana (2011), el xilitol se considera un intermediario en la conversión de la xilosa a xilulosa (Parajó *et al.*, 1998). Por este motivo fue importante determinar el pico máximo de producción de xilitol con el fin de detener el proceso de fermentación y no afectar el rendimiento de producción del edulcorante.

Además, se evaluó, a nivel de laboratorio en matraces de 125 mL, el efecto de la concentración de xilosa comercial y de xilosa extraída del residuo de cáscara de piña, sobre el rendimiento de xilitol producido, con el fin de establecer las mejores condiciones para maximizar la producción de xilitol.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar la producción de xilitol por fermentación, con la cepa *Candida guilliermondii* a partir de xilosa comercial y xilosa obtenida de residuos sólidos de cáscara de piña.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar fermentaciones con la cepa *Candida guilliermondii* en un medio sintético con xilosa comercial, con el fin de evaluar el comportamiento cinético de la levadura, el consumo de xilosa y producción de metabolitos.
- Evaluar la capacidad de producción de xilitol de la cepa *Candida guilliermondii* al variar la concentración inicial de xilosa comercial a nivel de laboratorio, en matraces de 125 mL.
- Evaluar la producción de xilitol de la cepa *Candida guilliermondii* utilizando xilosa extraída de los residuos de piña a nivel de laboratorio, en matraces de 125 mL.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Producción de piña en Costa Rica

La producción y la exportación de piña en Costa Rica toman importancia como un negocio lucrativo en las dos últimas décadas, que induce la expansión del área piñera. La Cámara Nacional de Productores y Exportadores de Piña (CANAPEP), estima que en el año 2011 había 1.300 productores de la fruta; de estos, 1.250 se consideran pequeños y otros 50 como medianos y grandes, donde los productores industriales del sector trabajan la piña principalmente para la elaboración de concentrados y jugos (Barquero, 2011).

Incluso, en el 2012, la piña se ubicó en primer lugar en la lista de productos agrícolas de exportación y se reportó un incremento en el primer semestre en un 5% respecto al mismo período en el 2011, según datos presentados por el Ministerio de Comercio Exterior (COMEX) y la Promotora de Comercio Exterior (PROCOMER) (Granados, 2012).

A nivel nacional, la piña se consume en su mayoría como fruta fresca; sin embargo, en el comercio mundial como ya se mencionó, predominan los productos procesados que generan desechos correspondientes a la cáscara, el corazón y/o sólidos centrifugados, que a su vez causan problemas ambientales. La cantidad de estos varía de manera importante en función del proceso de transformación al que se someta el fruto (Ramírez *et al.*, 2012).

Actualmente, se ha despertado el interés por darle un valor agregado a los residuos lignocelulósicos de piña, los cuales están constituidos por celulosa, hemicelulosa y lignina, además de un pequeño porcentaje de arabinosa, glucosa y manosa (Huerta *et al.*, 2005). Asimismo, se considera un sustrato adecuado para la producción de xilosa por presentar alto contenido de xilano, como se muestra en el Cuadro I, y de ahí el énfasis en su posible uso como fuente para la extracción de carbohidratos.

Cuadro I. Composición química de la cáscara de piña seca y molida, variedad MD2 (Ramírez *et al.*, 2012).

Análisis	Concentración (% m/m)
Glucosa*	3
Xilosa*	27
Xilano	28
Lignina	9
Celulosa	41
Hemicelulosa	24

*Determinadas posterior a un proceso de hidrólisis con H₂SO₄ al 6 % a 98°C por 83 min.

3.2. Carbohidratos

Los carbohidratos son compuestos orgánicos que se encuentran en mayor cantidad y son los más ampliamente distribuidos en la naturaleza. Son componentes importantes de todos los organismos vivos, donde desempeñan varias funciones; algunos son componentes estructurales de las células y otros tienen un papel de reconocimiento en la superficie celular (Belitz & Grosch, 1997).

Se dividen en monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Los monosacáridos son polihidroxialdehídos o polihidroxicetonas, que no poseen cadenas ramificadas. Los más abundantes son aquellos que poseen cinco o seis carbonos (pentosas y hexosas, respectivamente); incluyendo a la glucosa, fructosa y galactosa. Los oligosacáridos están constituidos por monosacáridos con pérdida de una molécula de agua, grupo en el que se encuentran disacáridos como la sacarosa, maltosa y lactosa; trisacáridos como la rafinosa y tetrasacáridos como la estaquiosa. Los polisacáridos, son compuestos de alto peso molecular, formados por monosacáridos unidos entre sí por enlaces glicosídicos, son mucho más difíciles de disolver en agua que los mono y oligosacáridos; un ejemplo es el almidón, siendo este el principal polisacárido encontrado en los alimentos (Belitz & Grosch, 1997).

Además de ser fuente de energía para los seres vivos, los carbohidratos cumplen una serie de funciones como edulcorantes, gelificantes, estabilizadores y precursores de compuestos con aroma o color que se forman en los alimentos a partir de ellos a través de una serie de reacciones químicas (Belitz & Grosch, 1997).

3.2.1. Carbohidratos como fuente de energía

Los carbohidratos también denominados como “sacáridos” y/o “azúcares”, son un grupo de nutrientes básicos, que siempre tendrán relevancia en la alimentación; se consideran el centro del metabolismo, al constituir la mayor fuente energética para los organismos vivos, desde las bacterias y microorganismos en general hasta el ser humano (Fornaguera & Gómez, 2007).

A nivel microbiano y en un proceso de fermentación con levaduras del género *Candida*, se considera al monosacárido D-xilosa como una fuente de carbono que proporciona la suficiente energía para el crecimiento y el metabolismo. Los microorganismos pueden diferir en la velocidad de la utilización de los azúcares si hay más de uno presente en el medio; por ejemplo, *Candida* spp. y *Saccharomyces cerevisiae* consumen primero hexosas tales como D-glucosa, D-galactosa y D-fructosa, antes que pentosas como D-xilosa.

3.2.2 Carbohidratos como edulcorantes

Los monosacáridos, los oligosacáridos y los polioles correspondientes, con pocas excepciones, poseen un sabor dulce. Los azúcares pueden diferenciarse entre ellos según la intensidad del sabor dulce que imparten. Como edulcorantes más conocidos destacan la sacarosa, los jarabes de almidón (mezcla de glucosa, maltosa y maltooligosacáridos) y la glucosa. Además, no con menor importancia, se encuentran jarabes de glucosa ricos en fructosa, la fructosa, la lactosa y los alcoholes sorbitol, manitol y xilitol (Belitz & Grosch, 1997).

Los polioles son alcoholes polihídricos con varios grupos hidroxilo. Son también denominados alcoholes de carbohidratos y, demuestran un fuerte crecimiento en los últimos

años, en cuanto a su consumo y aplicación en fórmulas de alimentos, al ser considerados como los edulcorantes naturales más bajos en calorías, comparados con el azúcar común (sacarosa).

El xilitol se clasifica como un edulcorante no calórico, natural, de baja potencia (poder endulzante de un edulcorante en relación al mostrado por una misma cantidad de sacarosa). A continuación en la Figura 1 se presentan las principales categorías y los tipos de edulcorantes (OIA, 2012):

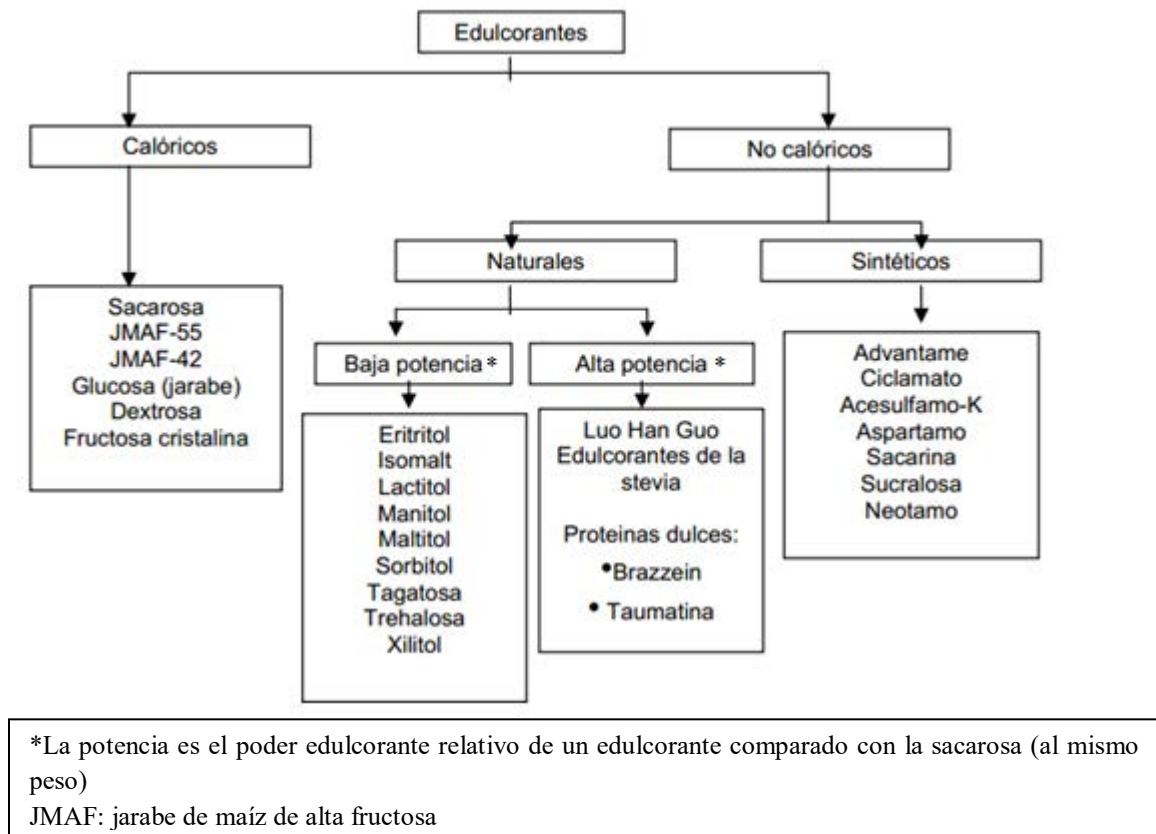


Figura 1. Principales categorías y tipos de edulcorantes (OIA, 2012).

En el Cuadro II se detalla el valor calórico y el dulzor de otros edulcorantes que también son considerados bajos en calorías con relación al azúcar (OIA, 2012). Se puede

observar que el xilitol, se encuentra en el grupo de edulcorantes bajos en calorías, con un valor calórico de 60 % y un dulzor de 100% en relación a la sacarosa.

Cuadro II. Edulcorantes bajos en calorías (OIA, 2012).

Edulcorante bajo en calorías	Valor calórico (calorías*/gramo)	Valor calórico en relación a la sacarosa (%)	Dulzor en relación a la sacarosa (%)
Poliolos			
Eritritol ⁺	0,2	5	70-80
Isomaltol	2,0	50	45-65
Lactitol	2,0-2,4	50-60	40
Maltitol	2,1	52	90
Manitol	1,6	40	50
Sorbitol	2,4-2,6	60-65	60
Xilitol	2,4	60	100
Otros			
Tagatosa	1,5	38	90-100
Trehalosa	3,6	90	50

*1 caloría= 4,2 kilojulios, +comercializado como no calórico por los principales fabricantes.

3.3. La xilosa como fuente de carbono en procesos fermentativos

La xilosa, cuya estructura química se muestra en la Figura 2 es un monosacárido, polihidroxialdehído y pentosa utilizada ampliamente como fuente de carbono en procesos de producción comercial. Es un azúcar abundante en las plantas y es la unidad estructural mayoritaria en la hemicelulosa. Puede obtenerse a través de dos vías: la primera por extracción sólido-líquido de las frutas y vegetales, y la segunda por hidrólisis de la fracción hemicelulósica de los materiales lignocelulósicos en monosacáridos (Canilha *et al.*, 2007).

Es de color blanco, de apariencia cristalina e inodora; su fórmula química es $C_5H_{10}O_5$, con un peso molecular de 150,13 g/mol, siendo soluble en agua hasta un valor de 446 g/L a 20 °C. Sus puntos de fusión y de ebullición son de 90,5 y 216 °C, respectivamente (Montañes *et al.*, 2009; Galárraga, 2010).

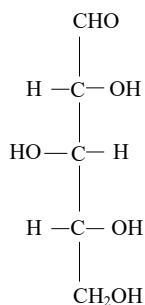


Figura 2. Estructura química de la D-xilosa (Belitz & Grosch, 1997).

3.3.1. Obtención de la xilosa por hidrólisis química

La obtención de monosacáridos, entre los que se encuentra la xilosa, a partir de la hidrólisis de cáscaras de piña, se basa en un proceso gradual donde primero se degradan las cadenas de polímeros en oligosacáridos por procesos de hidrólisis de la hemicelulosa. Varios autores reportan alrededor de un 80-85% de D-xilosa bajo diferentes condiciones de hidrólisis (Nigam & Singh, 1995; Ramírez *et al.*, 2012).

Para depolimerizar la hemicelulosa a escala industrial, generalmente se emplea ácido sulfúrico o clorhídrico diluido, a presiones mayores de una atmósfera y a temperaturas entre 120 y 200 °C. La fracción sólida está mayoritariamente compuesta por celulosa y lignina, mientras que la líquida se asemeja a un jarabe, producto de la despolimerización del xilano presente en la hemicelulosa (Romero, 2003).

En Costa Rica, el Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA) está desarrollando estudios de obtención de xilosa a partir de cáscaras de piña, mediante los métodos señalados. Asimismo, Ramírez *et al.* (2012), trabajaron en la obtención de xilosa a partir de desechos lignocelulósicos del procesamiento industrial de la piña. La metodología utilizada, se basó en la caracterización física y química del sustrato, luego se procedió a una hidrólisis de la cáscara de piña pretratada con ácido diluido y se evaluaron los parámetros de hidrólisis al variar la concentración de ácido sulfúrico de 2 a 6% y el tiempo de reacción de 0 a 350 minutos con temperaturas de 98 °C. Se determinó que las condiciones óptimas para la hidrólisis corresponden al empleo de una solución de ácido sulfúrico al 6% a 98°C

por 83 min con un rendimiento de 26,9 g de xilosa/L, 2,61 g de glucosa/L, 7,71 g ácido acético/L y 0,29 g furfural/L.

3.4. Características físicas y químicas del xilitol

El xilitol, cuya estructura química se muestra en la Figura 3, es un monosacárido, polihidroxicetona y alcohol pentahidroxilado (pentiol), cuya fórmula química es $C_5H_{12}O_5$, con un peso molecular de 152,15g/mol y un punto de fusión y ebullición 93,5 y 216 °C, respectivamente (Galárraga, 2010). Según González *et al.* (2011) tiene una apariencia sólida, blanca y cristalina, puede ser producido a partir de la xilosa, mediante métodos biotecnológicos.

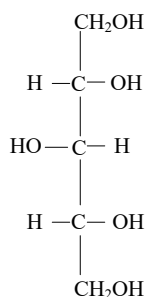


Figura 3. Estructura química del D-xilitol (González *et al.*, 2011).

Este compuesto es un sustituto natural del azúcar común (sacarosa) y su uso está aceptado en más de 28 países, por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se ha valorado y reconocido como un aditivo GRAS “Generally Regarded As Safe” por la FDA (Food and Drug Administration) desde 1960.

3.5. Propiedades del xilitol de interés comercial

Uso seguro en diabéticos

El xilitol es un edulcorante que ha despertado interés por su uso seguro en diabéticos y personas deficientes en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, ya que el

metabolismo de este azúcar no está regulado por la insulina, a diferencia de la sacarosa (Vanegas *et al.*, 2004).

Capacidad anticariogénica

Según González *et al.* (2011), los efectos benéficos del xilitol en cuanto a la prevención de caries dentales fueron reportados en Finlandia. Al no ser metabolizado por la bacteria *Streptococcus mutans* (microorganismo de la flora bucal), evita la formación de ácidos que atacan el esmalte dental, promueve la remineralización del esmalte de los dientes, mediante el aumento de los iones calcio y fosfato, revertiendo las lesiones ya formadas (Martínez *et al.*, 2002).

Uso clínico

El xilitol es usado en el área clínica, por su fácil asimilación en infusiones posquirugía para pacientes con dificultad de metabolizar la sacarosa. Se habla de que mejora las propiedades bioquímicas de los huesos en casos de osteoporosis (Carvalho *et al.*, 2003), y también es recomendado para la prevención de la otitis media aguda, al ser capaz de reducir el crecimiento del neumococo; para este efecto se suministra en forma de goma de mascar a niños de 2 a 5 años (Vanegas *et al.*, 2004).

Efecto refrescante

Al consumir xilitol, se produce un efecto refrescante en la boca, pues tan sólo una concentración de un 10% en un alimento, es capaz de reducir 3 °C la temperatura de sustancias acuosas. Además, para disolver 1g del edulcorante se necesitan 153,0 J, la cual es una cantidad mayor a la que presentan todos los azúcares conocidos (sacarosa, dextrosa, sorbitol). Estas características se tornan vitales para la industria confitera, en especial para aquellas cuyo propósito es la sustitución del azúcar común en la elaboración de sus productos. También es utilizado para realzar sabores tales como menta, limón y frutas (Emodi, 1978; Hollingsworth, 2002).

Estabilidad en procesos alimentarios

El xilitol se utiliza en las formulaciones de los alimentos para mejorar el color y el sabor, pues es estable durante la fabricación de los mismos; no se fermenta, no es susceptible al pardeamiento de Maillard, no carameliza y sólo se observa el desarrollo de un color amarillento cuando es calentado a más de 150 °C. Por esta razón, puede combinarse con otros azúcares en productos como yogures, mermeladas, gelatinas, pudines, gomas de mascar, confites, mentas, chocolates, caramelos, leche condensada, salsa de tomate y otras salsas en general (Emodi, 1978; Hyvönen *et al.*, 1982).

3.6. Producción de xilitol

En Costa Rica no se produce xilitol y los registros de la Promotora de Comercio Exterior de Costa Rica (PROCOMER) no revelan datos exactos de exportación o importación de xilitol como tal; sin embargo, existe un rubro denominado “*los demás azúcares, incluido el azúcar invertido y la maltosa químicamente pura, en estado sólido, los demás azúcares y jarabes de azúcar con un contenido de fructosa, sobre producto seco, de 50% en peso, sin adición de aromatizante ni colorante, los sucedáneos de la miel, incluidos los mezclados con miel natural, azúcar y melaza caramelizados (exceptuando el azúcar de caña o de remolacha, sacarosa químicamente pura, lactosa, azúcar de arce, glucosa y fructosa, así como sus jarabes)*” donde se reportan \$1.575.000 en exportaciones de dichos productos principalmente a la Unión Europea (\$1.076.000), contra \$2.880.000 en importaciones principalmente de América del Norte (\$2.709.000) en el año 2011 (COMEX, 2012).

Según la Organización Internacional del Azúcar (OIA), el consumo global de polioles (sorbitol, manitol, lactitol, maltitol, isomaltol y xilitol), como sustitutos del azúcar, es difícil de determinar por el poco acceso público que se tiene a los datos (OIA, 2012). Sin embargo, el *International Starch Institute* estima que la producción mundial de xilitol es de 200.000 toneladas. El principal proveedor del edulcorante es la empresa Danisco, bajo la marca XIVIA, cuyo uso en alimentación está autorizado en más de 50 países. Varios

fabricantes tienen sedes en Europa y Estados Unidos y también hay productores importantes en Indonesia y China.

Comúnmente, a nivel mundial, el xilitol se obtiene por procesos químicos a partir de xilosa comercial o por reducción de hidrolizados de hemicelulosa de residuos lignocelulósicos. Sin embargo, se reportan altos costos de producción, rendimientos de 50 a 60% y la aparición de impurezas que dificultan su purificación y cristalización. Por ello, su producción utilizando procesos biotecnológicos, mediante el uso de levaduras, se considera una alternativa viable al ser específica y requerir poca energía (Musatto & Roberto, 2008).

Para la obtención del xilitol mediante fermentación, suelen emplearse levaduras como *Pichia stipitis* (Skoog & Hahn-Hägerdal, 1990), *Debaryomyces hansenii* (Parajó *et al.*, 1997), *Candida sheatae* (Hinfray *et al.*, 1995), *Candida guilliermondii*, *Candida millerri* y *Candida tropicalis*, donde los rendimientos de producto final oscilan entre el 75 y el 76% (Gränstrom, 2002).

3.6.1. Etapas de producción biotecnológica de xilitol con la levadura *Candida guilliermondii*

La producción biotecnológica de xilitol con levaduras como *Candida guilliermondii*, consiste en fermentaciones realizadas en ambientes limitados de oxígeno, en los cuales se mantiene un balance parcial redox en las primeras etapas del metabolismo de la xilosa. Cuando el suministro de oxígeno es bajo, la tasa de consumo se reduce y la levadura se vuelve incapaz de regenerar el NAD^+ del NADH producido, de modo que las cantidades de NADH intracelular aumentan y reducen la actividad enzimática de la xilitol deshidrogenasa, acumulándose el xilitol en el medio. De este modo, el oxígeno es importante para el crecimiento celular, la activación de las funciones mitocondriales y la generación de energía para el transporte de xilosa (Musatto & Roberto, 2003).

Sin embargo, el xilitol no es un producto final, sino el intermediario para la formación de xilulosa, por acción de la enzima xilitol deshidrogenasa (XDH) dependiente de NAD^+ , la cual elimina el hidrógeno beta, transformando el polialcohol en una cetosa

(Macías, 2009). Debido a lo anterior, el rendimiento en la producción de xilitol, utilizando levaduras como *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis*, en ocasiones tiende a ser bajo debido al uso de la xilosa para el crecimiento y metabolismo endógeno y a una posible pérdida del xilitol por metabolismo celular. Como ya se mencionó, las levaduras transforman el xilitol hasta xilulosa, la cual puede ser fosforilada por la xilulosa quinasa y entrar en la vía de las pentosa fosfato como xilulosa-5-fosfato, principal fuente de NADPH. A partir de esta etapa se obtiene la fructosa 6-fosfato y el gliceraldehído 3-fosfato, los cuales son metabolizados para producir moléculas de piruvato a través del proceso de la glucólisis. Dependiendo de la disponibilidad de oxígeno, el piruvato puede ser fuente para la producción de dióxido de carbono por la fosforilación oxidativa, o transformado a etanol por la piruvato descarboxilasa y la etanol deshidrogenasa (Hallborn *et al.*, 1994). Los pasos metabólicos y de regeneración de cofactores en la conversión de la xilosa, se muestran en la Figura 4.

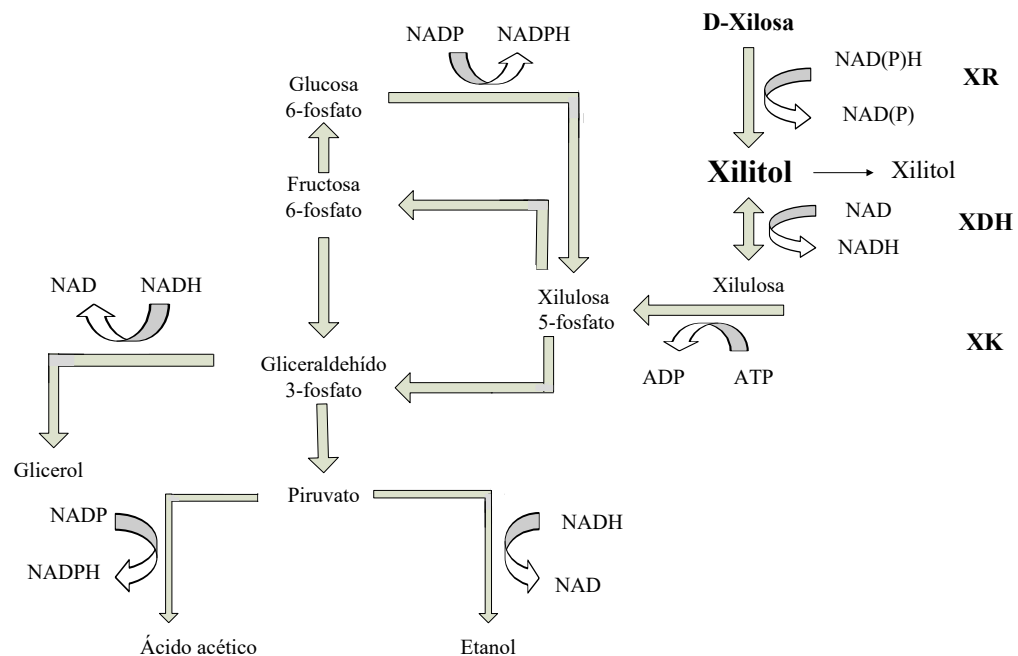


Figura 4. Metabolismo simplificado de las levaduras en la conversión de la xilosa en xilitol y otros metabolitos (Granström *et al.*, 2007).

XR= xilosa reductasa, XDH= xilitol deshidrogenasa, XL= xilulosa quinasa.

3.6.2. Factores que afectan la producción biotecnológica de xilitol

La posibilidad de convertir desechos agroindustriales en xilitol, se encuentra limitada por el proceso de degradación de la hemicelulosa en sus componentes. Más aún, al utilizar microorganismos como *Candida* sp., se requiere controlar una serie de parámetros físicos donde la temperatura y la agitación son las variables de mayor importancia, seguidas por la concentración de xilosa (Macías, 2009), siendo esta última junto con la pureza de la xilosa, los parámetros evaluados en el presente estudio.

3.6.2.1. Concentración de xilosa inicial

La concentración inicial de la xilosa es un factor muy importante por considerar respecto a la viabilidad económica que puede tener el proceso; pocos estudios son los que reportan el uso de concentraciones altas de xilosa a partir de un hidrolizado lignocelulósico. No necesariamente el trabajar con la concentración más alta de xilosa dará la mayor producción de xilitol, debido a la diferente capacidad que tienen las levaduras para lograr la bioconversión y a la posible presencia de altos niveles de sustancias tóxicas en los hidrolizados tales como furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético y derivados de lignina, que afectan el desarrollo y crecimiento del microorganismo por inhibición de su metabolismo (Mussatto & Roberto, 2008).

En este estudio, Mussatto & Roberto (2008) consideran mejor trabajar con una concentración inicial de 80 g/L de xilosa, ya que concentraciones mayores tienen un efecto de inhibición asociado a una mayor cantidad de sustancias tóxicas proporcional a la concentración de xilosa, y valores muy bajos resultan en rendimientos bajos, pues la fuente de carbono se utiliza para crecimiento celular.

3.6.2.2. Fuente de obtención de la xilosa y pureza del sustrato

La xilosa utilizada para la producción de xilitol a escala industrial, se obtiene por reducción química del xilano presente en pulpa de madera para producción de papel, otros tipos de maderas duras, vainas de flores de algodón o bagazo de caña (Segura & Navarrete, 2012).

Existe una serie de investigaciones que han estudiado la producción biotecnológica de xilitol a partir de materiales lignocelulósicos, como la realizada por Martínez *et al.* (2002) con bagazo de caña de azúcar, paja de trigo, paja de arroz y madera de eucalipto, utilizando la levadura *Candida guilliermondii* FT 20037. Los rendimientos al utilizar uno u otro sustrato varían debido a la capacidad de bioconversión de la levadura en diferentes sustratos. La mayor productividad se obtuvo con el hidrolizado del bagazo de caña de azúcar ($0,50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) seguida por los tratamientos con paja de arroz ($0,35 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), con eucalipto ($0,34 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) y paja de trigo ($0,24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$).

Al trabajar con diferentes fuentes de xilosa, se analiza principalmente el efecto de las características del hidrolizado sobre parámetros fermentativos que influyen en el desempeño de la levadura y la producción de xilitol. A su vez, la posibilidad de convertir desechos agroindustriales en xilitol, se encuentra limitada por el proceso de degradación de la hemicelulosa en sus componentes. Más aún, al utilizar microorganismos como *Candida* sp., se requiere controlar una serie de parámetros físicos donde la temperatura y la agitación son variables de mayor importancia, seguidas por la concentración de xilosa (Macías, 2009), siendo esta última junto con el tipo de fuente de la xilosa, los parámetros evaluados en el presente estudio.

En el Cuadro III se muestra la composición de los diferentes hidrolizados evaluados por Martínez *et al.* (2002), entre los que destaca la cantidad de azúcar en el medio y la presencia de compuestos tales como arabinosa, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural, estos últimos considerados inhibidores que afectan el metabolismo de la levadura.

El ácido acético es el componente de inhibición que se encuentra en mayor cantidad en los jarabes de hidrolizados de hemicelulosa, originándose a partir de los grupos acetilos del xilano, junto con otros inhibidores asociados a la degradación de la lignina (furfural, hidroximetilfurfural y compuestos fenólicos). El efecto tóxico del ácido acético se basa en su capacidad de solubilizar los lípidos de la membrana, al interferir químicamente en el

transporte de fosfato y consecuentemente en el crecimiento de las células (Rodrigues *et al.*, 2003).

Cuadro III. Composición de hidrolizados hemicelulósicos concentrados obtenidos de diferentes materias primas. HMF= hidroximetilfurfural (Martínez *et al.*, 2002).

Materia prima	Xilosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Arabinosa (g/L)	Ácido acético (g/L)	Furfural (g/L)	HMF (g/L)
Bagazo de caña	99,80	7,84	11,14	5,03	0,014	0,06
Paja de arroz	103,90	25,62	27,23	1,07	0,103	0,47
Eucalipto	97,38	10,27	5,61	6,86	0,044	0,29
Paja de trigo	98,00	34,23	18,44	1,61	0,089	0,11

Los compuestos tóxicos mencionados anteriormente no intervienen en el desarrollo de una fermentación cuando se trabaja con xilosa cristalina con una pureza $\geq 99\%$, de grado reactivo (SIGMA-ALDRICH[®], EUA), la cual se extrae por procesos biológicos de árboles tales como el abedul, el haya o el arce y que adicionalmente se somete a etapas de purificación hasta alcanzar el grado de pureza especificado (SIGMA-ALDRICH, 2013).

Es esta la principal diferencia entre el rendimiento de producción de xilitol cuando se utiliza como sustrato una xilosa comercial pura en forma cristalina, respecto a una xilosa presente en jarabes no purificados, obtenida por hidrólisis química de residuos hemicelulósicos. Por tanto, por lo general, se espera que la levadura tenga un mejor desempeño al emplear un sustrato puro, que no contiene compuestos inhibidores de la fermentación.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización del estudio

El desarrollo experimental de la investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) de la Ciudad Universitaria Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica (UCR) y en el Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot) ubicado en el edificio Franklin Chang Díaz, en Pavas.

4.2. Materiales

4.2.1 Microorganismo

Se utilizó una cepa comercial de *Candida guilliermondii* FTI 20037, productora de xilitol, adquirida de la colección de levaduras de la American Type Culture Collection (ATCC número 201935).

4.2.2 Medios de cultivo

4.2.2.1 Medio de mantenimiento de la cepa

La cepa original de *Candida guilliermondii* se mantuvo en un criovial a -80°C , en el Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular (CIBCM), en un medio de glicerol al 100% estéril en una concentración de 15% (v/v) para protegerla del daño celular.

El mantenimiento de la cepa se realizó con la colaboración del personal del CIBCM. La levadura, se reconstituyó y se mantuvo a 4°C en agar inclinado o en placa, como se muestra en la Figura 5, en un medio YPD, cuya composición es la siguiente: extracto de levadura 10,0 g, Bacto-peptona 20,0 g, glucosa 20,0 g, Bacto-agar 20,0 g, agua destilada 1,0 L. Se realizó una resiembra y una vez al mes se verificó su pureza mediante una prueba de tinción de Gram (Arguedas, 2011).

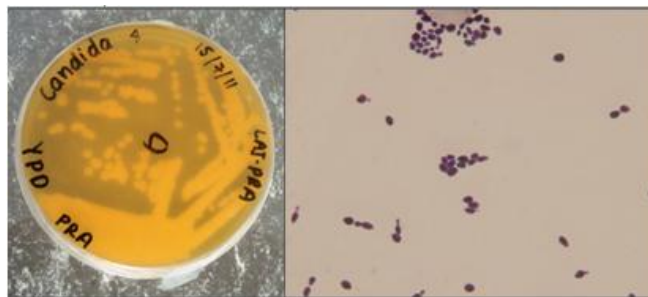


Figura 5. Cepa *Candida guilliermondii* en placa con agar YPD y prueba de tinción de Gram realizada a la misma, vista con el lente 100X al microscopio.

4.2.2.2 Medio para la propagación de la cepa *Candida guilliermondii*

Para obtener aproximadamente 150 mL de inóculo, la cepa se propagó en dos matraces de 2 L con 800 mL de volumen de medio y un erlenmeyer de 1 L con 400 mL de volumen de medio, compuestos por disolución de extracto de arroz al 10% (v/v) y disolución de azúcares y minerales (20,0 g/L de xilosa, 10,0 g/L de glucosa, 2,0 g/L de sulfato de amonio, 0,1 g/L de cloruro de calcio, 20%v/v de extracto de paja de arroz). La reconstitución se realizó manteniendo el erlenmeyer a 30 °C por 24 h, en un agitador orbital a una velocidad de 200 rpm (Mussatto & Roberto, 2008).

Para la preparación del extracto (Figura 6), se pesó una cantidad de granza de arroz para hacer una disolución al 10% (m/v) del componente con agua destilada. La mezcla se esterilizó por 20 min a 121 °C. Posteriormente se trasvasó a tubos de centrifuga estériles (autoclavados 120 °C, 17 psi, 20 min), y se enfrió a temperatura ambiente para proceder a centrifugar el extracto por 10 min a 3500 rpm. Por último, en una cámara de flujo laminar, se decantó y trasvasó el líquido a matraces estériles de 500 mL (Mussatto & Roberto, 2008).



Figura 6. Preparación del medio para propagar la cepa *Candida guilliermondii*.

4.3. Metodología para procesos de fermentación

4.3.1 Cinética de fermentación de *Candida guilliermondii* con xilosa comercial como sustrato

Se estudió de forma descriptiva, a nivel de laboratorio y con xilosa comercial pura ($\geq 99\%$ de pureza, SIGMA-ALDRICH[®], EUA), la cinética de fermentación de la cepa *Candida guilliermondii*, a través de su curva de crecimiento, para observar su comportamiento en el medio de cultivo de fermentación y analizar el consumo y producción de metabolitos, tales como xilosa, xilitol y etanol.

Esta parte resulta vital para identificar las fases de crecimiento para así poder determinar el momento en el que se presenta la mayor producción de xilitol previo a la transformación de dicho compuesto a xilulosa.

La curva de crecimiento se realizó con 60 g/L de xilosa inicial, debido a que es un valor intermedio de las concentraciones iniciales de sustrato a evaluar y además la literatura reporta circunstancias óptimas cuando se trabaja con dicha condición (Branco *et al.*, 2006; Arruda & Felipe, 2008; Canilha *et al.*, 2008; Mussatto & Roberto, 2008). A continuación se describe cómo se analizó la cinética de fermentación con 60 g/L de xilosa inicial en el medio.

4.3.1.1 Preparación del inóculo

Las levaduras, se propagaron según lo establecido en la sección 4.2.2.2, posteriormente se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 min y se resuspendieron en agua destilada estéril hasta alcanzar una absorbancia de 0,5 lo cual corresponde a una concentración inicial de 0,5 g/L, equivalente a 5×10^9 #cel/mL totales de acuerdo con la curva calibración del microorganismo realizada en pruebas preliminares. La metodología de determinación de la concentración celular se describe en la sección 4.3.4.1 (Martínez *et al.*, 2002).

4.3.1.2 Equipo de fermentación

Las fermentaciones a nivel de laboratorio se realizaron en un agitador orbital modelo 721 (HOTECH, Taiwán), con una velocidad fija de 200 rpm. La temperatura interna se mantuvo a 30 °C mediante un sistema de calentamiento por resistencias y aire caliente. Los recipientes utilizados, para contener el caldo de fermentación, fueron matraces de 125 mL de capacidad con tapones de algodón y manta. El equipo de fermentación se muestra en la Figura 7.

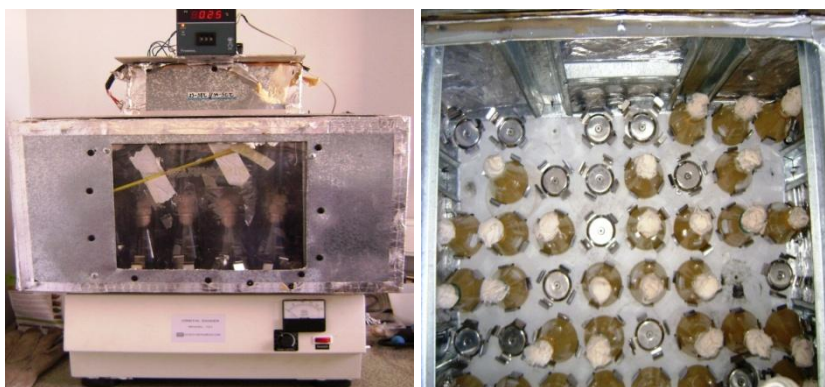


Figura 7. Equipo de fermentación: vista frontal e interior del agitador orbital con matraces de 125 mL.

4.3.1.3 Curva de crecimiento del microorganismo

Para establecer los parámetros de fermentación se preparó una curva de crecimiento del microorganismo cultivado en matraces de 125 mL, tapados con algodón y manta, con 50 mL de volumen de trabajo. El medio de fermentación se compuso de 60 g/L D-xilosa, 0,1 g/L de cloruro de calcio, 2,0 g/L de sulfato de amonio, extracto de granza de arroz al 20%v/v y 10^8 #cel/mL de la cepa, la cual se preparó como se describe en el apartado 4.3.1.1. El tiempo de fermentación fue de 100 horas a 30 °C, con una agitación de 200 rpm (Mussatto & Roberto, 2003; Villalba *et al.*, 2009).

4.3.1.4 Toma de muestra y tiempo de muestreo

Para cada toma de muestra se extrajeron tres matraces, según lo recomendado por Arce (2004), para obtener tres repeticiones de cada punto, las cuales se analizaron y desecharon con el fin de evitar la contaminación y pérdida de volumen durante la fermentación. El número total de muestras analizadas corresponde al número total de matraces, para un total de 48, con los tiempos de muestreo a las 0, 2, 5, 12, 18, 22, 29, 39, 46, 50, 61, 70, 77, 85, 95 y 100 horas de fermentación, fijados en horas hábiles para poder muestrear en el horario de trabajo del CIPRONA.

Una parte de la muestra se centrifugó a 1200 rpm durante 15 minutos, el líquido sobrenadante se microfiltró (membrana de 0,45 μm) y se congeló a -10°C para el posterior análisis de concentración de xilosa, xilitol y etanol, tal y como se explica en la sección 4.3.4.2; mientras que la otra parte de la muestra extraída (no centrifugada) se utilizó para la determinar la concentración celular, tal y como se detalla en la sección 4.3.4.1.

4.3.2 Evaluación del proceso fermentativo al variar la concentración inicial de xilosa comercial

La concentración 60 g/L de xilosa inicial en el medio de fermentación, evaluada en la cinética de fermentación en la sección 4.3.1, se comparó con otras cuatro concentraciones (20, 40, 70 y 100 g/L) para determinar la máxima concentración de xilosa que el microorganismo era capaz de metabolizar.

La preparación del inóculo y del equipo de fermentación, se realizó siguiendo lo descrito en las secciones 4.3.1.1 y 4.3.1.2, respectivamente.

4.3.2.1 Crecimiento del microorganismo

Al igual que lo descrito en la sección 4.3.1.3, el estudio se llevó a cabo en matraces de 125 mL, tapados con algodón y manta (Figura 8), con 50 mL de volumen de trabajo, el cual estaba constituido por: xilosa comercial en una concentración de 20, 40, 60, 70 ó 100 g/L (según la variable a evaluar), 0,1 g/L de cloruro de calcio, 2,0 g/L de sulfato de amonio; extracto de granza de arroz al 20% v/v y 10^8 #cel/mL de la cepa, la cual se preparó como lo describe el punto 4.3.1.1. El proceso de fermentación se realizó por 100 horas a 30 °C, con una agitación constante a 200 rpm (Mussatto & Roberto, 2003; Villalba *et al.*, 2009).



Figura 8. Equipo de fermentación necesario para realizar la curva de crecimiento de la levadura *Candida guilliermondii* y la variación de la concentración inicial de xilosa comercial.

4.3.2.2 Toma de muestra y tiempo de muestreo

Para evaluar las fermentaciones a las concentraciones de 20, 40, 70 y 100 g/L de xilosa inicial, se establecieron ocho tiempos de muestreo con base en estudios anteriores realizados por Arce (2004), Milanés (2007) y Solana (2011): 0, 5, 22, 29, 50, 70, 77 y 100 horas y acoplándose con el horario de trabajo del CIPRONA, con el interés de determinar con cuál concentración y en qué periodo se producía la mayor conversión de xilosa a xilitol.

En cada toma de muestra se extrajeron tres matraces, según lo recomendado por Arce (2004) para obtener tres repeticiones de cada punto, que se analizaron y desecharon con el fin de evitar la contaminación y pérdida de volumen durante la fermentación. De modo tal, que el número total de muestras analizadas por concentración, correspondió con el número total de matraces, para un total de 24.

Una parte de la muestra se centrifugó a 1200 rpm durante 15 minutos en tubos de centrífuga de 20 mL; el líquido sobrenadante se microfiltró (membrana de 0,45 μm) y se congeló a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el posterior análisis de concentración de xilosa, xilitol y etanol, tal y como se explica en la sección 4.3.4.2; mientras que a la otra parte de la muestra extraída (no centrifugada) se utilizó para la determinación de la concentración celular, tal y como se detalla en la sección 4.3.4.1.

4.3.2.3 Diseño experimental para la evaluación de la fermentación al variar la concentración inicial de xilosa comercial

Para determinar las mejores condiciones de fermentación para obtener una mayor producción de xilitol, se empleó un diseño irrestricto aleatorio con un arreglo factorial de dos vías 5x4, la primera el factor concentración con 5 niveles (20, 40, 60, 70 y 100 g/L) y la segunda el factor tiempo con 4 niveles (50, 70, 77 y 100 horas), para un total de 20 tratamientos, con tres repeticiones por tratamiento. El número de repeticiones fue establecido con base en estudios previos realizados por Arce (2004), en cuanto a producción de xilitol por vía fermentativa.

El factor tiempo se evaluó luego de las 50 horas, ya que con base en el comportamiento cinético de la levadura *Candida guilliermondii* observado en la curva de crecimiento (sección 5.1), es a partir de este momento donde se observa la mayor producción de xilitol que parece mantenerse constante hasta las 100 horas por lo que deben evaluarse esos tiempos para determinar si hay diferencias significativas entre ellos sobre la concentración de los metabolitos en el medio de fermentación.

Las variables respuesta evaluadas fueron: el rendimiento de producción de xilitol expresado como concentración de xilitol producido (g/L) en relación con la concentración de xilosa consumida (g/L), la productividad ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), la concentración de xilitol y etanol producidos (g/L), la concentración de xilosa consumida (g/L) y la concentración final de la cepa (#cel/mL).

Se determinó el efecto de los factores de concentración y tiempo sobre las variables respuesta y su posible interacción, mediante un análisis de varianza (ANDEVA), con un nivel de confianza de 95%. Además, en los casos en que se encontraron diferencias significativas, se realizó una prueba de Tukey con un $\alpha=0,05$, para establecer las diferencias entre los tratamientos. Lo anterior se realizó haciendo uso del programa XLSTAT 2012.

A partir de esta evaluación, a nivel de laboratorio con la xilosa comercial, se estableció la concentración de xilosa inicial por utilizar en las siguientes etapas del estudio de producción de xilitol.

4.3.3 Producción de xilitol y otros metabolitos al variar la concentración inicial de xilosa extraída de los residuos de piña.

Se evaluaron a nivel de laboratorio, en matraces de 125 mL, los procesos fermentativos con concentraciones iniciales de 60 y 70 g/L de xilosa extraída de los residuos de piña, con base en los resultados de la evaluación de la fermentación al variar la concentración inicial de la xilosa comercial. Se establecieron dichas condiciones debido a que se consideraron como las más favorables para la producción de xilitol, aplicando la metodología del apartado 4.3.1.

Para la evaluación, se escogen las dos concentraciones y no sólo una, porque también se toma en cuenta que en el hidrolizado del material hemicelulósico pueden estar presentes, además de la xilosa, compuestos tóxicos para el metabolismo de la levadura, tales como ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural, compuestos fenólicos y los iones del metal que se generen. Estos materiales podrían afectar la productividad volumétrica de la fermentación, el consumo de la fuente de carbono y el metabolismo del microorganismo,

dependiendo de la proporción de hidrolizado con la que se trabaje, la cual se cree que afecta negativamente al aumentar la concentración. De modo que una pequeña variación en la concentración inicial de xilosa puede resultar significativa en la producción de xilitol y es necesario evaluarlo (Alves *et al.* 2004).

4.3.3.1 Medio de fermentación

Se trabajó con cáscaras de piña provenientes de un proceso industrial de pelado, con cierta cantidad de pulpa adherida. Estas se molieron, se prensaron y se secaron, siendo de interés el sólido seco y molido. La caracterización fisicoquímica de los residuos de piña se realizó en forma paralela en otro proyecto de investigación, por lo que no se reporta en este estudio.

La extracción de la xilosa a partir de dicho sustrato se realizó mediante una hidrólisis ácida a alta temperatura, de acuerdo con el procedimiento establecido en el CIPRONA. El proceso consistió primero en una hidrólisis de las cáscaras de piña molidas y secas, a alta temperatura (121°C) y con H₂SO₄ 0,3M. La mezcla se filtró con una prensa hidráulica y se ajustó el pH a 8 con una disolución de NaOH (grado técnico), la cual posteriormente se filtró por vacío y con celite como ayuda filtrante. Luego, se acidificó hasta un valor de pH igual a 5,6 con H₂SO₄, se trató con carbón activado y se volvió a filtrar con celite. Por último se procedió a concentrar el hidrolizado con un rotavapor para alcanzar la concentración necesaria para formular los medios de fermentación (Hernández, 2012).

El hidrolizado que contenía la concentración de xilosa a evaluar, fue suplementado con cloruro de calcio, sulfato de amonio y extracto de arroz, tal como se realizó con la xilosa comercial pura; ya que en algunos estudios se enfatiza en la necesidad de suplementar estos medios para inducir el comportamiento de conversión de la xilosa por parte de la levadura (Mussatto & Roberto, 2008).

Tanto la preparación del inóculo como el equipo de fermentación se realizaron de la misma manera que las descritas en los apartados 4.3.1.1 y 4.3.1.2, respectivamente, para mantener las mismas condiciones de trabajo.

4.3.3.2 Toma de muestra y tiempo de muestreo

Al igual que con xilosa comercial, en cada muestreo se extrajeron tres matraces (Arce, 2004). El número total de muestras analizadas correspondió con el número total de matraces, para un total de 24, al fijar los tiempos de muestreo a las 0, 5, 22, 29, 50, 70, 77 y 100 horas de fermentación, igual a como se estableció para el segundo objetivo, con el fin de poder comparar los resultados obtenidos con la xilosa comercial y la extraída de residuos de piña.

Una parte de la muestra se centrifugó a 1200 rpm durante 15 min en tubos de centrífuga de 20 mL, el líquido sobrenadante se microfiltró (membrana de 0,45 μm) y se congeló a -10°C para el posterior análisis de concentración de xilosa, xilitol y etanol, tal y como se explica en la sección 4.3.4.2; mientras que la otra parte de la muestra extraída (no centrifugada) se utilizó para la determinación de la concentración celular, así como se detalla en la sección 4.3.4.1.

4.3.3.3 Diseño experimental para la evaluación de la fermentación al variar la concentración de xilosa extraída de residuos de piña

Para determinar la condición apropiada para la producción de xilitol, utilizando el hidrolizado de residuos de piña y la xilosa comercial, se utilizó un diseño irrestricto aleatorio con un arreglo factorial de tres vías de $2 \times 2 \times 3$, para un total de 12 tratamientos. El factor “tipo de xilosa” a 2 niveles (comercial y extraída), el factor “concentración inicial de xilosa” a 2 niveles (60 y 70 g/L), y el factor “tiempo” a 3 niveles (29, 50 y 70 horas de fermentación), cada tratamiento evaluado con tres repeticiones según lo establecido por Arce (2004).

Las variables respuesta que se evaluaron fueron: el rendimiento de producción de xilitol expresado como concentración de xilitol producido/concentración de xilosa

consumida), la productividad ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), la concentración de xilitol y etanol producidos, la concentración de xilosa consumida y la concentración final de la cepa.

La evaluación estadística de los datos se realizó mediante un análisis de varianza (ANDEVA), con un nivel de confianza de 95% y el programa XLSTAT 2012, con la finalidad de determinar el efecto de los factores (tipo de xilosa, concentración de xilosa y tiempo de fermentación) sobre las variables respuesta y la posible interacción entre ellos. En los casos en que se presentaron diferencias significativas, se realizó una prueba de Tukey con un $\alpha=0,05$ para establecer las diferencias entre los tratamientos.

En este punto no se pudo evaluar la variabilidad de la producción de xilitol, para la determinación de repeticiones, puesto que no se produjo xilitol en el medio.

4.3.4 Métodos de análisis

4.3.4.1 Determinación de la concentración celular

La concentración celular en el medio de fermentación, se determinó siguiendo la metodología empleada por Arce (2004), Milanés (2007) y Solana (2011) a partir de una curva de calibración con suspensiones de la cepa *Candida guilliermondii*, por relación de la concentración celular a diferentes densidades ópticas. Se utilizó un espectrofotómetro Lambda 25 (Perkin Elmer, EUA), a una longitud de onda de 600 nm.

La concentración celular de la disolución madre para preparar los patrones de la curva de calibración, se determinó utilizando la cámara de Neubauer con un conteo de la misma por triplicado.

4.3.4.2 Determinación de la concentración de xilosa, xilitol, glucosa, galactosa, etanol y ácido acético

Para determinar la concentración de los analitos en los medios de fermentación tanto con xilosa comercial como con el hidrolizado, las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 8 min, el líquido sobrenadante se microfiltró ($0,45\ \mu\text{m}$) y se realizaron las diluciones necesarias. El filtrado se congeló para la determinación posterior por HPLC.

Los analitos en las muestras se detectaron al comparar los tiempos resultantes con el presentado por los patrones y se cuantificaron en la curva de calibración correspondiente.

Para determinar la concentración de glucosa, xilosa, xilitol, etanol y ácido acético en el caldo de fermentación con el hidrolizado de residuos de piña, se siguió el método desarrollado por el personal de CENIBiot, en el cual se utilizó una columna Rezex ROA (Phenomenex, USA) con dimensiones 150 mm x 7,8 mm, con un tamaño de poro de 5 μ m. Se trabajó a una temperatura de 65 °C y un flujo de 0,6 mL/min, con una fase móvil de H₂SO₄ (0,0025 M). Para la medición se empleó un detector de índice de refracción a 40°C. Al igual que en el caso anterior, se construyeron curvas de calibración para cada uno de los analitos estudiados.

También fue necesario determinar galactosa, a partir de los resultados obtenidos, siguiendo métodos desarrollados en el CENIBiot. Para ello se utilizó una columna Rezex RMP (Phenomenex, USA) con dimensiones 300 mm x 7,8 mm, con un tamaño de poro de 5 μ m. Se trabajó a una temperatura de 75°C y un flujo de 0,6 mL/min, con una fase móvil de 100% agua. Para la medición se empleó un detector de índice de refracción a 40°C y se construyó la curva de calibración correspondiente al analito.

Vale recalcar que lo anterior se realizó con la colaboración del personal de CENIBiot.

4.3.4.3 Cálculo de la xilosa consumida, velocidad de crecimiento celular, el rendimiento y productividad de xilitol.

La xilosa consumida (g/L) se determinó al restarle a la concentración de xilosa inicial la concentración de xilosa presente en cada uno de los tiempos de fermentación, según correspondía.

La velocidad de crecimiento celular se determinó al calcular la pendiente de la recta entre las 0 y 22 horas del proceso de fermentación, periodo correspondiente a la fase logarítmica o de crecimiento del microorganismo.

El rendimiento de la producción de xilitol, en cada tiempo de muestreo se calculó como la división de la cantidad de xilitol producido entre la cantidad de xilosa consumida (g de xilitol producido/g de xilosa consumida).

La productividad ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) se define como la concentración de xilitol alcanzada a un tiempo de fermentación y se determinó al dividir la concentración de xilitol obtenida (g/L) con respecto a un tiempo específico (h).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Comportamiento cinético de la levadura *Candida guilliermondii*

Para establecer las mejores condiciones de producción de xilitol, es importante conocer la curva de crecimiento y el comportamiento del microorganismo; estas se evaluaron por medio de una fermentación a nivel de laboratorio en el presente estudio.

El medio de fermentación, en el tiempo cero, constituido por 60 g/L de xilosa comercial pura ($\geq 99\%$ pureza), se inoculó con una concentración de $4,1 \times 10^8$ #cel/mL equivalente a 8,6 log(#cel/mL). Además se empleó un ambiente limitado en oxígeno, el cual se logra según Branco *et al.* (2006), Mussatto *et al.* (2006), Virgínio *et al.* (2007), Arruda & Felipe (2008), Canilha *et al.* (2008), con una relación de 0,4 entre el volumen del medio (50 mL) y el volumen del recipiente (erlenmeyer de 125 mL).

A partir del análisis de dieciséis puntos de muestreo, se graficó la tendencia promedio de tres muestras por punto. Los resultados obtenidos se aprecian en la Figura 9, donde se presenta la curva de crecimiento completa, la cual abarca la variación en la concentración celular del microorganismo, la concentración de xilosa y las concentraciones de los metabolitos: xilitol y etanol.

El seguimiento de la concentración celular durante la fermentación, permite evaluar el ciclo de vida del microorganismo. En este caso, en la curva de crecimiento celular sólo se identifican dos fases típicas de crecimiento microbiano: la fase logarítmica y la fase estacionaria.

La fase de adaptación del microorganismo no se pudo detectar, lo cual indica que la cepa empleada logra adaptarse en menos de 5 horas al sustrato de fermentación, presentando un comportamiento muy similar a la “Cepa X” (Arce, 2004; Milanés, 2007; Solana, 2011). Se debe tomar en cuenta, que para la propagación de la levadura con el fin de obtener la suficiente cantidad de inóculo, se le dio un tratamiento previo en un medio

muy similar al de fermentación, por lo que es de esperarse que en este tiempo (24 horas antes de dar inicio a la fermentación) el microorganismo se haya adaptado.

Tampoco se distingue la fase de muerte en la curva de crecimiento, ya que mediante el método de determinación de concentración celular, descrito en la sección 4.3.4.1, no es posible hacer la distinción entre células vivas o muertas, de modo que sólo se llega a apreciar una desaceleración en el crecimiento celular.

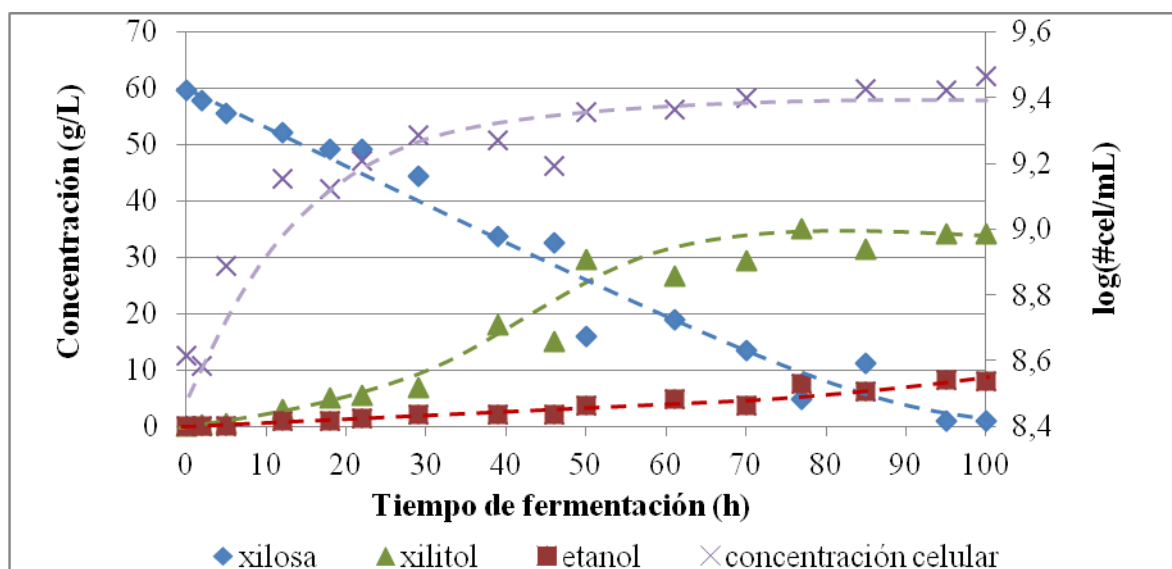


Figura 9. Variación promedio ($n=3$), de la concentración de xilosa, xilitol, etanol y concentración celular, en la curva de crecimiento de la cepa *Candida guilliermondii*, en un sistema de fermentación por lote a nivel de laboratorio a partir de 60g/L de xilosa comercial, a 30 °C y 200 rpm.

Con base en la Figura 9, se observa que en las primeras 22 horas de fermentación, se da un aumento en la concentración celular, lo cual representa la fase logarítmica de crecimiento. Posteriormente el ciclo de vida del microorganismo se encuentra en etapa estacionaria hasta las 100 horas de fermentación, donde la cantidad de la fuente de carbono (xilosa) continúa reduciéndose por su consumo y se vuelve menos disponible para satisfacer el crecimiento microbiano y la producción de xilitol a la vez. No se puede asegurar que en este momento el número de células que crecen es similar al número de

células que mueren, debido al método empleado para la determinación de la concentración celular, que como ya se explicó, sólo se asegura observar una disminución en la velocidad de crecimiento.

La xilosa representa la única fuente de carbono en el medio de fermentación; esta no sólo es utilizada para crecimiento celular, sino que la levadura también la metaboliza para la producción de xilitol. En la fase logarítmica, en las primeras 22 horas de fermentación, el microorganismo consumió esta fuente de carbono, en alrededor de 17,5%, principalmente para su crecimiento, en donde la concentración celular llegó a un valor de $1,6 \times 10^9$ #cel/mL equivalente a $9,2 \log(\text{\#cel/mL})$.

Por tanto, se observa que la concentración celular aumenta casi un logaritmo entre las 0 y 22 horas de proceso. En la cinética de fermentación de la levadura X, la población microbiana aumenta en 2 logaritmos durante las primeras 14 horas (Arce, 2004). Sin embargo, a esta última se le añadió glucosa al medio de fermentación además de xilosa y esta hexosa es considerada como la principal fuente de carbono del microorganismo, la cual consume en su totalidad a las 14 horas con el fin de inducir la duplicación celular, la generación de etanol y producción de energía.

Solana (2011) en su estudio utilizó el doble de glucosa comparado con Arce (2004), donde el aumento en la concentración celular de la levadura X fue de un logaritmo, muy similar al del presente estudio. Sin embargo, como puede notarse en el Cuadro VI del apéndice, el consumo de xilosa se da posterior a las 50 horas, aún más tarde que cuando se trabajó con menor cantidad de glucosa y que con *Candida guilliermondii*. Por tanto, puede considerarse la adición de cierta cantidad de glucosa si el objetivo es aumentar la concentración celular y disminuir el tiempo de la fase logarítmica, no así la producción de xilitol; esto debido a que a puede entorpecer la adaptación de la levadura al consumo de la xilosa, lo cual se detallará a fondo más adelante.

Después de las 22 horas de fermentación y hasta las 100 horas, la concentración celular se mantiene relativamente constante y se observa un aumento en la producción del metabolito de interés, ya que conforme aumenta la concentración microbiana se disminuye

la disponibilidad de oxígeno y se favorece la producción de xilitol. En esta etapa se consumió alrededor de un 80,7% de la xilosa presente, quedando un residuo de 1,04 g/L del sustrato en el medio a las 100 horas.

El principal motivo para que se produzca xilitol, a nivel biotecnológico con levaduras, es la existencia de un sistema natural de transporte para la D-xilosa y un balance redox intracelular. La mayor parte de los estudios de producción biotecnológica de xilitol se realiza con levaduras del género *Candida*, debido a que son de los pocos microorganismos capaces de utilizar la xilosa como fuente de carbono y de acumular el xilitol antes de que se transforme a D-xilulosa. Una vez que se llega a este punto, se comienza a disminuir el rendimiento del metabolito de interés para inducir el crecimiento celular (González *et al.*, 2011).

De acuerdo con Sene *et al.* (2001), en el caso específico del metabolismo de *Candida guilliermondii*, el xilitol es producido por una enzima específica, la enzima xilosa reductasa (XR), la cual es estrictamente dependiente del NADPH y muy poco del NADH, favoreciendo la acumulación de NADH en el medio, que se puede reoxidar a NAD^+ . Esto puede a su vez beneficiar a la enzima xilosa deshidrogenasa en la conversión del xilitol a xilulosa, como posible fuente de energía cuando se agota la principal fuente de carbono, en este caso la xilosa. Es por esto que el xilitol es considerado un metabolito secundario, ya que se forma por la acción de una enzima específica, no es esencial para el crecimiento o metabolismo central de la levadura y es un compuesto que se produce mediante reacciones anabólicas mayoritariamente cuando el crecimiento microbiano es limitado, posterior a las 22 horas de fermentación como se observa en la Figura 9.

De este modo, tanto el rendimiento como la productividad del xilitol son afectados según el ciclo de vida de las células, ya sea en la fase log o la estacionaria. Entre los factores que afectan la producción de xilitol, además de la presencia de otros azúcares, la concentración de oxígeno es determinante. Una concentración muy alta en el medio favorece el crecimiento celular, pero una condición anóxica puede inducir una fermentación anaerobia con un consecuente aumento en la producción de etanol y en ambos casos un

bajo rendimiento de xilitol (González *et al.*, 2011). Por esta razón se mantuvo un ambiente limitado de oxígeno durante toda la fermentación manteniendo una relación de volumen del medio con respecto al volumen del recipiente de 0,4 (Branco *et al.*, 2006; Mussatto & Roberto, 2006; Virgínio *et al.*, 2007, Arruda & Felipe, 2008; Canilha *et al.*, 2008). Con ello se limita la oxidación del NADH en exceso en la cadena respiratoria, lo cual favorece una alta proporción de NADPH/NADH, la actividad de la XR y la inactividad de la XDH, con lo que se logra la acumulación de xilitol al evitar la oxidación del xilitol a xilulosa (Sene *et al.*, 2001).

Al observar la Figura 9, se aprecia que el aumento en la producción del xilitol coincide con el consumo de la xilosa durante las fases logarítmica y estacionaria del microorganismo. Sin embargo, como puede notarse en el Cuadro VI del apéndice, la productividad de xilitol decrece a través del tiempo y el mejor panorama respecto a este último factor, se presenta después de las 39 horas de fermentación, siendo la máxima a las 59 horas con $0,59 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ y posteriormente a partir de las 70 horas desciende hasta alcanzar un valor de $0,34 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ a las 100 horas de fermentación.

El rendimiento obtenido en la producción de xilitol también aumenta conforme se consume la xilosa en el medio, siendo este hecho más notorio a partir de las 12 horas de fermentación con un valor de 0,97 g de xilitol producidos/g de xilosa consumidos, equivalente a casi un 100% de conversión. De forma muy similar a la productividad, el rendimiento comienza a disminuir a las 77 horas de fermentación hasta representar un valor de 0,58 g de xilitol producidos/g de xilosa consumidos en las 100 horas de fermentación.

Asimismo, en la Figura 9, la estabilidad en la concentración de xilitol posterior a las 70 horas de fermentación, se asocia con una desaceleración en el consumo de la xilosa por agotamiento de esta que es su principal fuente de carbono. Por otra parte, esta estabilidad en la producción de xilitol podría deberse a que este compuesto está siendo transformado en xilulosa, donde la velocidad de producción de xilulosa y la velocidad de consumo del xilitol sean iguales. Sin embargo, esto no se puede asegurar debido a que no se cuantificó este metabolito.

Con respecto al etanol, en este estudio no es un metabolito deseado, pues según González *et al.* (2011) puede inhibir el sistema de transporte de los azúcares, al interferir en las regiones hidrofóbicas de la membrana, además de que representa un problema en las etapas de purificación de xilitol a partir de caldos de fermentación.

Sin embargo, se debe destacar la formación de etanol en el medio posterior a las 22 horas de fermentación, donde una mayor producción de este metabolito se asocia con la etapa estacionaria del ciclo de vida del crecimiento y de producción de xilitol. De acuerdo con Russel (2003), el etanol se produce cuando el nivel de oxígeno en el medio es reducido o el nivel del azúcar es elevado.

Con base en los anteriores resultados, se puede deducir que los valores del rendimiento y de la productividad de xilitol no mejoran si se continúa la fermentación por más de 70 horas. Sin embargo, este aspecto se desarrollará de forma más profunda, más adelante, al analizar el efecto de la concentración de xilosa inicial con un medio de fermentación con xilosa comercial.

5.2 Evaluación de las fermentaciones al variar la concentración inicial de xilosa en un medio sintético

En estudios sobre la producción biotecnológica de xilitol, realizados por Arce (2004), Milanés (2007) y Solana (2011), se utilizó una levadura genéticamente modificada para evaluar la producción de xilitol por medio fermentativo. En el presente estudio, se estudió el proceso con *Candida guilliermondii*, de ahí la importancia por reestablecer las condiciones más favorables de fermentación, al emplear una nueva cepa.

Entre los factores que afectan la producción de xilitol, se encuentra la concentración de xilosa en el medio. En este caso, se estudió el efecto de utilizar valores iniciales de 20, 40, 60, 70 y 100 g/L de xilosa comercial, sobre la producción de xilitol, etanol, concentración celular, consumo de xilosa, rendimiento y productividad de xilitol.

Para determinar la condición de fermentación más favorable en la producción de xilitol, a partir de los resultados, se realizó un ANDEVA para cada una de las variables

respuesta estudiadas a las 50, 70, 77 y 100 horas de fermentación; esto para, además de determinar la concentración inicial de xilosa, poder establecer un tiempo de finalización del proceso.

5.2.1 Evaluación de la concentración celular de la levadura *Candida guilliermondii*

Al estudiarse la variación de la concentración celular, a nivel estadístico se determina que existe una interacción entre el efecto que tiene el tiempo de fermentación y el de la concentración inicial de xilosa con la que se inicia el proceso (apéndice, Cuadro VII). Sin embargo, con base en la Figura 10, se observa que la diferencia en el crecimiento celular, a través del tiempo de fermentación, entre cada una de las concentraciones iniciales evaluadas no varía en más de 0,20 log, por lo que con un criterio microbiológico y práctico, se puede afirmar que la magnitud de esta diferencia no es importante ni determinante entre las 50 y 100 horas de proceso (Mora, 2011).

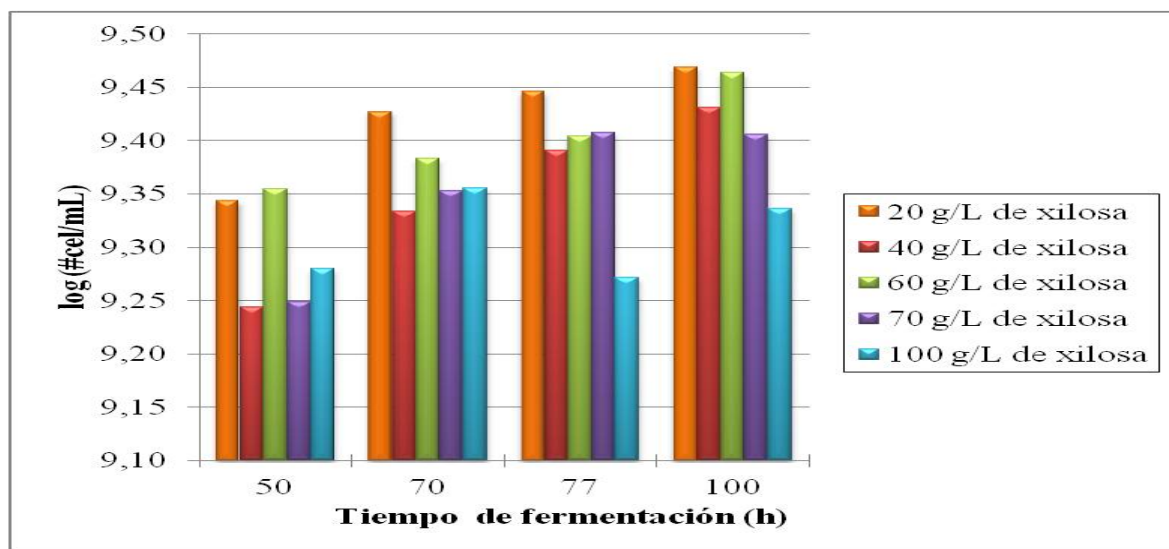


Figura 10. Variación promedio (n=3) en la concentración celular (log#cel/mL), de la levadura *Candida guilliermondii*, con el tiempo de fermentación, para tratamientos con diferentes niveles de concentración inicial de xilosa comercial.

Asimismo, se observan fluctuaciones en la concentración celular, principalmente cuando se inició con una concentración de 100 g/L de xilosa, pero como ya se mencionó, las variaciones no representan ni un logaritmo. En términos de la captación de D-xilosa, en el equilibrio y el mantenimiento del balance redox intracelular; se dice que las cepas de *Candida* muestran tener ventaja sobre otras cepas como *S. cerevisiae* (González *et al.*, 2011).

En la Figura 11 se aprecia que en la cinética de fermentación de *Candida guilliermondii*, el desempeño de la levadura es muy similar entre las diferentes concentraciones evaluadas. Además, Solana (2011), determinó un comportamiento muy parecido con la levadura X, con el cual se aprecia un crecimiento en alrededor de un logaritmo, aún al variar la concentración inicial de xilosa en el medio de fermentación.

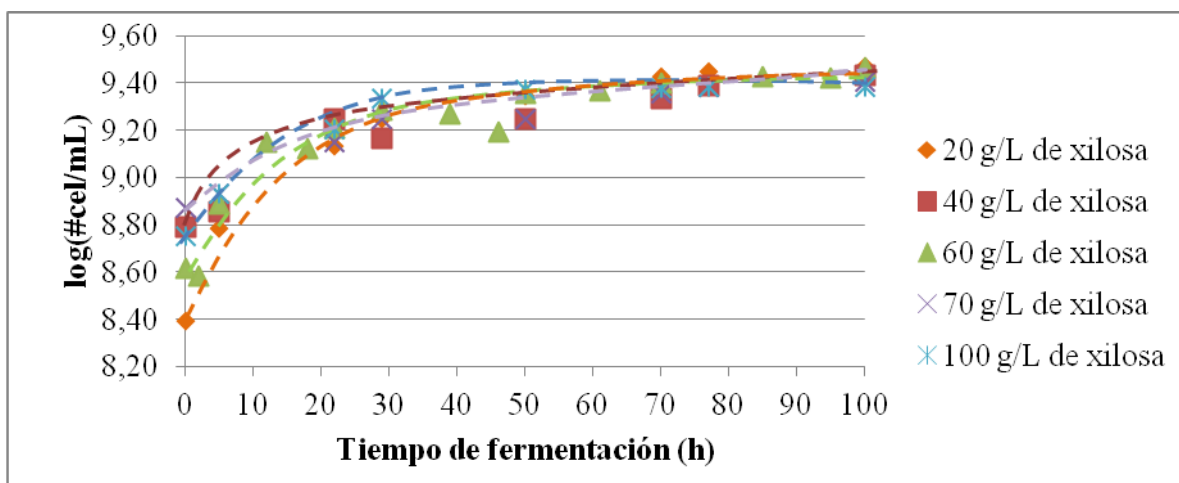


Figura 11. Variación promedio (n=3) en la concentración celular (log#cel/mL), al transcurrir el tiempo de fermentación, evaluado con la levadura *Candida guilliermondii*, en tratamientos con diferentes concentración inicial de xilosa comercial.

La fase logarítmica se encuentra entre las 0 y 22 horas de proceso. Al evaluar la velocidad de crecimiento celular en este periodo (Cuadro IV), se determina que los valores oscilan entre 0,013 y 0,030 g/L h, siendo la menor con 70 g/L y la mayor con 20 g/L de xilosa

inicial, respectivamente. De modo, que al iniciar la fermentación con bajas concentraciones de azúcar, el microorganismo tiene un metabolismo más acelerado, se encuentra menos estresado osmóticamente y se enfoca en el consumo de este para llevar a cabo la duplicación celular, como estrategia de sobrevivencia frente a poca fuente de carbono.

Cuadro IV. Velocidad de crecimiento de la levadura *Candida guilliermondii* al variar la concentración inicial de la xilosa comercial, en la fase logarítmica del ciclo de vida, correspondiente al periodo entre las 0 y 22 horas del proceso de fermentación.

Concentración inicial de xilosa (g/L)	Velocidad de crecimiento (g*L ⁻¹ *h ⁻¹)
20	0,030
40	0,021
60	0,025
70	0,013
100	0,020

5.2.2 Evaluación de la concentración de xilosa comercial residual

Al evaluar la variación de concentración residual de xilosa en el medio, se determina que existe una interacción entre el tiempo de fermentación y la concentración inicial de xilosa empleada; es decir con un 95% de confianza, ambos factores tienen efecto sobre la concentración de xilosa residual (Cuadro VII, apéndice). Lo anterior se respalda al observar la Figura 12. Con base en ella, se puede establecer que en todos los procesos fermentativos, la xilosa es consumida conforme transcurre el tiempo de fermentación, evaluado a las 50, 70, 77 y 100 horas.

La xilosa se consume casi en su totalidad en todos los tratamientos a las 100 horas, excepto cuando se inicia con 100 g/L, pues no se llegó a metabolizar ni la mitad de lo añadido. Además, se observa cómo al aumentar la concentración inicial de sustrato la cantidad de xilosa residual es mayor al final del proceso. Esta situación coincide con lo que Walther *et al.* (2001) manifiestan, al decir que con valores altos de azúcar en el medio (156 g/L de xilosa), se puede provocar estrés osmótico en la célula y afectar el desempeño de la levadura.

En su estudio Solana (2011) llegó a la misma conclusión, al evaluar la producción de xilitol en fermentaciones con la levadura X, utilizando diferentes concentraciones iniciales de xilosa (9, 22, 39, 47 y 59 g/L); donde para las concentraciones de 39, 47 y 59 g/L el porcentaje de xilosa residual fue superior al 60%. Esta situación se ve mejorada en la fermentación con *Candida guilliermondii*, ya que a las 100 horas de proceso, el consumo de xilosa fue casi de un 100%, excepto para la concentración de 100 g/L donde sólo se consumió cerca de un 30%, como lo muestra la Figura 12.

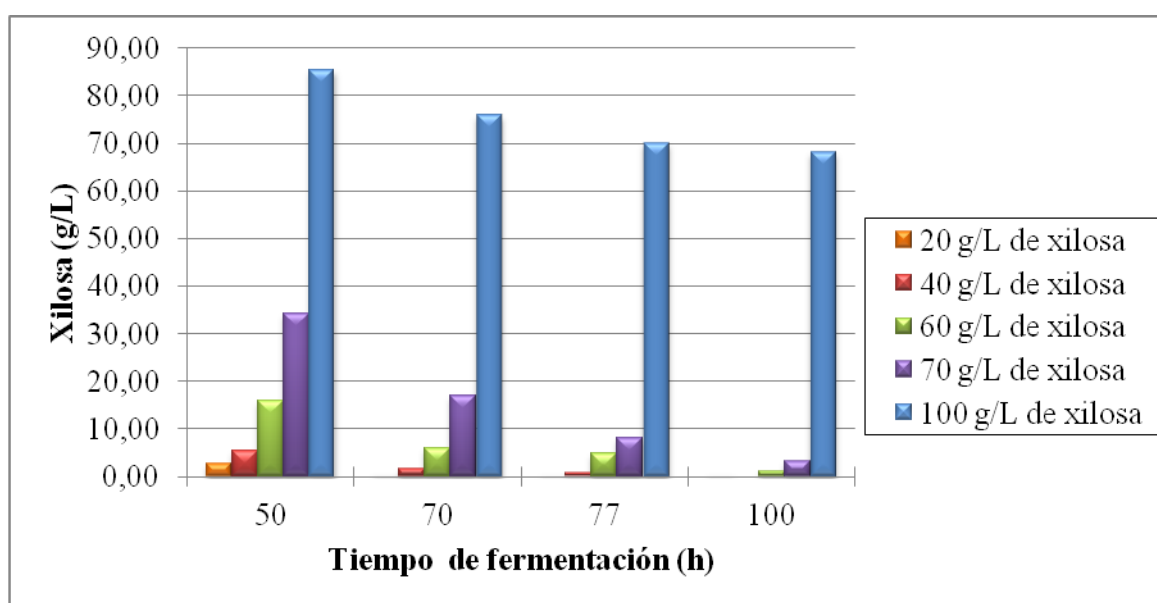


Figura 12. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilosa residual a diferentes tiempos de fermentación y concentraciones iniciales de xilosa comercial, con la levadura *Candida guilliermondii*.

Asimismo, Mussatto & Roberto (2008) evaluaron las concentraciones iniciales de 55, 70 y 95 g/L de xilosa en fermentaciones con la levadura *Candida guilliermondii*, y llegaron a establecer la concentración de 70 g/L como la óptima para la producción de xilitol asociada a un consumo más eficiente de la xilosa. Este es un panorama muy similar al presentado en este estudio, pues la caída en la concentración de la xilosa es más notoria

cuando se inicia con 70 g/L, lo cual indica una mayor productividad y que la fermentación es más eficiente bajo esta condición.

5.2.3 Evaluación del rendimiento, productividad y concentración de xilitol producido

Con respecto a la concentración de xilitol, rendimiento y productividad de xilitol, se presentaron diferencias significativas entre sus promedios al variar la concentración de xilosa comercial inicial, analizados como tratamientos independientes entre las 50 y 100 horas de proceso. Es por esta razón, que se realizó una prueba de Tukey para establecer diferencias entre los promedios de los tratamientos, lo cual se ilustra en los Cuadros VII y VIII del apéndice.

La mayor producción de xilitol promedio (33,16 y 37,72 g/L), se logró cuando el proceso de fermentación se inició con 60 y 70 g/L de xilosa, respectivamente. Por lo contrario, cuando se utilizó un sustrato con 20 g/L de xilosa, se obtuvo un promedio de 3,88 g/L de xilitol. En la Figura 13, se aprecia lo anterior y se muestra que con las concentraciones intermedias de 60 y 70 g/L se logra un promedio mayor en la concentración de xilitol, en tanto que con los otros tratamientos este valor disminuye conforme se reduce o se aumenta la concentración de xilosa inicial en el medio de fermentación, entre las 50 y 100 horas de proceso.

Mussatto & Roberto (2008) enfatizan en determinar el límite de la concentración inicial de xilosa más alta posible para la producción de xilitol, ya que con cierto nivel de azúcares en el medio, el metabolismo microbiano se inhibe por efecto de la presión osmótica, mientras que con bajos niveles los rendimientos disminuyen al utilizar la poca fuente de carbono para crecimiento celular, donde además no se puede esperar una producción de xilitol alta si la concentración del sustrato es baja. Esta situación fue comprobada en este estudio (Figura 13), ya que al evaluar la concentración de 100 g/L no se obtuvo la mayor cantidad del metabolito de interés.

Con concentraciones iniciales bajas de 20 y 40 g/L de xilosa, se produce muy poco xilitol, debido a que hay muy poca fuente de carbono; es decir, no se puede producir más allá de los 20 y 40 g/L de xilitol, sin considerar que parte de la xilosa debe ser metabolizada para crecimiento celular. Por otro lado, con la concentración de 100 g/L no se obtiene la mayor cantidad de xilitol debido a una baja en la eficiencia de consumo de xilosa, asociado principalmente a estrés osmótico en la levadura por altas concentraciones de azúcares en el medio. De esta manera, se establecen las concentraciones iniciales de 60 y 70 g/L como óptimas para la producción de xilitol.

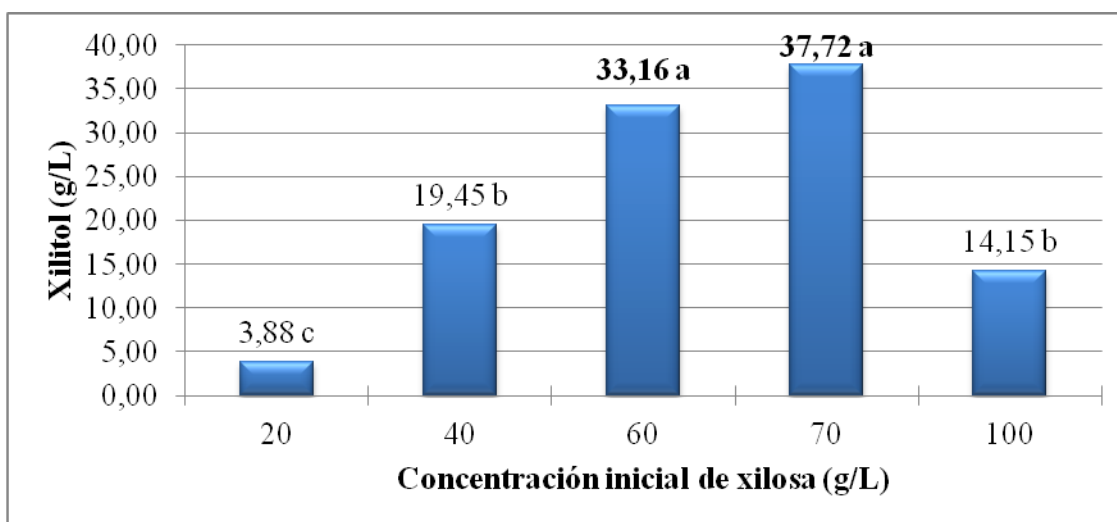


Figura 13. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilitol, al variar la concentración inicial de xilosa en un medio de fermentación con xilosa comercial, con la levadura *Candida guilliermondii*, en un periodo de 50 a 100 h de proceso.

Promedios con diferente letra son estadísticamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

Mussatto & Roberto (2008), también definen la concentración inicial de 70 g/L de xilosa, extraída de bagazo de caña, como la óptima para la producción de xilitol con un rendimiento de 78%, con la levadura *Candida guilliermondii*. Por su parte Solana (2011), define la concentración de 9 g/L de xilosa comercial como la mejor, con un rendimiento del 90% utilizando la “Cepa X” con un medio sintético. Sin embargo, según Mussatto & Roberto (2008) se debe tomar en cuenta que el reporte de estos resultados depende del

estrés causado a la levadura en el medio, de las condiciones de fermentación y de dónde provenga la xilosa; pues incluso ellos estiman la concentración inicial de 82 g/L como la mejor, si la xilosa proviene de paja de arroz.

Al trabajar con bagazo de caña como material lignocelulósico, Arruda & Felipe (2008) lograron un rendimiento de 78%, al iniciar con 55 g/L de xilosa en el medio, igual a lo reportado por Mussatto & Roberto (2008), con la diferencia de que este rendimiento se logró con una menor concentración inicial de xilosa por adición de 0,7 g/L de glicerol al medio de fermentación. Por lo que se podría evaluar la adición de glicerol al medio de fermentación con el fin de mejorar los rendimientos empleando una menor concentración de sustrato, al ayudar a mantener el balance redox. Cabe resaltar que este metabolito no fue de interés para el estudio, por el hecho de que no se determinó la presencia del mismo, en ninguno de los tratamientos evaluados con xilosa comercial.

Este comportamiento se ve respaldado al analizar los rendimientos en la producción de xilitol obtenidos en este estudio, donde una vez más, los mejores resultados se presentaron al utilizar concentraciones de 60 y 70 g/L de xilosa inicial, como lo muestra la Figura 14.

Se logró obtener un rendimiento de xilitol del 66 y 67% al iniciar el proceso con 60 y 70 g/L de xilosa, respectivamente. En este caso, al igual que cuando se analizó la concentración de xilitol en el medio, los rendimientos tienden a ser menores a medida que se aumenta o disminuye la concentración inicial del azúcar, lo cual corresponde a los valores de 20, 40 y 100 g/L de xilosa; donde con el primero se logran obtener tan solo 0,20 gramos de xilitol por gramo de xilosa consumida.

El rendimiento parece aumentar conforme se añade más xilosa en el medio; sin embargo, dicho comportamiento se altera cuando se trabaja con una concentración de 100 g/L de xilosa; donde se observa una reducción en el rendimiento de producción de xilitol, asociada a una baja en la eficiencia de conversión por parte de la levadura como ya se había mencionado con el argumento presentado por Walther *et al.* (2001), cuando las concentraciones del sustrato son extremadamente altas y se crea estrés osmótico.

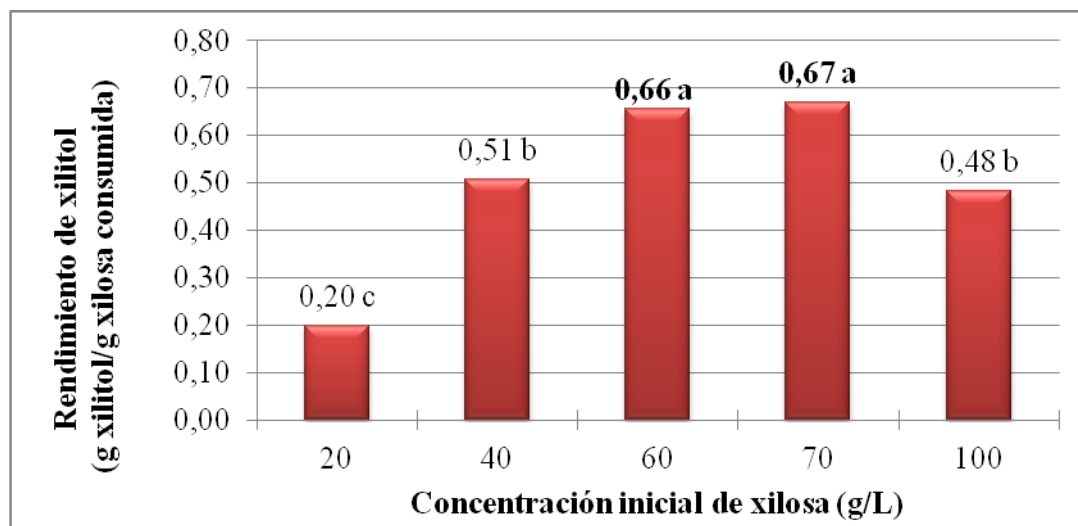


Figura 14. Variación promedio ($n=3$) en el de rendimiento de xilitol, al variar la concentración inicial de xilosa en un medio de fermentación con xilosa comercial, con la levadura *Candida guilliermondii*, en un periodo de 50 a 100 h de proceso.

Promedios con diferente letra son estadísticamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

La productividad del proceso también se ve favorecida cuando se emplean concentraciones de 60 y 70 g/L de xilosa inicial, alcanzando valores de 0,45 y 0,52 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ y presenta una tendencia a disminuir, cuando se emplean las demás concentraciones, como se detalla en la Figura 15.

La productividad, es el grado de utilización efectiva de cada elemento de producción, pues se refiere a la concentración de la sustancia de interés en un tiempo determinado del proceso de fermentación (Velázquez, 2010). Se asocia al término de la eficiencia y el tiempo, de modo que se pone a prueba la capacidad de un sistema para elaborar un producto, tal como lo es en este caso la del xilitol producido por tiempo de fermentación. Por tanto, se puede inferir que los niveles con los cuales se aprovecharon mejor los recursos, fueron cuando el proceso de fermentación se inició con 60 y 70 g/L de xilosa.

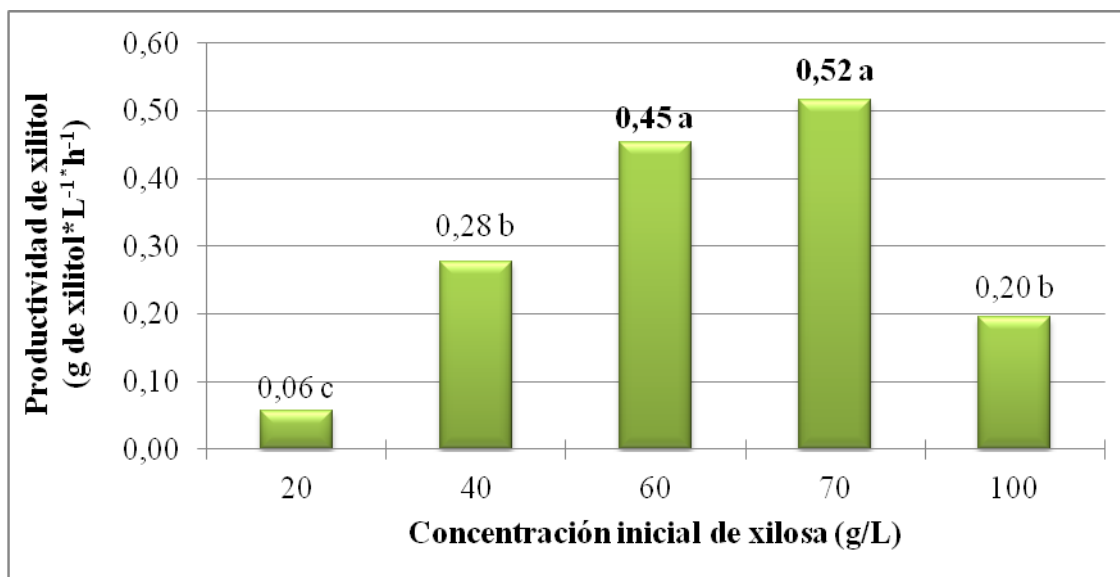


Figura 15. Variación promedio (n=3) en la productividad de xilitol, al variar la concentración inicial de xilosa en un medio de fermentación con xilosa comercial, con la levadura *Candida guilliermondii*, en un periodo de 50 a 100 h de proceso.

Promedios con diferente letra son estadísticamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

De este modo, una vez más, se observa que los resultados obtenidos son muy similares a los reportados por Mussatto & Roberto (2008), quienes entre las concentraciones iniciales de 55, 75 y 95 g/L de xilosa, eligieron la de 70 como la óptima en la producción de xilitol, con un rendimiento de 78% y una productividad de $0,58 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; cercanos al 66-67% y $0,45\text{-}0,52 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{h})$ reportados en este estudio con las concentraciones iniciales de 60 y 70 g/L de xilosa comercial.

Asimismo, al comparar la concentración inicial de 60 g/L de xilosa comercial con la de 58,59 g/L utilizada por Solana (2011), la productividad se vio mejorada, ya que en su estudio, el valor reportado fue de $0,18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. En fermentaciones realizadas con levadura X, la productividad es mayor cuando se emplean menores concentraciones de xilosa (9 g/L) con valores de $0,14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Sin embargo si el objetivo es la obtención de xilitol a nivel industrial, fermentar con la levadura X resulta muy poco factible, considerando que se obtendría una concentración muy baja de 9 g/L de xilitol por fermentación.

En este estudio, al analizar las variables respuesta de concentración de xilitol, rendimiento y productividad, se puede deducir por lo tanto, que se observa una mejora en la producción del xilitol al iniciar las fermentaciones con concentraciones intermedias de xilosa, correspondientes a 60 y 70 g/L.

Al realizar el análisis estadístico de los tratamientos, también se encuentran diferencias significativas, con un 95% de confianza, en las variables respuesta de concentración de xilitol y productividad de xilitol, conforme varía el tiempo de fermentación, entre los tiempos de 50, 70, 77 y 100 h (Cuadro VII, apéndice).

Con respecto al análisis del tiempo de proceso, se lograron concentraciones mayores de xilitol a partir del momento en que el proceso de fermentación alcanzaba las 70 horas. En la Figura 16 se muestra que la diferencia no es significativa entre la cantidad de xilitol producida a las 70, 77 y 100 horas, independientemente de la concentración de xilosa inicial que se analice.

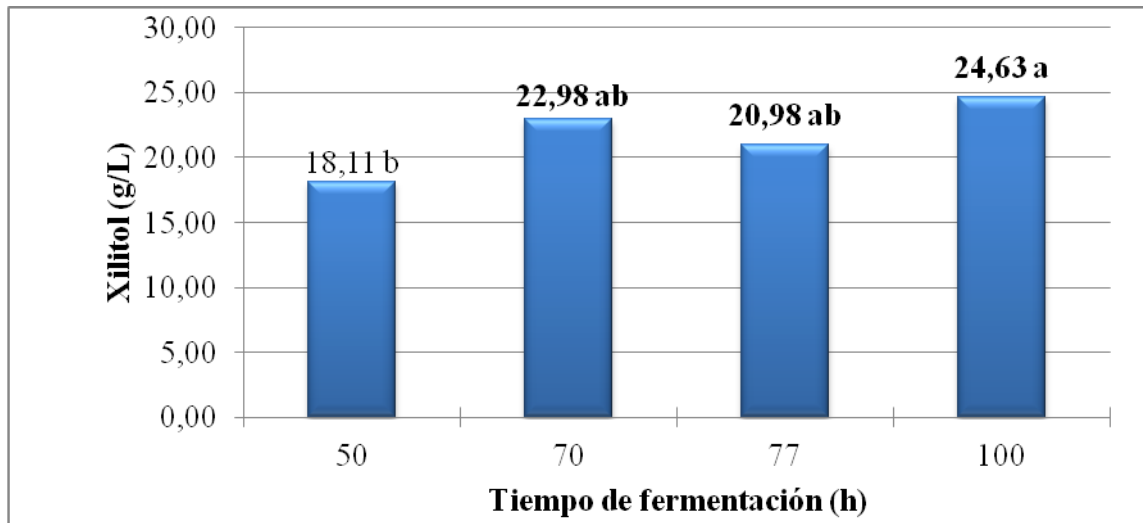


Figura 16. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilitol a diferentes tiempos del proceso de fermentación, independientemente de la concentración inicial de xilosa comercial, con la levadura *Candida guilliermondii*.

Promedios con diferente letra son estadísticamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

Al analizar los resultados de la productividad de xilitol con respecto al tiempo de fermentación, se establece que es a las 50 y 70 horas donde se alcanzan los valores más altos de productividad, lo cual hace referencia a los momentos en los que se da una conversión más rápida de la xilosa en xilitol, con base en la Figura 17. Asimismo, se evidencia una disminución en la productividad conforme los tiempos de proceso son mayores, situación de importancia, principalmente tomando en cuenta el mejor manejo de los recursos, máxime los correspondientes a energía y tiempo.

Por otra parte, se debe considerar que posterior al proceso de fermentación, existen una serie de etapas para la purificación de xilitol, que pese a que no se evalúan en este estudio, contemplan pérdidas del producto obtenido. De este modo, puede considerarse mejor el trabajar por un mayor tiempo en el proceso de fermentación, si se obtiene más cantidad de xilitol pese a que los rendimientos no sean mayores, ni estadísticamente diferentes entre ellos. Esto siempre y cuando sea económicamente factible con respecto a los costos que se puedan tener al trabajar por más tiempo.

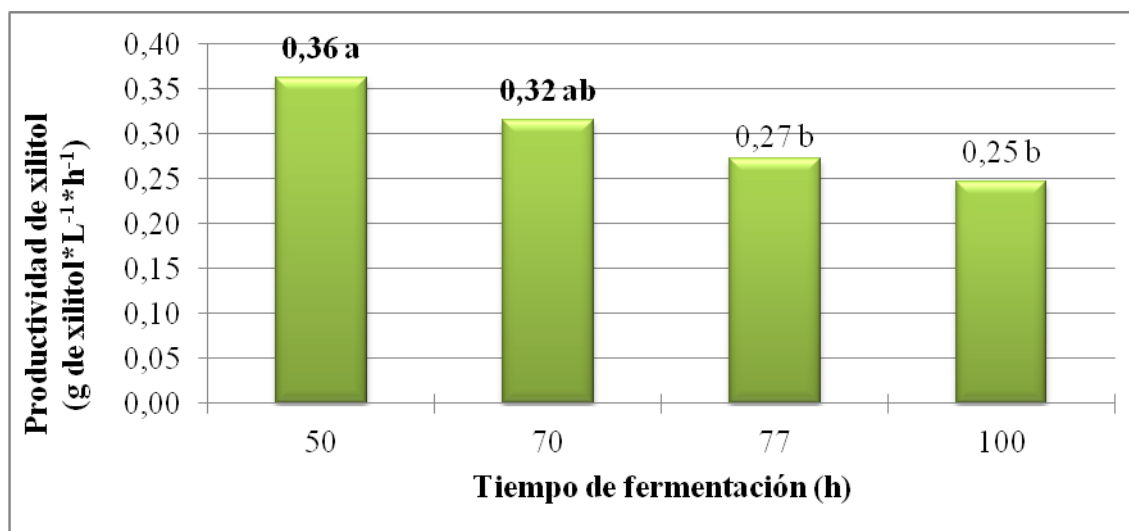


Figura 17. Variación promedio (n=3) en la productividad de xilitol a diferentes tiempos del proceso de fermentación, independientemente de la concentración inicial de xilosa comercial, con la levadura *Candida guilliermondii*.

Promedios con diferente letra son estadísticamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

En síntesis, las condiciones que presentaron resultados más favorables para la producción de xilitol, fueron aquellas en las cuales se formuló con un medio sintético entre 60 y 70 g/L de xilosa comercial y un tiempo de proceso de 70 horas, ya que con un tiempo menor (50 h) la concentración de xilitol resulta muy baja y si se extiende por un tiempo mayor (>77 h), la productividad disminuye.

En estudios anteriores con *Candida guilliermondii*, como el realizado por Virgínio *et al.* (2007), con xilosa extraída de bagazo de caña de azúcar, los mayores rendimientos también se reportan a las 70 horas de proceso; pues luego de ese tiempo se produjo una disminución en la producción asociada a un consumo de xilitol, situación que también se presentó con un medio sintético en el estudio realizado con un hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (Felipe *et al.*, 1995; Felipe *et al.*, 1996; Sene *et al.*, 1998) e incluso con la levadura *Candida tropicalis*. Ante esta situación Silva & Felipe (2006) revelan que dicho comportamiento se asocia a un consumo del xilitol con el fin de ser utilizado por la levadura como fuente de carbono para el crecimiento celular.

En este estudio, no se puede afirmar que esta situación se haya presentado, pues aún a las 100 horas de proceso no se observa una disminución en la concentración del metabolito, pero sí se puede pensar que la levadura se encuentra en una etapa de adaptación para posteriormente consumirlo y convertirlo a xilulosa, por actividad de la xilitol deshidrogenasa, como estrategia de crecimiento. Incluso al observar las cinéticas de fermentación (Figuras 29, 30, 31, 32 y 33, de apéndice) se hace evidente un mejor desempeño de la levadura en la transformación de la xilosa a xilitol antes de las 70 horas, pues a partir de este momento la concentración de xilosa es casi cero y la concentración de xilitol se estabiliza a través del tiempo. Sin embargo, para confirmar que la levadura *Candida guilliermondii* es capaz de consumir el xilitol bajo las condiciones del estudio, será necesario ampliar el tiempo del proceso de fermentación, con el fin de notar cambios en la concentración del xilitol e incluso en la concentración celular.

5.2.4 Evaluación de la concentración de etanol producido

Por otra parte, la levadura *Candida guilliermondii* además de producir xilitol, también es capaz de producir etanol, por su metabolismo, lo cual fue explicado en el apartado 3.6.1 y en la discusión de la curva de crecimiento. La presencia de etanol puede afectar el desempeño de la levadura y consecuentemente los rendimientos en la producción de xilitol, dependiendo de la disponibilidad de oxígeno en el medio.

Como se puede apreciar en la Figura 18, para todas las concentraciones iniciales de xilosa, se generó etanol en el medio; lo cual coincide con la teoría, ya que de acuerdo con Mussatto *et al.* (2012), las levaduras del género *Candida* son capaces de producir etanol en cierto momento del proceso de fermentación a partir de pentosas como xilosa (Mussatto *et al.*, 2012). Se requiere de la presencia de un cosustrato oxidable como el etanol para el mantenimiento de la energía y la regeneración de los cofactores requeridos por la enzima xilosa reductasa (Hallborn *et al.*, 1994).

En este estudio, se presentan diferencias significativas con un 95% de confianza, en la concentración de etanol producida, al variar la concentración inicial de xilosa y el tiempo del proceso de fermentación según el análisis estadístico presentado en el Cuadro VII del apéndice. Se demuestra que tanto el tiempo de fermentación como la concentración inicial de xilosa afectan de forma conjunta, la concentración de etanol producida; es decir, la cantidad de etanol producido depende no sólo del tiempo de fermentación sino también de la concentración de xilosa con la cual se inicie el proceso. Lo cual se representa de forma gráfica en la Figura 18.

Cuando los valores de concentración inicial de xilosa son bajos (20 y 40 g/L), a partir de las 70 horas principalmente, existe una tendencia a una disminución en la concentración de etanol en el medio, conforme aumenta el tiempo. Contrario a las otras tres concentraciones evaluadas, con las cuales se observa una mayor cantidad de etanol al transcurrir el tiempo de fermentación. Sin embargo, en estas últimas, el aumento no es proporcional a la concentración inicial de xilosa, pues con el tratamiento de 70 g/L es con el cual se obtiene la mayor cantidad, correspondiente a 10 g/L a las 100 horas de proceso.

De tal modo, se comprueba la interacción entre los factores de tiempo y concentración inicial de xilosa en la producción de etanol.

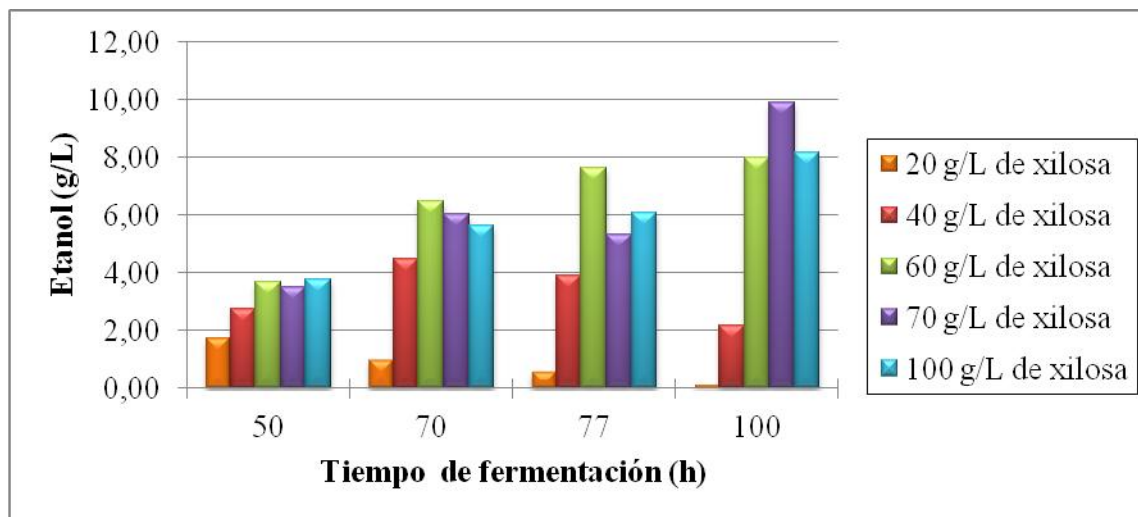


Figura 18. Variación promedio ($n=3$) en la concentración de etanol al transcurrir el tiempo de fermentación, evaluado con la levadura *Candida guilliermondii*, en tratamientos con diferentes concentraciones iniciales de xilosa comercial.

Al haber analizado el consumo de xilosa en la Figura 12, era de esperar que con concentraciones iniciales bajas de xilosa en el medio (20 y 40 g/L), la tendencia fuera a una menor producción de etanol, pues la producción del metabolito depende de la presencia de esta fuente de carbono y bajo esas condiciones se comentó que la xilosa era casi cero a partir de las 70 horas. Por ende la levadura consume el alcohol como posible estrategia de sobrevivencia en la regeneración de los cofactores requeridos, como ya fue comentado.

Arce (2004), Milanés (2007) y Solana (2011) también estudiaron la concentración de etanol en el medio a las 100 horas de fermentación con la levadura X, donde se reportaron valores de 1,74; 1,77 y 1,33 g/L, respectivamente, al iniciar con una concentración de 9 g/L de xilosa comercial. Estos resultados fueron muy similares al obtenido en la fermentación con *Candida guilliermondii* (2,16 g/L) al trabajar con la concentración inicial de 40 g/L de xilosa comercial.

Al analizar diferentes concentraciones iniciales de xilosa comercial, Solana (2011) reporta que la mayor concentración de etanol (6,59 g/L) se obtiene al trabajar con una concentración 39 g/L a las 23 horas de proceso. En este estudio, este valor corresponde de forma similar al tratamiento con 60 g/L a las 77 horas; tiempo en el que ya se ha consumido parte del metabolito producido. Mientras la mayor concentración de etanol se logra al trabajar con 70 g/L a las 100 horas de proceso, fermentación en la que casi no se reporta un consumo del mismo. Por lo que los valores difieren bastante al emplear la levadura *Candida guilliermondii* o la “Cepa X”, observándose que en el primer caso, la concentración de etanol residual depende de cuánto se forma y de qué tan rápido se consume.

En la Figura 18 se observan fluctuaciones en la concentración de etanol en el medio a través del tiempo debido a que, de acuerdo con los resultados presentado por Granström *et al.* (2007), en condiciones limitadas de oxígeno, las levaduras *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis* acumulan etanol según la necesidad de regeneración de NAD^+ , para superar la inhibición causada a la XDH, por exceso de NADH en el medio y así mantener el balance redox, por lo que la cantidad presente en el medio, depende de la necesidad de regeneración de los cofactores.

Lo anterior coincide a su vez con lo expuesto por Hallborn *et al.* (1994), quienes afirman que la producción de xilitol y el consumo de etanol mantienen una relación estequiométrica por medio de la generación del NAD(P), donde por cada mol de etanol convertido en acetato, dos moles de NAD(P) se transforman en NAD(P)H y por cada dos moles de xilitol producido, dos moles de NAD(P) se hacen circular.

Por otra parte, Meinander y Hahn-Hägerdal (1997), mencionan que un exceso de etanol en el medio, también puede inhibir el metabolismo de la xilosa, al interferir en las regiones hidrofóbicas de la membrana y saturar el sistema de transporte, lo cual pudo afectar la eficiencia en el consumo de xilosa cuando se inició el proceso con 100 g/L de xilosa además de la presión osmótica generada por una alta concentración de azúcar en el medio.

De este modo, se infiere que los valores obtenidos en las variables respuesta de concentración de xilosa, concentración de etanol y concentración celular fueron afectados por una interacción entre la variación en la concentración de xilosa comercial inicial y el tiempo de fermentación. No se puede definir el tratamiento que produzca más etanol, el que consuma más xilosa o el que aumente más la concentración celular; únicamente pueden ser evaluadas algunas tendencias conforme transcurre el tiempo de fermentación cuando a su vez se varía la concentración de xilosa inicial en el medio de fermentación.

5.3 Evaluación del proceso fermentativo al variar la concentración inicial de xilosa extraída de residuos de piña y su comparación con xilosa comercial

En el presente trabajo se evaluó la producción de xilitol y otros metabolitos, al variar la concentración inicial de xilosa extraída por proceso químico de hidrólisis de residuos hemicelulósicos de piña. Siguiendo una metodología similar a la utilizada con xilosa comercial pura, se evaluaron fermentaciones con concentraciones iniciales de 60 y 70 g/L de xilosa y se decidió finalizar el proceso a las 70 horas, pues pese a que con la xilosa comercial no se obtuvieron diferencias significativas entre ambas concentraciones, Mussatto & Roberto (2008) enfatizan en la posibilidad de obtener diferencias en los resultados al variar el tipo de xilosa y a la presencia de inhibidores, inclusive cuando los hidrolizados de materiales lignocelulósicos son purificados. Es por esto que, además se compararon los resultados obtenidos entre fermentaciones que se llevaron a cabo con xilosa comercial y fermentaciones con xilosa extraída del residuo de piña. A continuación se presentan los resultados para cada una de las variables respuestas estudiadas.

Se debe tomar en cuenta que con fines de facilitar la interpretación y comparación de los resultados al emplear diferentes tipos de sustrato, se le decidió llamar a la xilosa comercial pura como “xilosa comercial” y a la xilosa extraída de residuos de piña como “xilosa extraída”.

5.3.1 Evaluación de la concentración celular de la levadura *Candida guilliermondii* en fermentaciones iniciadas con xilosa comercial y con xilosa extraída de residuos de piña-

Con respecto a la concentración celular, se determinó con un 95% de confianza, que existe un efecto del tiempo y del tipo de xilosa, de forma independiente sobre la variable respuesta (Cuadro XI del apéndice). Por lo tanto, se procedió a realizar una prueba de Tukey para establecer diferencias entre los promedios de los tratamientos (Cuadro XII del apéndice).

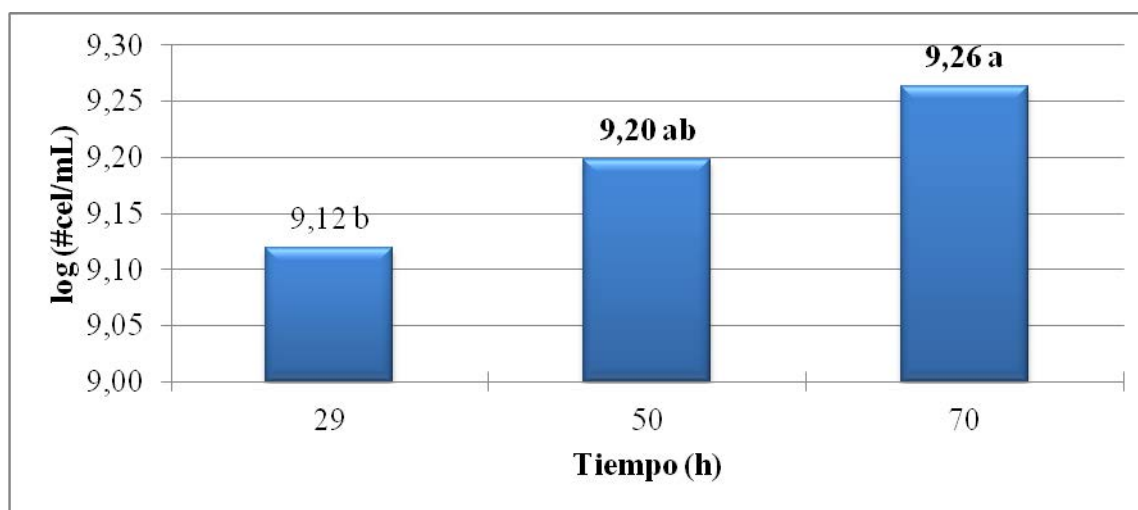


Figura 19. Variación promedio (n=3) en la concentración celular a diferentes tiempos del proceso de fermentación, independientemente de la concentración inicial y del tipo de xilosa, con la levadura *Candida guilliermondii*.

Promedios con diferente letra son estadísticamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

En la Figura 19, se observa que con un 95% de confianza, la población de levaduras es mayor en 0,14 log, cuando el proceso ha transcurrido por 70 horas respecto a la presente a las 29 horas; no obstante no hay diferencias significativas en la concentración celular a esos tiempos y la determinada a las 50 horas. A nivel práctico y microbiológico, menos de un logaritmo no es un aumento relevante en el crecimiento del microorganismo. Por lo que en este estudio, se puede asumir que la concentración celular no cambia entre las 29 y 70

horas, pese a que no se sabe si las células están vivas o muertas por las razones descritas anteriormente.

Asimismo, en la Figura 20, se muestra que hubo diferencias significativas entre los promedios de la concentración celular al variar el tipo de xilosa. Se obtuvo un mayor promedio de concentración celular cuando se trabajó con la xilosa comercial que con xilosa extraída de los residuos de piña.

Al igual que en el caso anterior, a nivel estadístico se dice que las diferencias son significativas, pero a nivel práctico y microbiológico, una diferencia de 0,2 en un ciclo logarítmico no es un efecto físico distintivo, por lo que no se puede asegurar que con un sustrato sintético el microorganismo haya crecido más que con la xilosa extraída. Pues incluso cuando se reporta que hubo un crecimiento celular se habla hasta de un aumento en un 60% en la concentración celular, como lo detalla Virgínio *et al.* (2007) con hidrolizados de bagazo de caña de azúcar, donde se produce 22 g/L de biomasa, al trabajar con una relación de glucosa respecto a xilosa de 1:2,5.

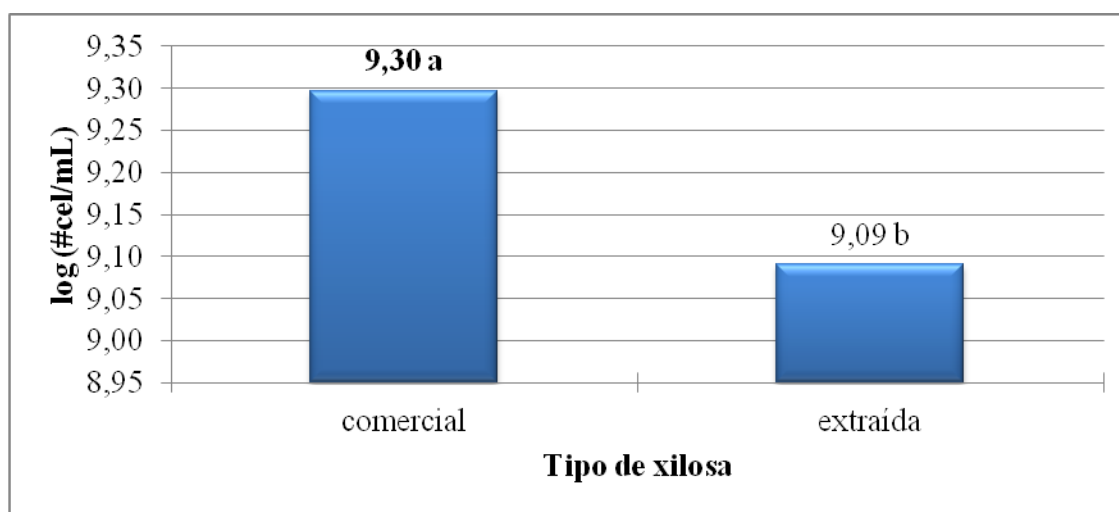


Figura 20. Variación promedio (n=3) en la concentración celular con dos tipos de xilosa, independientemente de la concentración inicial de xilosa comercial, en un periodo de 29 a 70 h de proceso, con la levadura *Candida guilliermondii*.

Promedios con diferente letra son estadísticamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

Lo que sí se puede diferenciar entre el crecimiento en medios con xilosa comercial y medios con xilosa extraída de residuos de piña (Figura 21), es que en el primer caso, la curva de crecimiento es más definida en cuanto a una fase exponencial y otra estacionaria o de estabilidad. Mientras en el segundo caso, la curva de crecimiento tanto con la concentración de 60 g/L de xilosa como con la de 70 g/L, presenta más fluctuaciones, debidas posiblemente a la complejidad del sustrato que presenta compuestos inhibidores del crecimiento celular y que dificultan la adaptación de la levadura en el medio. Incluso, se aprecia que el crecimiento celular con la xilosa extraída fue irrelevante e incluso menor que con la xilosa comercial, pese a que las velocidades de crecimiento fueron muy similares al emplear ambos sustratos, entre 0,011 y 0,025 g/(L h), considerando las dos concentraciones, con base en la Figura 21 y el Cuadro V.

En este estudio con la xilosa extraída de la piña, no se evidencia la producción de metabolitos tales como xilitol o etanol. Al respecto, Mussatto & Roberto (2008), al evaluar las concentraciones de 55, 70 y 95 g/L, reportan la de 70 g/L como la concentración inicial que mejor favorece la producción de xilitol sin afectar el desarrollo microbiano.

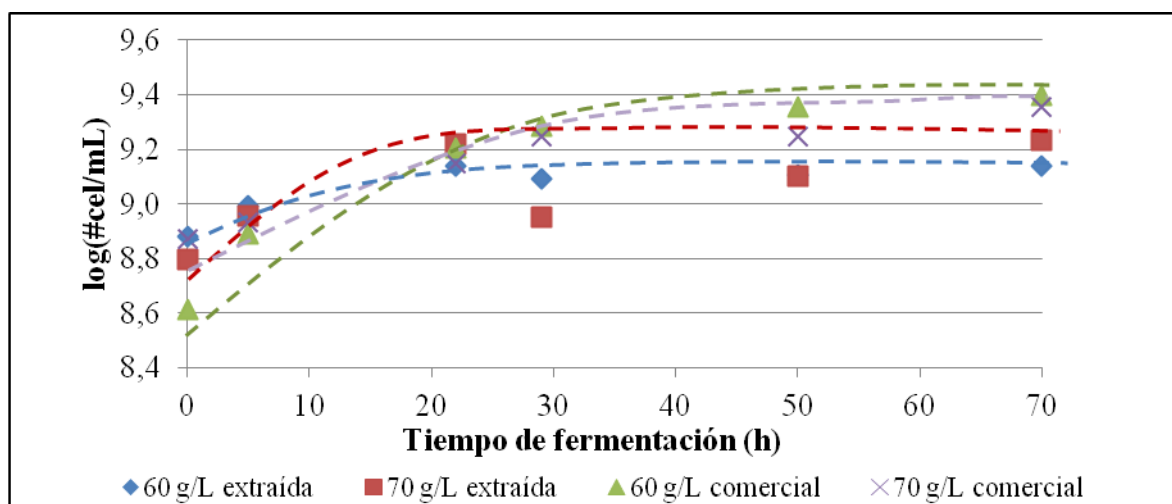


Figura 21. Variación promedio (n=3) en la concentración celular con dos tipos y dos concentraciones iniciales de xilosa al transcurrir el tiempo de fermentación con la levadura *Candida guilliermondii*.

Cuadro V. Velocidad promedio (n=3) de crecimiento de la levadura *Candida guilliermondii* al variar la concentración inicial y el tipo de la xilosa.

Tipo de xilosa	Concentración inicial de xilosa (g/L)	Velocidad de crecimiento (g*L ⁻¹ *h ⁻¹)
Comercial	60	0,025
	70	0,013
Extraída de piña	60	0,011
	70	0,018

Dichos investigadores enfatizan que las levaduras no tienen un comportamiento estándar, sino que tienen diferentes capacidades de bioconversión ante hidrolizados con diversas composiciones químicas, por lo que era de esperar que con xilosa comercial el microorganismo tuviera un comportamiento de crecimiento diferente que con el hidrolizado. Incluso, Mussatto & Roberto (2008) exponen que con *Candida guilliermondii* el diferente desempeño se ve reflejado con rendimientos en la producción de xilitol, que van desde 0,54 g/g con xilosa extraída de bagazo de caña hasta menos de 0,2 g/g con xilosa de material hemicelulósico de eucalipto. En el presente estudio, esta variable es estudiada en la siguiente sección.

5.3.2 Evaluación de la concentración de xilosa residual

Al estudiar la variación promedio de la concentración de xilosa presente en el medio de fermentación, se observa que hay una interacción entre el efecto del tipo de xilosa empleada y el de la concentración inicial. Por lo tanto, el efecto del tipo de xilosa depende de su concentración inicial (apéndice, Cuadro XI), con un 95% de confianza.

Al observar la Figura 22, donde se muestra la variación en la concentración de xilosa en relación con el tipo de xilosa y la concentración inicial de xilosa; se puede inferir que al trabajar con xilosa extraída, entre las 29 y 70 horas de proceso, independientemente de la concentración con la cual se inicie la fermentación, se obtienen valores alrededor de 68 g/L. Caso contrario sucedió en las fermentaciones con la xilosa comercial, en las cuales sí se aprecia un consumo de la fuente de carbono a través del tiempo.

Con base en los resultados obtenidos para las fermentaciones con xilosa extraída, se decidió analizar el comportamiento de otros azúcares presentes en el hidrolizado. En la Figuras 23 y 24, se observa la concentración de glucosa y galactosa a través del tiempo de fermentación. El medio que se preparó con 60 g/L de xilosa extraída contenía $39,8 \pm 5,2$ g/L de glucosa y $16,1 \pm 0,9$ g/L de galactosa; en tanto que el medio con 70 g/L de xilosa contenía $42,1 \pm 0,9$ g/L de glucosa y $9,5 \pm 0,9$ g/L de galactosa.

Es común que cuando se trabaja con hidrolizados (xilosa extraída), se cuente con la posible presencia de otros azúcares como galactosa, fructosa y glucosa, además de compuestos inhibidores de la fermentación, como por ejemplo el hidroximetilfurfural, el furfural y el ácido acético, principalmente (Herazo *et al.*, 2007). Por lo tanto, era de esperar que en un medio de fermentación sintético el consumo de la xilosa se realizara con mayor facilidad que un medio con hidrolizados de residuos hemicelulósicos, que pueden afectar la actividad de la levadura.

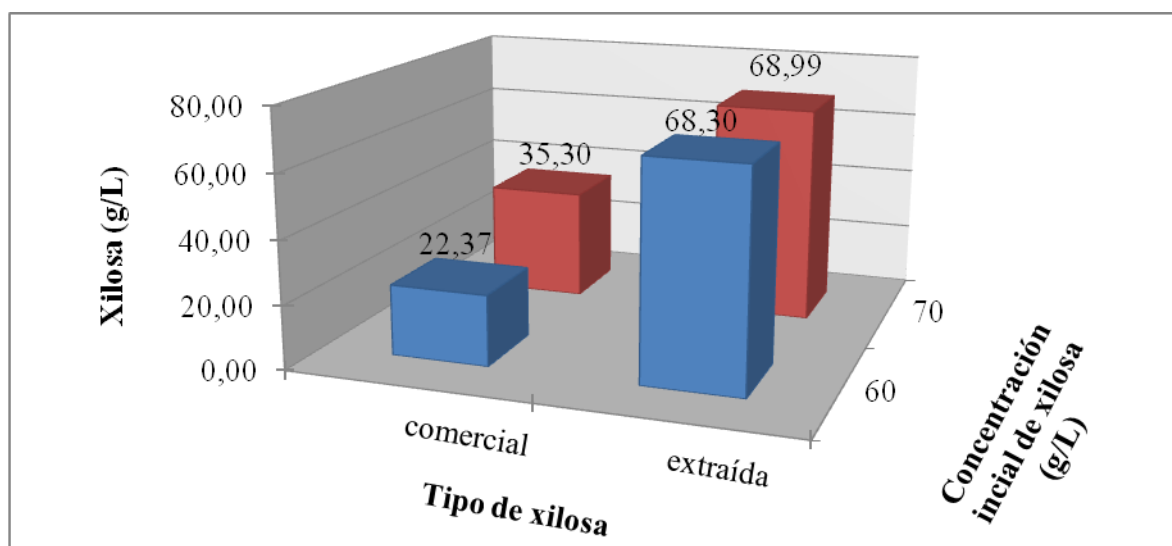


Figura 22. Variación promedio ($n=3$) en la concentración de xilosa residual, al iniciar la fermentación con dos concentraciones iniciales de xilosa (60 y 70 g/L) y dos tipos de xilosa (comercial y extraída), en un periodo de 29 a 70 h de proceso.

Con base en la Figura 22, en la fermentación iniciada con 60 g/L de xilosa extraída, la concentración evaluada entre las 29 y 100 horas de proceso es cercana a los 70

g/L. Esto a su vez, se puede observar con la Figura 23, donde se evalúan cambios de las variables respuesta a través del tiempo de proceso. Las fluctuaciones se pueden asociar a la complejidad en la determinación de la xilosa en presencia de otros azúcares, como manosa y/o fructosa; pues estos presentan un comportamiento muy similar en la detección de las señales en el cromatograma y es posible que se cuantifique una mezcla en lugar de un analito específico. También influye el hecho de trabajar con un sustrato ácido tan complejo, donde algunos compuestos volátiles como el ácido acético presentes pueden evaporarse al transcurrir el tiempo, alterando la concentración inicial de 60 g/L de xilosa. Hay que tomar en cuenta que en el metabolismo de la levadura *Candida guilliermondii*, la xilosa es el sustrato para la producción de otros metabolitos y que el microorganismo no es capaz de producirlo a partir de otra fuente, por lo que por lo tanto no se puede hablar de un aumento real en la concentración de xilosa.

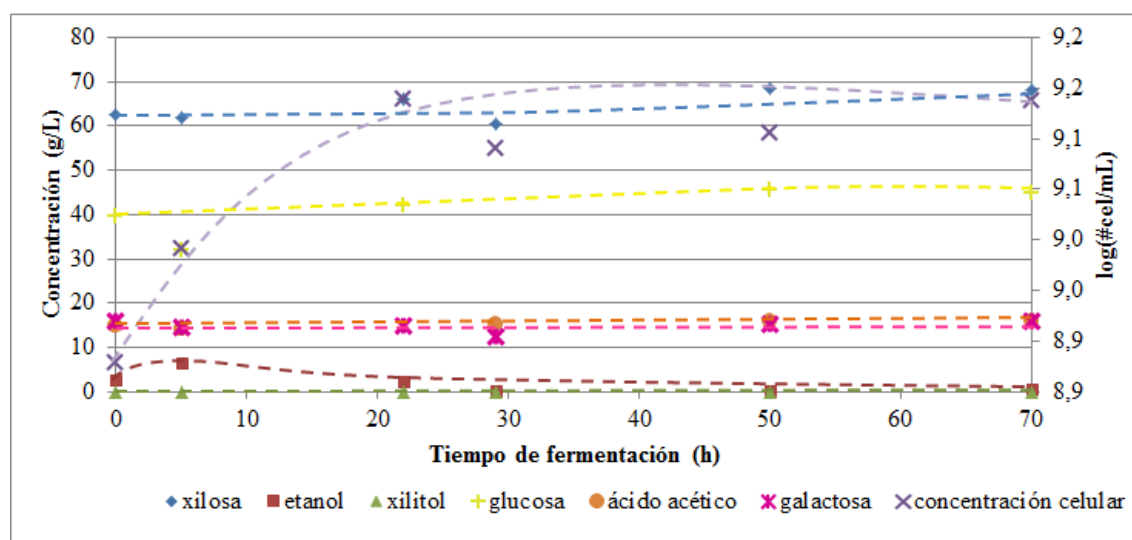


Figura 23. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilosa, xilitol, etanol, glucosa, ácido acético y concentración celular durante un proceso de fermentación, por lote, de 70 horas, empleando una concentración inicial de 60 g/L de xilosa extraída de residuos hemicelulósicos de paña.

Una situación muy similar se presenta al evaluar la fermentación realizada con una concentración inicial de 70 g/L de xilosa extraída, cuyo comportamiento se muestra en la

Figura 24. Aunque en este caso, la concentración de xilosa se mantiene más constante alrededor de los 70 g/L, y las fluctuaciones, se asocian una vez más a errores en la determinación. Además, no se aprecia el consumo de algún azúcar que incluso tenga algún efecto en la producción de xilitol o en el crecimiento celular, variables que serán evaluadas más adelante.

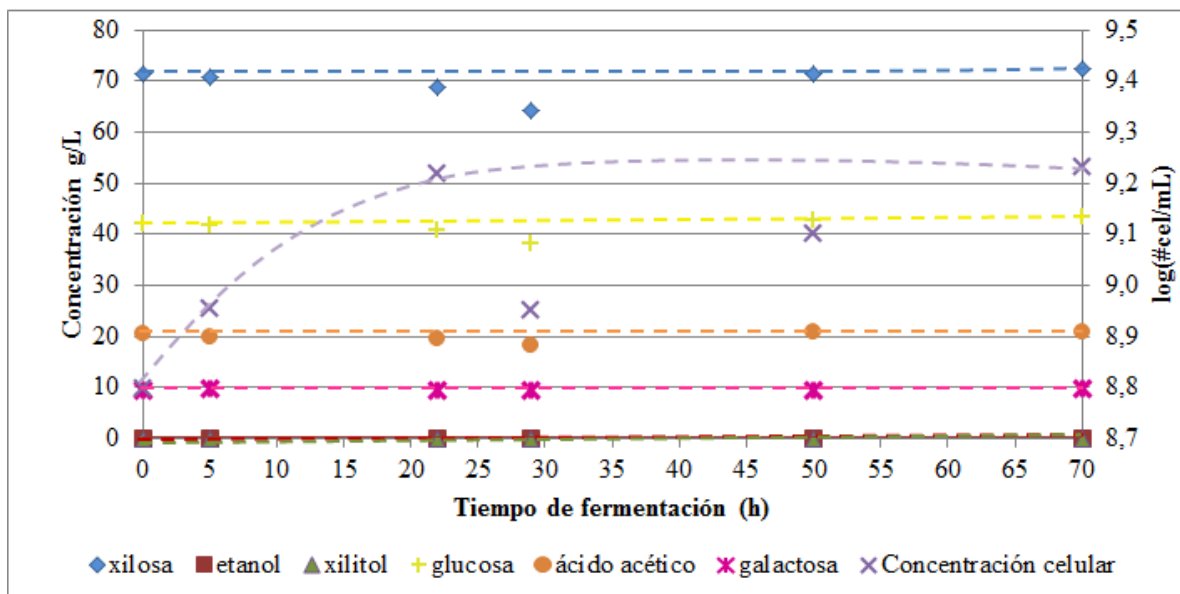


Figura 24. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilosa, xilitol, etanol, glucosa, ácido acético y concentración celular durante un proceso de fermentación, por lote, de 70 horas, empleando una concentración inicial de 70 g/L de xilosa extraída de residuos hemicelulósicos de piña.

En la Figura 25, se presenta la interpretación estadística del efecto que tienen las variables de tiempo y tipo de xilosa sobre la concentración de xilosa residual en el medio. No se aprecia una disminución en la concentración de xilosa conforme avanza el tiempo de fermentación al emplear xilosa extraída de residuos de piña, contrario a lo que sucede con la xilosa comercial. Este hecho se puede confirmar al observar las curvas de la cinética de fermentación cuando se utilizó el sustrato extraído (Figuras 23 y 24), donde a su vez tampoco se observa el consumo de otros azúcares tales como galactosa y glucosa.

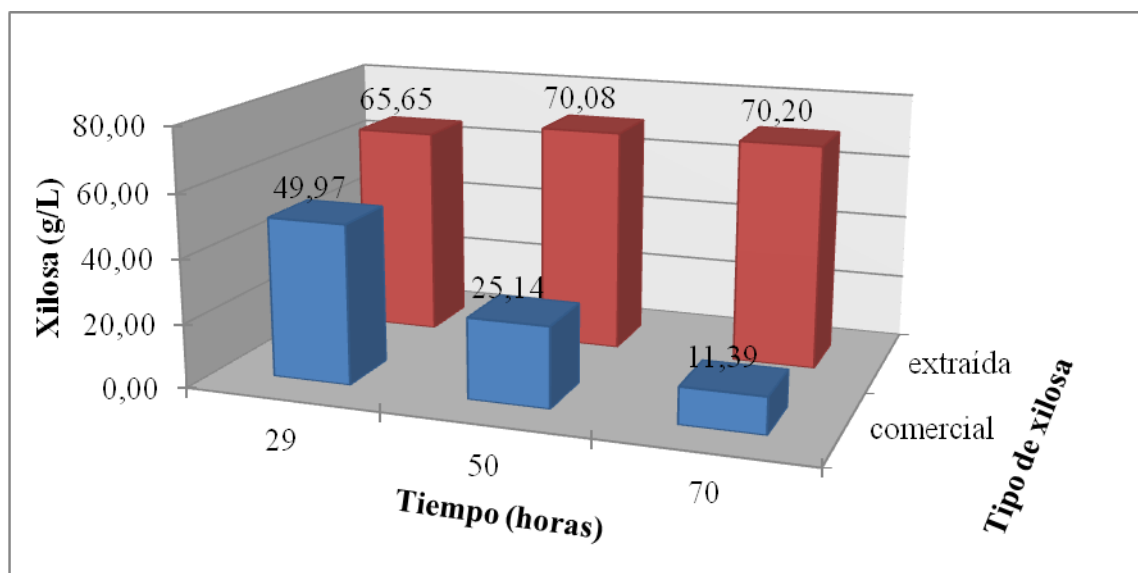


Figura 25. Variación promedio ($n=3$) en la concentración de xilosa al evaluar de dos tipos de xilosa durante tres tiempos de fermentación, independientemente de la concentración inicial de xilosa en el medio.

Las levaduras del género *Candida* por lo general utilizan las hexosas como fuente de carbono y energía antes de emplear las pentosas y por ende la velocidad de utilización de la D-glucosa, D-galactosa y D-fructosa es más mayor que de la D-xilosa, la cual tiende a ser consumida hasta en el periodo de latencia (González *et al.*, 2011). Es esta una de las razones por las que se sospecha la presencia de otros azúcares en el hidrolizado que pueden ser metabolizados de forma preferente y que compitan con la xilosa, la cual no es consumida por el microorganismo.

Pese a la presencia de glucosa y galactosa en el hidrolizado, no se aprecia un consumo real de estos metabolitos, pues sus concentraciones se mantuvieron constantes, a lo largo del proceso de fermentación independientemente de la concentración de xilosa con la cual se inició, como se observa en las Figuras 23 y 24. De este modo, también se puede pensar que las variaciones obtenidas en la población de la levadura no se asocian al consumo de la xilosa ni a los azúcares evaluados.

Lee *et al.* (2003), detallan más sobre el efecto de inhibición que también tienen la D-manosa, D-glucosa y D-fructosa en la actividad de la XR y XDH, donde la D-glucosa y D-manosa reprimen en mayor grado la XR que la XDH, caso contrario a la D-fructosa la cual reprime más la XDH. La actividad de *Candida guilliermondii* para la producción de xilitol, es estrictamente dependiente de la XR, por lo tanto, azúcares como manosa y fructosa, además de glucosa y galactosa, también pudieron estar presentes en el hidrolizado, afectando el transporte y consumo de la xilosa.

5.3.3 Evaluación de la concentración de xilitol producido

Existe una interacción entre el efecto del tipo de xilosa y el del tiempo de proceso sobre la concentración de xilitol en el medio (Cuadro XI del apéndice). En la Figura 26, se aprecia cómo al trabajar con xilosa comercial se lograron obtener mayores concentraciones de xilitol que con la xilosa extraída, la cual no pudo ser metabolizada por el microorganismo.

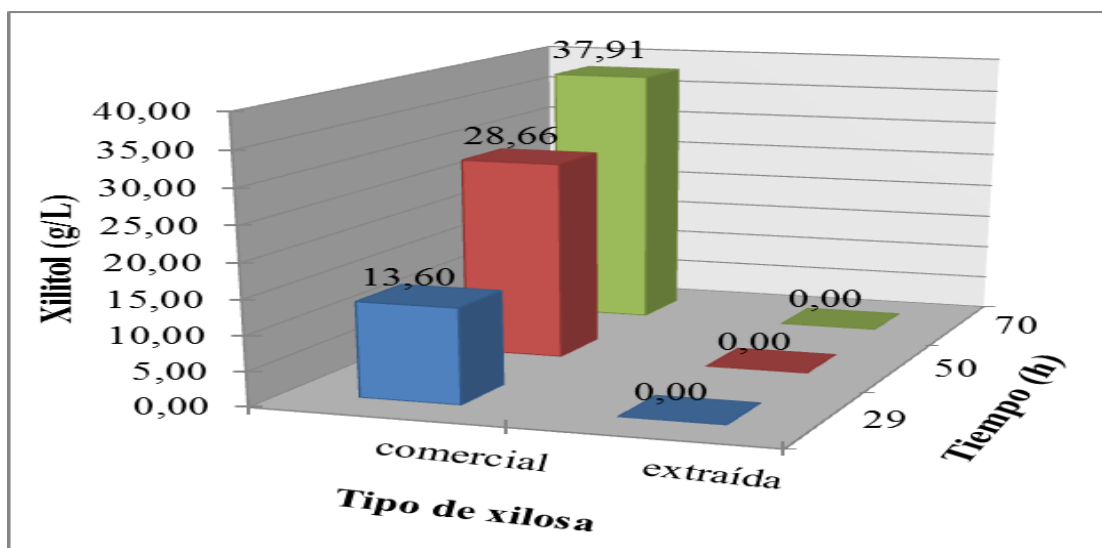


Figura 26. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilitol producido, según el tipo de xilosa empleado en la fermentación a las 29, 50 y 70 horas e independientemente de la concentración de xilosa inicial en el medio.

Se sabe de otros factores que entorpecen la bioconversión de la xilosa en xilitol comúnmente cuando se trabaja con hidrolizados, como lo es la presencia de los

compuestos: hidroximetilfurfural, furfural y ácido acético. En este estudio no fue posible determinar los dos primeros, por no contar con patrones de cuantificación y la metodología necesaria, pero se sabe con certeza que estos son productos asociados a procesos de hidrólisis de materiales hemicelulósicos (Herazo *et al.*, 2007).

Entre los tratamientos para la reducción de dichos inhibidores, está el uso de carbón activado y la adaptación de las levaduras en el hidrolizado (Herazo *et al.*, 2007). En este estudio, aunque la caracterización del hidrolizado no forma parte de los objetivos planteados, se debe mencionar que el sustrato se sometió a una serie de etapas de purificación, incluyendo tratamientos con carbón activado (Blanco, 2012). Sin embargo según Mussatto & Roberto (2004), con este método no se asegura la eliminación completa de dichos compuestos, lo cual se pudo comprobar al encontrar la presencia de ácido acético en una relación de hasta 2/5 respecto a la xilosa. Además, dichos autores aseguran que este ácido solubiliza los lípidos de la membrana celular, de modo que se altera el transporte de grupos fosfato y la morfología celular, lo cual pudo tener un efecto sinérgico de inhibición, junto con la presencia de los azúcares antes mencionados, en el crecimiento celular, la producción de xilitol e incluso en el consumo de las hexosas.

Un comportamiento muy similar se presentó en el estudio realizado por Rodrigues *et al.* (2003), en el cual se evaluó el efecto de los diferentes valores de pH controlados en el medio de fermentación. La coincidencia se presenta cuando se estudia el sustrato con un valor de pH 5,5; pues en él se da una fase adaptación que dura alrededor de 80 h, donde no se observa la producción de xilitol y/o aumento de biomasa, ni tampoco consumo de xilosa y/o producción de ácido acético. Posterior a este período, se señala que tanto el crecimiento celular como el consumo de xilosa se restauran.

Cuando se trabajó con el hidrolizado de residuos de piña, en la reducción de compuestos tóxicos del sustrato, como etapa final del proceso, se ajusta el pH a 5,4; valor muy cercano al evaluado por Rodrigues *et al.* (2003). Sin embargo, no fue posible observar una posible restauración del sistema como en el anterior estudio, debido a que las fermentaciones culminaron a las 70 horas. Estos autores expresan que la inhibición causada

por el ácido acético se disminuye cuando se trabaja con valores de pH superiores al del pKa del ácido acético (4,8). También, Roberto *et al.* (1996) observaron una fase de retardo en una fermentación con *Candida guilliermondii* empleando como sustrato un hidrolizado de paja de arroz a un pH 4,5, pero no al trabajar con valores de pH 6,0. De modo, que ambos autores coinciden en que este suceso se logra superar mediante la elevación del pH inicial del sustrato con disoluciones de NaOH, para contrarrestar el efecto de inhibición causado por el ácido acético, situación que debe ser considerada cuando se trabaja con hidrolizados con altas concentraciones de ácido acético.

Debido a que no hubo producción de xilitol al llevar a cabo la fermentación con xilosa extraída de residuos de piña, los rendimientos en producción de xilitol y la productividad por ende no se reportan.

Por lo tanto, el patrón general observado en levaduras como *Candida guilliermondii*, en cultivos que tienen mezcla de azúcares, es la inhibición o retardo de la utilización de la xilosa por presencia de glucosa en el medio, reduciéndose el rendimiento y productividad de xilitol. Por el momento, los mayores rendimientos con *Candida guilliermondii* se han reportado con hidrolizados a partir de bagazo de caña con valores del 80% (Alves *et al.*, 1998) y a partir de la paja de trigo con resultados del 90% (Canilha *et al.*, 2004).

Por otra parte, Martínez *et al.* (2003), señalan que si la concentración de glucosa en el medio de fermentación es baja y también hay presencia de ácido acético, el efecto tóxico causado por el ácido durante el metabolismo de la xilosa, se ve disminuido. Respecto al mismo tema, Mussatto *et al.* (2006) recomiendan trabajar con una concentración menor de 1/5 en relación con la xilosa, pues un valor mayor se considera suficiente para causar inhibición, por lo mencionado anteriormente.

De este modo, como propuesta de mejora, se puede analizar disminuir la concentración de glucosa inicial en el medio de fermentación, ya que se trabajó con una concentración inicial alrededor de los 40 g/L de glucosa (ver Figuras 31 y 32 del apéndice), que representa una relación de hasta dos tercios con respecto a la xilosa extraída en el medio. La estrategia puede basarse en realizar pretratamientos al material lignocelulósico,

que además contiene una cantidad importante de pulpa de piña rica en azúcares, y con ello, también disminuir el efecto causado por el ácido, presente en el hidrolizado de piña, sobre el metabolismo de la levadura.

Silva *et al.* (2005), señalan que para el crecimiento y producción de xilitol por *C. guillermondii*, en presencia de cosustratos como glucosa y arabinosa, cuando las concentraciones de estos azúcares están por debajo de los 10g/L, se mejora bioenergéticamente la conversión de xilosa a xilitol, llevada a cabo con hidrolizados que contiene una cantidad inicial de xilosa de 70g/L. Sin embargo, este efecto favorable no se apreció en el presente estudio, ya que la cantidad inicial de glucosa superó los 40 g/L y la levadura no fue capaz de metabolizarlos.

También se debe considerar que fue necesario concentrar los hidrolizados, pues las cantidades de xilosa obtenidas por el proceso de hidrólisis, no eran suficientes como para formular los medios de fermentación con 60 ó 70 g/L xilosa. En este proceso de concentración se pueden aumentar los niveles de los compuestos tóxicos, incluyendo ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural y derivados de la lignina, los cuales son potenciales inhibidores del metabolismo microbiano (Mussatto & Roberto, 2004). Por lo que para evitar etapas de concentración, se podría pensar en el hecho de trabajar con concentraciones de xilosa menores, cuando estas no son totalmente puras.

Por lo tanto, se puede inferir que bajo las condiciones estudiadas, la aplicación bioquímica con fines industriales, es un punto de investigación actual, donde por el momento la reducción química de la xilosa a xilitol es todavía la más competitiva en cuanto a su producción industrial.

5.3.4 Evaluación de la concentración de etanol producido

Con respecto a la variable de concentración de etanol, se determinó que existe una interacción entre el efecto del tiempo y el de concentración inicial de xilosa sobre la producción de este metabolito (Cuadro XI del apéndice). En la Figura 27, se observa que hay una tendencia a un aumento en la concentración del etanol conforme avanza el tiempo

de la fermentación, para ambas cantidades de xilosa inicial analizadas. En el caso de la fermentación que se inició con 60 g/L de xilosa, el aumento en la concentración de etanol fue de 3,06 g/L, entre las 50 y 100 horas, mientras que cuando se inició con 70 g/L el aumento fue de 2,04 g/L.

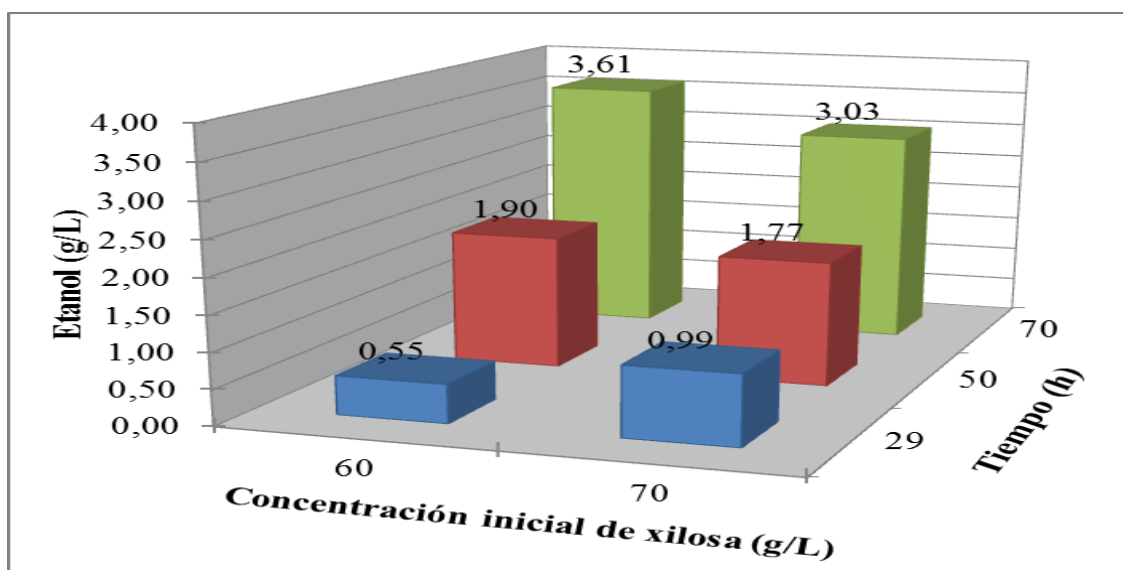


Figura 27. Variación promedio (n=3) en la concentración etanol al evaluar dos concentraciones iniciales de xilosa a las 29, 50 y 70 horas de fermentación, independientemente del tipo de xilosa empleado.

Asimismo, existe una interacción entre el efecto del tiempo y el tipo de xilosa con que se trabajó sobre la concentración de etanol (Cuadro XI del apéndice). En la Figura 28, se evidencia una mayor producción de etanol en el tiempo cuando la fermentación se llevó a cabo con xilosa comercial, reportándose un aumento de 4,8 g/L entre las 29 y 70 horas. Sin embargo, las concentraciones de etanol con la xilosa extraída de residuos de piña, son prácticamente cero en los tiempos de fermentación analizados.

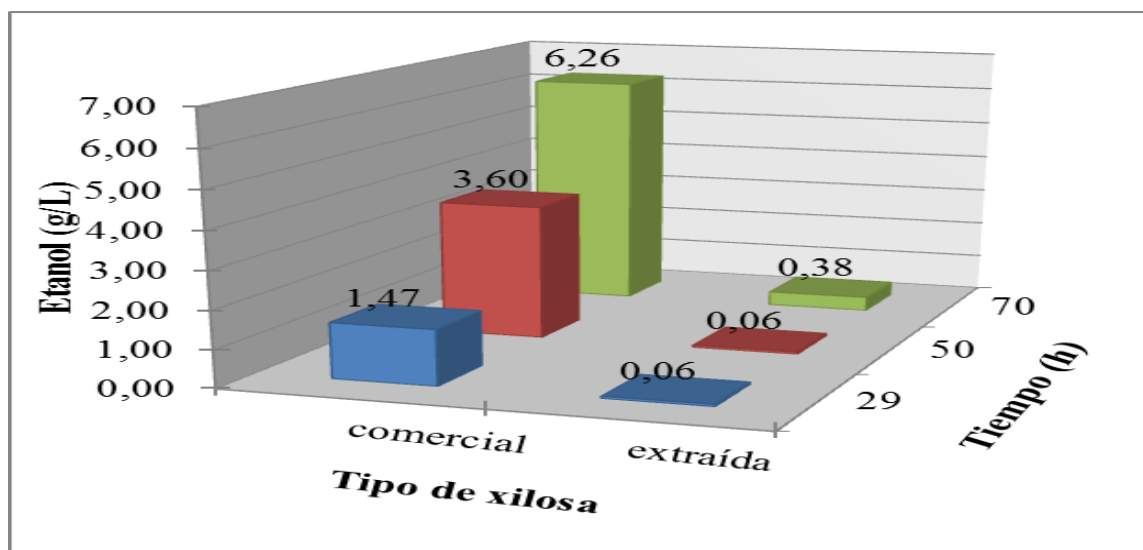


Figura 28. Variación promedio (n=3) en la concentración de etanol para dos tipos de xilosa a las 29, 50 y 70 horas de fermentación, independientemente de la concentración inicial de xilosa en el medio.

La producción de etanol al emplear xilosa comercial como sustrato, se debe a la necesidad de mantener un balance redox en el medio de fermentación, que estimula a la levadura al consumo de la xilosa. Sin embargo, este comportamiento no es evidente al utilizar como sustrato la xilosa extraída de residuos de piña.

Yablochkova *et al.* (2003) afirman que sustratos ricos en glucosa y que contienen cantidades insignificantes de D-xilosa, son prometedores solamente para la producción de etanol con levaduras como *Candida guilliermondii*. Asimismo, en una investigación realizada por Lee *et al.* (2003), sobre producción de xilitol con la levadura *Candida guilliermondii*, se determinó que en presencia de D-glucosa y D-fructosa, el etanol es el único producto de la fermentación. Rodrigues *et al.* (2003) reportan concentraciones de 6,75 g/L de etanol en un medio con concentraciones iniciales de 70 g/L de xilosa y tan sólo 4,4 g/L de glucosa.

En el presente estudio, al utilizar el hidrolizado de residuos hemicelulósicos de piña, se produjeron 0,38g/L de etanol en 70 horas de fermentación, tal y como se muestra en la Figura 28. Este valor es considerado muy pequeño, en comparación con el reportado por Rodrigues *et al.* (2003) y respecto a la concentración inicial de xilosa, glucosa y galactosa. El resultado se puede asociar a que el microorganismo no consumiera la xilosa, no creciera, no produjera xilitol y por ende no necesitara producir etanol para mantener el balance redox en el ciclo del metabolismo. Lo anterior pudo ser consecuencia de la presencia de otros azúcares no identificados en el medio de fermentación, debido a la complejidad del sustrato o incluso errores asociados a la medición.

6. CONCLUSIONES

6.1 Evaluación del comportamiento cinético de la levadura, el consumo de xilosa y la producción de metabolitos.

- En las primeras 22 horas del proceso de fermentación, la levadura *Candida guilliermondii* utiliza la xilosa como su única fuente de carbono para crecimiento celular (fase log).
- En la fase estacionaria del crecimiento celular la levadura comienza a producir xilitol.
- Bajo las condiciones experimentales estudiadas, el etanol se produce en la etapa estacionaria del ciclo de vida del microorganismo.

6.2 Evaluación de la capacidad de producción de xilitol de la cepa *Candida guilliermondii* al variar la concentración inicial de xilosa comercial a nivel de laboratorio.

- Con respecto a la concentración inicial de xilosa, los mayores rendimientos en la producción de xilitol, se obtienen al iniciar el proceso de fermentación con 60 y 70 g/L de xilosa comercial, con valores de 66 y 67%, respectivamente.
- Las mayores productividades en la producción de xilitol, con respecto a la concentración inicial de xilosa, se obtienen al iniciar el proceso de fermentación con 60 y 70 g/L de xilosa comercial, con valores de 0,45 y 0,52 g de xilitol*L⁻¹*h⁻¹, respectivamente.
- Las mayores productividades de xilitol, con respecto al tiempo, se producen a las 50 y 70 horas del proceso de fermentación, con valores de 0,36 y 0,32 g de xilitol*L⁻¹*h⁻¹ respectivamente.
- La producción de etanol en el medio no está asociada de forma directa con la concentración inicial de xilosa.

- No se evidencia una conversión de xilitol a xilulosa, asociado a una disminución en la concentración de xilitol, en un proceso de 100 horas de fermentación con xilosa comercial.

6.3 Evaluación de la producción de xilitol de la cepa *Candida guilliermondii* utilizando xilosa extraída de los residuos de piña a nivel de laboratorio y comparación con la fermentación realizada con xilosa comercial pura.

- La levadura *Candida guilliermondii* no consumió la xilosa, al utilizar en la fermentación el sustrato extraído de residuos de piña.
- Hay un mayor crecimiento celular de *Candida guilliermondii* en fermentaciones que emplean como medio xilosa comercial que cuando se utiliza un sustrato a partir de hidrolizados de residuos de piña.
- Se produce un mayor aumento en la concentración de etanol, a través del tiempo, en fermentaciones realizadas con el medio sintético que respecto a fermentaciones que utilizan como sustrato xilosa extraída de residuos de piña.
- El rendimiento y la productividad de xilitol, con el medio que contiene xilosa extraída por hidrólisis química no se pudieron establecer al no producirse xilitol.
- Bajo las condiciones estudiadas, la aplicación bioquímica con fines industriales, es un punto de investigación actual, donde por el momento la reducción química de la xilosa a xilitol es todavía la más competitiva en cuanto a su producción industrial.

7. RECOMENDACIONES

- Considerar la adición de glucosa al proceso fermentativo con xilosa comercial, en una proporción menor a 1/5 respecto a la xilosa comercial, según recomendaciones de Mussato *et al.* (2006) para la mejora del rendimiento y productividad de xilitol en el medio sintético.
- Considerar la disminución de la concentración de la glucosa en el proceso de fermentación con xilosa extraída de residuos de piña, en proporciones menores a 1/5 con respecto a la xilosa, con el fin de disminuir el estrés osmótico causado a la levadura y no alterar el consumo de la xilosa como fuente de carbono.
- Evaluar la adición de glicerol al medio de fermentación con el fin de mejorar los rendimientos empleando una menor concentración de xilosa comercial, al ayudar a mantener el balance redox.
- Trabajar con concentraciones más bajas de xilosa extraída de residuos de piña, de forma que se pueda evaluar fermentaciones con hidrolizados menos concentrados.
- Determinar la presencia de otros azúcares además de glucosa, xilosa y galactosa, tales como arabinosa, manosa y fructosa, en el hidrolizado de piña, que puedan ser competitivos en el consumo de la xilosa, además de los compuestos HMF y furfural considerados inhibidores de la fermentación.
- Realizar fermentaciones, bajo las mismas condiciones, con hidrolizados cuyo valor de pH sea mayor a 5,4 con el fin de contrarrestar el efecto inhibitor del ácido acético presente en el medio.
- Evaluar el comportamiento de la levadura *Candida guilliermondii*, por tiempos mayores de las 70 horas de proceso, bajo las mismas condiciones empleadas en la fermentación con la xilosa extraída de residuos de piña,

con el fin de determinar si el microorganismo logra adaptarse después de este tiempo.

- Establecer una metodología que permita hacer distinción entre si el microorganismo se encuentra vivo o muerto durante la fermentación, tanto en la que se inició con xilosa comercial, como con xilosa extraída de residuos de piña.
- Determinar y establecer un método de cuantificación de xilulosa en los diferentes tiempos de muestreo establecidos en la fermentación.
- Considerar el uso de otros tipos de residuos con un mayor contenido de hemicelulosa que mejoren los rendimientos de extracción de xilosa, para incluso evitar etapas de concentración del hidrolizado.
- Evaluar la capacidad del proceso fermentativo para un escalamiento a nivel piloto.

8. REFERENCIAS

- ALVES, M., SILVÉRIO, S. & MAUGERI, F. 2004. Estudo de processo itegrado de produção de xilitol por fermentação. Universida de Estadual de Campinas, São Paulo.
- ARCE, L. 2004. Evaluación de la producción de xilitol a nivel de laboratorio, por vía fermentativa a partir de xilosa comercial. Tesis de Licenciatura en Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica, San José.
- ARGUEDAS, L. 2011. Condiciones de mantenimiento de la cepa *Candida guilliermondii* ATCC. Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica. Comunicación personal.
- ARRUDA, P. & FELIPE, M. 2008. Role of glycerol addition on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. *Current Microbiology*. 58: 274-278.
- BARQUERO, M. (mbarquero@nacion.com). 2011. Costa Rica se mantiene como el mayor exportador de piña. INTERNET: <http://www.nacion.com/2011-12-21/Economia/Costa-Rica-se-mantiene-comoel-mayor-exportador-mundial-de-pina.aspx>
- BELITZ, H. & GROSCH, W. 1997. Química de los Alimentos. 2a edición. Acribia, Zaragoza.
- BLANCO, A. Proceso de hidrólisis de residuos de piña para obtención de xilosa. Centro de Investigaciones en Productos Naturales. Comunicación personal. 2012.
- BRANCO, R., SANTOS, J., MURAKAMI, L., MUSSATTO, S., DRAGONE, G. & SILVA, S. 2006. Xylitol production in a bubble column bioreactor: Influence of the aeration rate and immobilized system concentration. *Process Biochemistry*. 42: 258-262.
- CANILHA, L., ALVES, L., ALMEIDA, S., JOÃO, B. & GIULIETTI, M. 2007. Efecto del solvente sobre la solubilidad de los azúcares xilosa, glucosa y xilitol. *Alimentos Ciencia e Ingeniería*. 16(2): 158-160.

- CANILHA, L., CARVALHO, W., ALMEIDA, M. & ALMEIDA, J. 2008. Xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate: hydrolysate detoxification and carbon source used for inoculum preparation. *Brazil Journal of Microbiology*. 39: 333-336.
- CARVALHO, W., SILVA, S., SANTOS, J. & CONVERTI, A. 2003. Xylitol production by Ca-alginate entrapped cells: comparison of different fermentation systems. *Enzyme and Microbial Technology*. 32: 553-559.
- COMEX. 2012. Portal estadístico de comercio exterior. INTERNET: <http://servicios.procomer.go.cr/estadisticas/inicio.aspx>
- EMODI, A. 1978. Xylitol its properties and food applications. *Food Technology*. 31 (1): 28-32.
- FDA. 2004. Net Carbohydrates. INTERNET: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr20/es/print.html>.
- FELIPE, M., VIEIRA, D., VITOLO, M., SILVA, S., ROBERTO, I. & MALCILHA, I. 1995. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. *Journal Basic Microbiology*. 35(3): 171-177.
- FELIPE, M., VITOLO, M. & MANCILHA, I. 1996. Xylitol formation by *Candida guilliermondii* grown in a sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate: effect of aeration and inoculum adaptation. *Acta Biotechnologica*. 16(1): 73-79.
- FORNAGUERA, J. & GÓMEZ, G. 2007. *Bioquímica: los carbohidratos y su metabolismo*. Universidad Estatal a Distancia, San José.
- GALÁRRAGA, E. 2010. *Química de los Alimentos*. 2a ed. UTC, Ecuador.
- GONZÁLEZ, J., ALVAREZ, M., ORNELAS, L. & ZAMUDIO, M. 2011. Producción y aplicaciones biotecnológicas del xilitol. *Biotechnología*, 15(2): 22-47.

- GRANADOS, E. 2012. Piña se cuele en primer lugar de exportaciones agrícolas. INTERNET: <http://www.nacion.com/2012-07-20/Economia/pina-se-cuela-en--primer-lugar-de-exportaciones-agricolas-.aspx>
- GRANSTRÖM, T. 2002. Biotechnological production of xylitol. Thesis Dr. Philosophy. Helsinki University of Technology. Espoo.
- GRANSTRÖM, T., IZUMORI, K. & LEISOLA, M. 2007. A rare sugar xylitol. Part I: the biochemistry and biosynthesis of xylitol. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74: 277-281.
- HALLBORN, J., GORWA, M., MEINANDER, N., PENTTILÄ, M., KERÄNEN, S. & HAHN-HÄGERDAL, B. 1994. The influence of cosubstrate and aeration on xylitol formation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing the XYL1 gene. *Applied Microbiology and Biotechnology* 42:326-333.
- HARRIS, S. 2003. Diabetes: Canadian diabetes association clinical practice guidelines for the prevention and management of diabetes in Canada. *Canadian Journal of Diabetes*. 27: 464-475.
- HERAZO, I., RUIZ, D. & ARRAZOLA, S. 2007. Bioconservación de xilosa a xilitol por *Candida guilliermondii* empleando cascarilla de arroz (*Oriza sativa*). *Temas Agrarios*. 14(2): 22-40.
- HERNÁNDEZ, A. 2007. El xilitol: un edulcorante natural. *Crisol*. 17: 32-33.
- HERNÁNDEZ, A. 2012. Informe final proyecto FI-154-08: Producción biotecnológica de xilitol a partir de xilosa obtenida de desechos agroindustriales de la piña. Centro de Investigaciones en Productos Naturales, Universidad de Costa Rica. Fondo de Incentivos, Ministerio de Ciencia y Tecnología.
- HOLLINGSWORTH, P. 2002. Sugar replacers expand product horizons. *Food Technology*. 56(7): 24-45.
- HUERTA, G., UTRILLA, J., HERNÁNDEZ, G., BOLÍVAR, F., GOSSET, G. & MARTÍNEZ, A. 2005. Ingeniería metabólica para aumentar el flux y el

- rendimiento de etanol en *Escherichia coli* etanológica. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 4(001): 25-36.
- HYNFRAY, C., JOUENE, T., MIGNOT, L. & JUNTER, G. 1995. Influence of oxygenation level on D-xylose fermentation by free and agar-entrapped cultures of *Candida shehatae*. Applied microbiology and biotechnology. 42: 682-687.
- HYVÖNEN, L., KOIVISTOINEN, P. & VOIROL, F. 1982. Food technological evaluation of xylitol. Advances in Food Research. 28: 373-403.
- LARRAURI, J., RUPÉREZ, P. & SAURA, F. 1997. Pineapple shell as a source of dietary fiber with associated polyphenols. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45: 4028-4031.
- LEE, J., KOO, B. & KIM, S. 2003. Cloning and characterization of the xyl1 gene, encoding an NADH-preferring xylose reductase from *Candida parapsilosis*, and its functional expression in *Candida tropicalis*. Applied and Environmental Microbiology. 69: 6179-6188.
- LY, K., RIEDY, C., MILGROM, P. & ROTHEN, M. 2006. Xylitol, sweeteners and dental caries. Pediatric Dentistry. 28(2): 154-163.
- MACÍAS, M. 2009. Clonación y caracterización de los genes de la xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa de un aislado autóctono de *Candida sp.* Tesis de Experiencia Recepcional. Universidad Veracruzana, Veracruz.
- MARTINEZ, E., SILVA, S., ALMEIDA, J., SOLENZAL, A. & FELIPE, M. 2003. The influence of pH and dilution rate on continuous production of xylitol from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *C. guilliermondii*. Process Biochemistry. 30(2003):1677-1683.
- MARTINEZ, E., VILLAREAL, M., ALMEIDA, J., SOLENZAL, A., CANILHA, L. & MUSATTO, S. 2002. Uso de diferentes materias primas para la producción biotecnológica de xilitol. Ciencia y Tecnología Alimentaria. 3(005): 295-301.

- MEINANDER, N. & HAHN-HÄGERDAL, B. 1997. Fed.batch production with two recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing XYL1 at different levels, using glucose as a cosubstrate: A comparison of production parameters and strain stability. *Biotechnology and Bioengineering*. 54(4): 391-399.
- MILANÉS, T. 2007. Evaluación de la producción de xilitol a nivel piloto, por vía fermentativa a partir de xilosa comercial. Tesis Lic. en Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- MONTERO, M. & CERDAS, M. 2005. Guías técnicas del manejo poscosecha para el mercado fresco: piña (*Ananas comosus*). MAG, San José.
- MONTAÑES, F., FORNARI, T., IBÁÑEZ, E., SRINIVAS, K., ZHANG, D. & KING, J. 2009. Solubility of carbohydrates in subcritical water. INTERNET: http://www.isasf.net/fileadmin/files/Docs/Arcachon/posters/p20-P143%20King%20Proceedings_ISSF_2009_carbohydrates_solubilities.pdf
- MORA, M. Asesoría en metodologías para la inoculación del microorganismo en el medio de fermentación, para el proyecto 054: Desarrollo de un estudio técnico-económico para la valoración del desecho de la industria procesadora de piña nacional en la producción de L (+) ácido láctico y xilitol. CIBCM, San José. Comunicación personal. 2011
- MUSSATTO, S., MACHADO, E., CARNEIRO, L. & TEIXEIRA, J. 2012. Sugar metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. *Applied Energy*. 92: 763-768.
- MUSSATTO, S. & ROBERTO, I. 2003. Xylitol production from high xylose concentration: evaluation of the fermentation in bioreactor under different stirring rates. *Journal of Applied Microbiology*. 95: 331-337.
- MUSSATTO, S. & ROBERTO, I. 2004. Kinetic behavior of *Candida guilliermondii* yeast during production from highly concentrated hydrolysate. *Process Biochemistry*. 39: 1433-1439.

- MUSSATTO, S. & ROBERTO, I. 2008. Establishment of the optimum initial xylose concentration and nutritional supplementation of brewer's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Process Biochemistry*. 43: 540-546.
- MUSSATTO, S., SILVA, C. & ROBERTO, I. 2006. Fermentation performance of *Candida guilliermondii* for xylitol production on single and mixed substrate media. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72:681-686.
- NIGAM, P. & SING, D. 1995. Processes for fermentative production of xylitol a sugar substitute. *Process Biochemistry*. 30(2): 117-124.
- OIA. 2012. Edulcorantes alternativos en un contexto de altos precios del azúcar. *MECAS*. 12(04):1-59.
- PARAJÓ, J., DOMÍNGUEZ, H. & DOMÍNGUEZ, J. 1998. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresource Technology*. 65: 191-201.
- RAMÍREZ, K., ROJAS, O., ALVARADO, P. & VEGA, J. 2012. Obtención de la xilosa a partir de desechos lignocelulósicos de la producción y proceso industrial de la piña (*Ananas comusus*). *UNICIENCIA*. 26: 75-89.
- ROBERTO, I., SILVA, S., FELIPE. M., MANCILHA, I. & SUNAO, S. 1996. Bioconversion of rice straw hemicellulosic hydrolyzate for the production of xylitol-effect of pH and nitrogen source. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 58: 339-347.
- RODRIGUES, R., FELIPE, M., ROBERTO, I. & VITOLO M. 2003. Batch xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate at controlled pH values. *Bioprocess Biosystems Engineering*. 26: 103-107.

- RODRÍGUEZ, A. 2012. 685 productos costarricenses tienen potencial exportable a Noruega. INTERNET: <http://www.nacion.com/2012-08-07/Economia/685-productos-costarricenses-tienen-potencial-exportable-a-Noruega.aspx>
- ROLDÁN, C. 2008. El sector agrícola y pesquero: aspectos relevantes del 2008. Decimocuarto Informe del Estado de la Nación en Desarrollo Humano y Sostenible. San José.
- ROMERO, A. 2003. Desarrollo de una cepa etanológica a partir de *Bacillus subtilis*. Tesis en Maestro en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca.
- RUSSEL, I. 2003. The alcohol: understanding yeast fundamental textbook. Nottingham University Press, Nottingham.
- SANTOS, J., CONVERTI, A., CARVALHO, W., MUSATTO, S. & SILVA, S. 2005. Influence of aeration rate and carrier concentration on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolyzate in immobilized-cell fluidized bed reactor. *Process Biochemistry*. 40(2): 113-118.
- SEGURA, J. & NAVARRETE, R. 2012. Enzimas microbianas para producir moléculas con potencial uso terapéutico, el caso del xilitol. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*. 69(600): 25-29.
- SENE, L., FELIPE, M., VITOLO, M., SILVA, S. & MANCILHA, I. 1998. Adaptation and reutilization of *Candida guilliermondii* cells for xylitol production in bagasse hydrolysate. *Journal of Basic Microbiology*. 38: 61-69.
- SENE, L., CONVERTI, A., ZILLI, M., FELIPE, M. & SILVA, S. 2001. Metabolic study of the adaptation of the yeast *Candida guilliermondii* to sugar cane bagasse hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57: 738-743.
- SIGMA-ALDRICH. 2013. Catálogo de productos. INTERNET: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/X1500?lang=en®ion=CR>

- SILVA, D. & FELIPE, M. 2006. Effect of glucose:xylose ratio on xylose reductase and xylose dehydrogenase activities from *Candida guilliermondii* in sugar cane bagasse hydrolysate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 81: 1294-1300.
- SKOOG, K. & HAHN-HÄGERDAL, B. 1990. Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipis*. *Applied and environmental microbiology*. 56 (11): 3389-3394.
- SOLANA, M. 2011. Producción biotecnológica y producción de xilitol a nivel de laboratorio usando diferentes concentraciones de xilosa. Tesis Lic. en Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- TEJEDA, L., TEJEDA, C., VILLABONA, A., ALVEAR, M., CASTILLO, C., HENAO, D. MARIMÓN, W., MADARIAGA, N. & TARÓN, A. 2010. Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de la cáscara de naranja y piña. *Revista Educación en Ingeniería*. 10: 120-125.
- VANEGAS, I., YEPES, M. & RUIZ, S. 2004. Producción de xilitol a partir de levaduras nativas colombianas. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 6(2): 31-36.
- VARGAS, A. alevargas@nacion.com. 2010. País no sabe qué hacer con 11000 toneladas diarias de desechos. San José, La Nación. INTERNET: <http://www.nacion.com/2010-06-05/AldeaGlobal/Relacionados/AldeaGlobal2393621.aspx>
- VELÁZQUEZ, C. 2010. Procesos Biotecnológicos. Escuela de Tecnología de Alimentos, San José. Comunicación personal.
- VIDAL, R. (www.consumer.es). 2010. Los alimentos transgénicos. España, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. INTERNET: <http://www.ecoticias.com/alimentos/26495/2010/05/20/noticias-comida-bebidas-alimentos-transgenicos-productos-agricultura-ganaderia-ecologicas-organicos-naturales-sostenibles-medioambiente-medio-ambiente-medioambiental-ambiental>

- VILLALBA, M., VÉLEZ, T., ARIAS, M. & ARRÁZOLA, G. 2009. Producción de xilitol a partir de cascarilla de arroz utilizando *Candida guilliermondii*. Facultad Nacional de Agronomía. 62(1): 4897-4905.
- VIRGÍNIO, D., MACIEL, I., SILVÉRIO, S. & ALMEIDA, M. Improvement of biotechnological xylitol production by glucose during cultive of *Candida guilliermondii* in sugar cane bagasse hydrolysate. Brazilian Archives of Biology and Technology. 50(2): 207-215.
- WALTHER, T., HENSIRISAK, P. & AGBLEVOR, F. 2001. The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by *Candida tropicalis*. Bioresource Technology. 76(3): 1-14.
- YABLOCHKOVA, E., BOLOTNIKOVA, O., MIKHAILOVA, N. NEMOVA, N. & GINAK, A. 2003. Specific features of fermentation of D-xylose and D-glucose by xylose-assimilating yeasts. Applied Biochemistry and Microbiology. 39: 265-269.

9. APÉNDICE

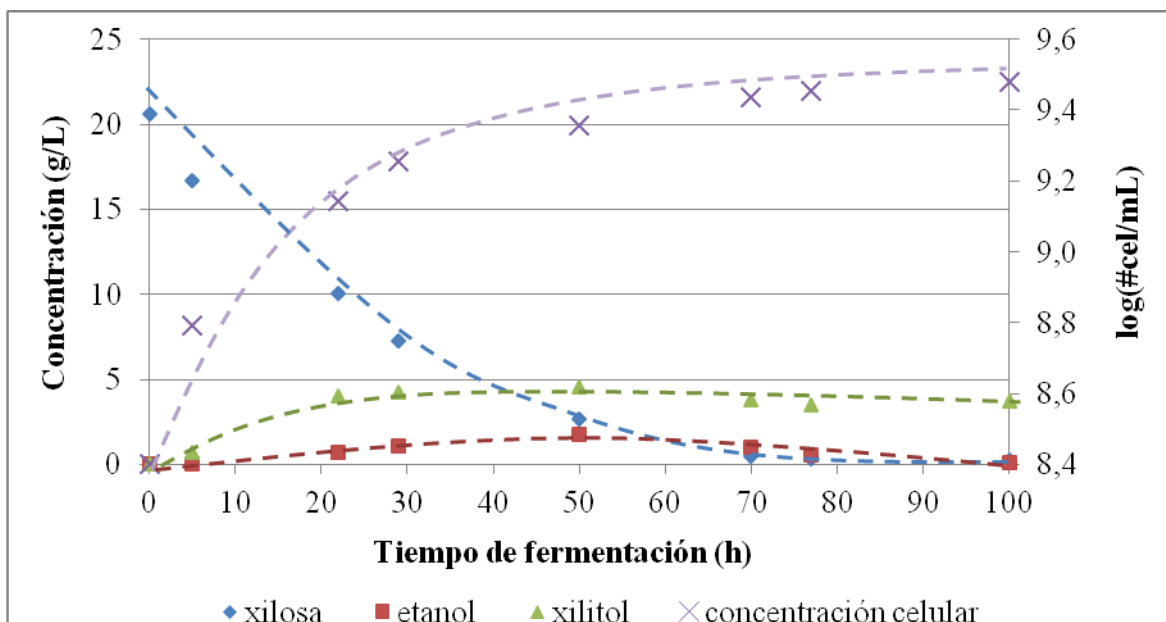


Figura 29. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilosa, xilitol, etanol y concentración celular durante el proceso de fermentación, por lote, de 100 horas, utilizando una concentración inicial de 20 g/L de xilosa comercial.

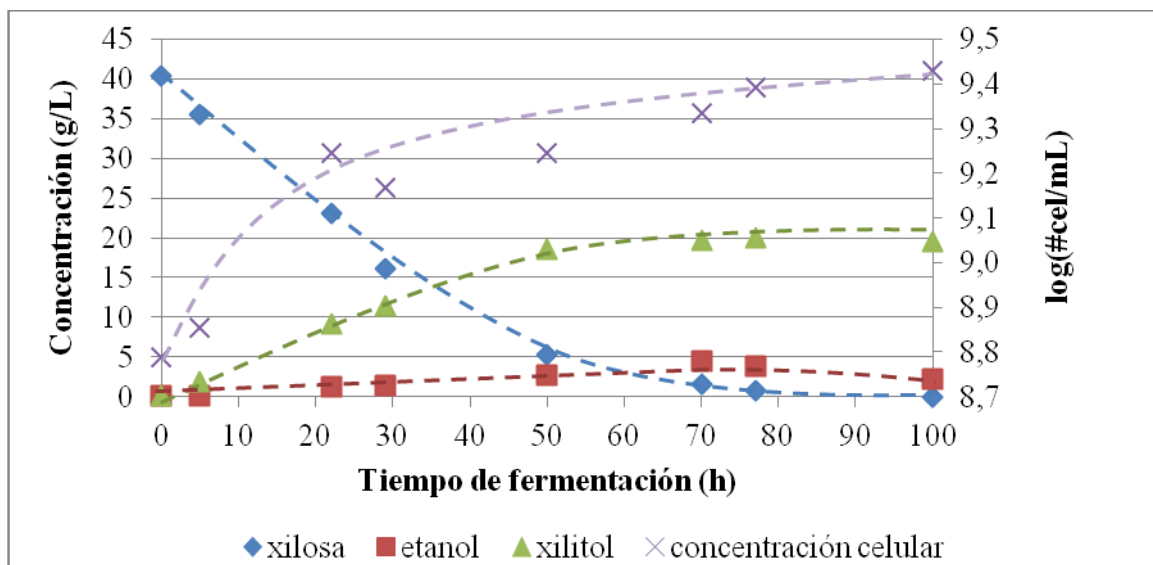


Figura 30. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilosa, xilitol, etanol y concentración celular durante el proceso de fermentación, por lote, de 100 horas, utilizando una concentración inicial de 40 g/L de xilosa comercial.

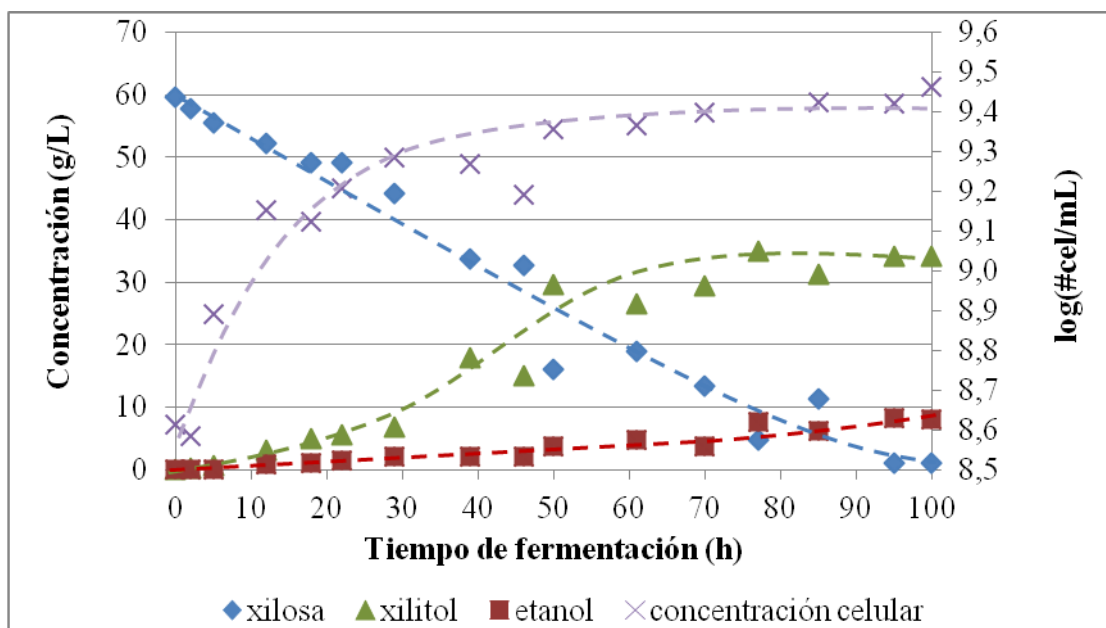


Figura 31. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilosa, xilitol, etanol y concentración celular durante el proceso de fermentación, por lote, de 100 horas, utilizando una concentración inicial de 60 g/L de xilosa inicial comercial.

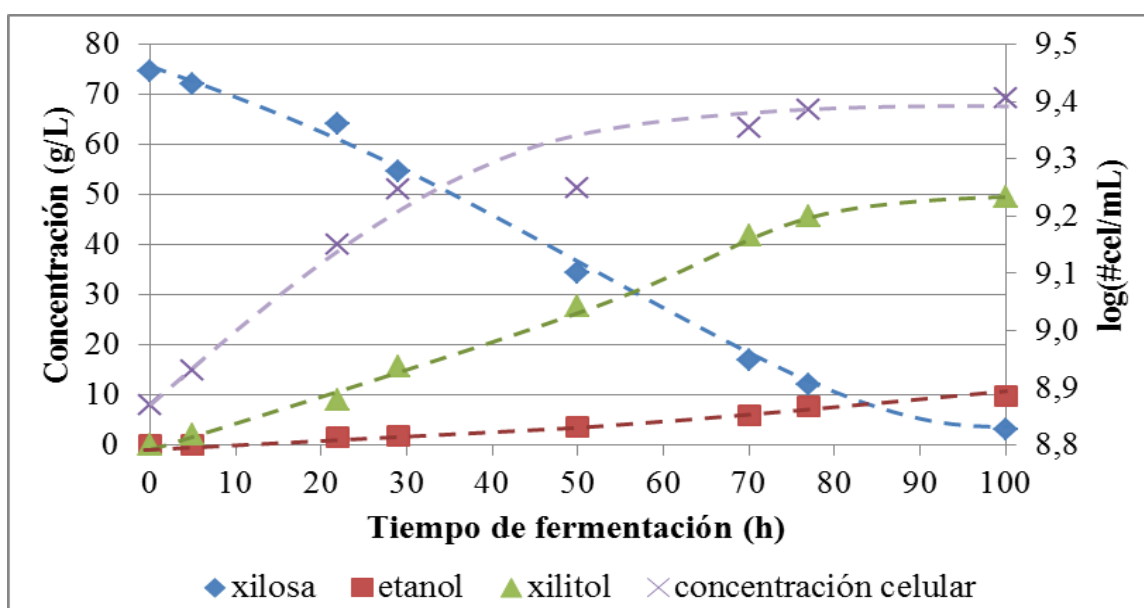


Figura 32. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilosa, xilitol, etanol y concentración celular durante el proceso de fermentación, por lote, de 100 horas, utilizando una concentración inicial de 70 g/L de xilosa comercial.

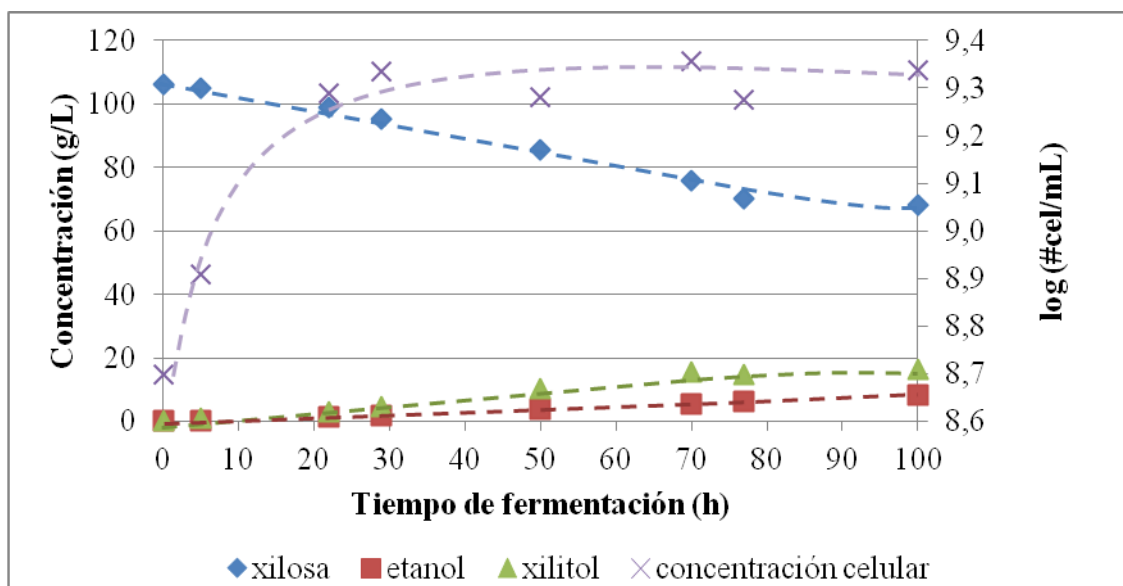


Figura 33. Variación promedio (n=3) en la concentración de xilosa, xilitol, etanol y concentración celular durante el proceso de fermentación, por lote, de 100 horas, utilizando una concentración de 100 g/L de xilosa comercial.

Cuadro VI. Variación en los promedios*(n=3) de la concentración de xilosa, concentración de etanol, concentración de xilitol, concentración celular, rendimiento y productividad de xilitol durante una fermentación con la levadura *Candida guilliermondii* en un medio sintético.

Concentración inicial xilosa (g/L)	Tiempo (horas)	Xilosa (g/L)	Etanol (g/L)	Xilitol (g/L)	Concentración celular (log #cel/mL)	Rendimiento de xilitol (g de xilitol producido/g de xilosa consumida)	Productividad de xilitol (g*L ⁻¹ *h ⁻¹)
20,62	0	20,6±0,2	0,0±0,0	0,05±0,01	8,391±0,001	N.A. ⁺	N.A. ⁺
20,62	5	17±2	0,02±0,03	0,7±0,1	8,78±0,05	0,2±0,1	0,15±0,01
20,62	22	10,0±0,5	0,7±0,1	4,0±0,2	9,13±0,02	0,38±0,03	0,18±0,01
20,62	29	7,2±0,4	1,1±0,1	4,3±0,2	9,25±0,05	0,32±0,02	0,15±0,01
20,62	50	2,7±0,3	1,7±0,1	4,5±0,2	9,35±0,05	0,25±0,01	0,091±0,004
20,62	70	0,5±0,2	1,0±0,3	3,8±0,2	9,43±0,02	0,19±0,01	0,055±0,002
20,62	77	0,3±0,1	0,6±0,2	3,5±0,4	9,45±0,02	0,17±0,02	0,045±0,005
20,62	100	0,3±0,1	0,1±0,2	3,7±0,7	9,47±0,01	0,18±0,03	0,04±0,01
40,42	0	40,4±0,3	0,1±0,1	0,05±0,02	8,79±0,04	N.A. ⁺	N.A. ⁺
40,42	5	35,5±0,5	0,0±0,1	1,91±0,03	8,85±0,05	0,39±0,04	0,38±0,01
40,42	22	23,0±0,6	1,2±0,1	9,2±0,1	9,25±0,04	0,53±0,02	0,42±0,01
40,42	29	16±2	1,3±0,3	11,5±0,8	9,17±0,04	0,47±0,08	0,40±0,03
40,42	50	5±1	2,7±0,2	19±1	9,25±0,04	0,53±0,04	0,37±0,02
40,42	70	1,5±0,4	4,5±0,1	20±1	9,33±0,02	0,51±0,03	0,28±0,02
40,42	77	0,7±0,7	3,9±0,1	20±2	9,39±0,02	0,50±0,06	0,26±0,03
40,42	100	0,0±0,0	2,2±0,6	20±1	9,43±0,01	0,48±0,03	0,20±0,01
59,55	0	60±1	0,0±0,0	0,1±0,1	8,61±0,02	N.A. ⁺	N.A. ⁺
59,55	2	58±2	0,07±0,07	0,3±0,1	8,58±0,06	0,14±0,04	0,13±0,03
59,55	5	55±2	0,08±0,04	0,6±0,1	8,89±0,02	0,14±0,08	0,11±0,02
59,55	12	52,2±0,3	0,90±0,08	3,04±0,04	9,15±0,01	1,0,±0,1	0,254±0,003
59,55	18	49,2±0,1	1,04±0,07	5,0±0,5	9,12±0,02	0,82±0,04	0,27±0,03
59,55	22	49±1	1,43±0,06	5,6±0,6	8,74±0,03	0,5±0,3	0,25±0,03
59,55	29	44±3	2,0±0,2	6,9±0,2	9,25±0,06	0,4±0,3	0,24±0,01
59,55	39	33,8±0,7	2,2±0,1	18,0±0,7	9,27±0,01	0,7±0,4	0,46±0,02
59,55	46	33±5	2,1±0,6	15±2	9,19±0,03	0,5±0,3	0,33±0,05
59,55	50	16±2	3,7±0,3	29±2	9,36±0,05	0,68±0,02	0,59±0,03
59,55	61	18,9±0,8	4,8±0,2	26,6±0,7	9,37±0,04	0,73±0,01	0,44±0,01
59,55	70	13,43±0,09	3,8±0,1	33,9±0,6	9,38±0,01	0,70±0,03	0,42±0,01

*: Para las tres réplicas analizadas en cada tratamiento.

+: N.A. equivalente a no aplica al no haber producción de xilitol

Continuación del cuadro VI

Concentración inicial xilosa (g/L)	Tiempo (horas)	Xilosa (g/L)	Etanol (g/L)	Xilitol (g/L)	Concentración celular (log #cel/mL)	Rendimiento de xilitol (g de xilitol producido/g de xilosa consumida)	Productividad de xilitol (g*L ⁻¹ *h ⁻¹)
59,55	77	4,8±0,3	7,63±0,03	35±2	9,40±0,01	0,64±0,03	0,45±0,02
59,55	85	11±1	6,1±0,5	31,4±0,5	9,42±0,03	0,7±0,4	0,37±0,01
59,55	95	1,0±0,4	8,2±0,2	34±1	9,42±0,02	0,57±0,02	0,36±0,02
59,55	100	1,0±0,1	8,0±0,5	34±1	9,463±0,003	0,58±0,02	0,34±0,01
74,57	0	75±3	0,03±0,03	0,03±0,01	8,87±0,01	N.A. ⁺	N.A. ⁺
74,57	5	72±6	0,1±0,1	2,2±0,3	8,9±0,1	1±1	0,44±0,06
74,57	22	64±1	1,47±0,04	9,0±0,4	9,15±0,02	0,86±0,07	0,41±0,02
74,57	29	55±4	1,9±0,1	16±2	9,25±0,04	0,8±0,2	0,54±0,06
74,57	50	34±6	3,5±0,7	28±4	9,25±0,03	0,7±0,2	0,6±0,1
74,57	70	17±2	6,0±0,1	42±1	9,35±0,04	0,73±0,02	0,60±0,01
74,57	77	12±1	7,75±0,01	41±2	9,38±0,01	0,7±0,1	0,6±0,1
74,57	100	3,2±0,6	9,9±0,2	50±3	9,41±0,01	0,69±0,04	0,50±0,03
106,24	0	106±9	0,1±0,1	0,1±0,2	8,7±0,1	N.A. ⁺	N.A. ⁺
106,24	5	105±4	0,2±0,2	1,2±0,8	8,9±0,1	1,0±0,4	0,2±0,2
106,24	22	99±4	1,6±0,1	3,0±0,6	9,3±0,2	0,4±0,5	0,14±0,03
106,24	29	95±2	2,0±0,1	4,6±0,3	9,33±0,02	0,4±0,1	0,16±0,01
106,24	50	86±6	3,8±0,1	10,2±0,4	9,28±0,04	0,5±0,2	0,20±0,01
106,24	70	76±2	5,7±0,1	16±3	9,36±0,05	0,51±0,06	0,22±0,04
106,24	77	70±2	6±1	15±2	9,27±0,05	0,4±0,2	0,19±0,02
106,24	100	68±2	8,2±0,2	16±1	9,34±0,07	0,43±0,04	0,16±0,01

*: Para las tres réplicas analizadas en cada tratamiento.

+: N.A. equivalente a no aplica al no haber producción de xilitol

Cuadro VII. Valores F y cuadrado medio del error (CME) para determinar el efecto de la variación de la concentración de xilosa inicial en un medio de fermentación con xilosa comercial, y del tiempo de proceso sobre el rendimiento de xilitol, la productividad de xilitol, la concentración de xilosa, la concentración de etanol, la concentración de xilitol y la concentración celular de la cepa *Candida guilliermondii*.

Factores e interacción	GL	Concentración de xilosa (g/L)		Concentración de etanol (g/L)		Concentración de xilitol (g/L)		Concentración celular (log #cel/mL)		Rendimiento de xilitol (g xilitol/ g xilosa consumida)		Productividad de xilitol (g*L ⁻¹ *h ⁻¹)	
		Valor de F	CME	Valor de F	CME	Valor de F	CME	Valor de F	CME	Valor de F	CME	Valor de F	CME
Tiempo (t)	3	31,00*	582,66	16,44*	17,19	3,68*	118,24	44,95*	0,04	1,85	0,02	6,92*	0,04
Concentración (C)	4	622,55*	11703,05	66,89*	69,96	71,78*	2302,78	24,54*	0,02	36,65*	0,43	75,14*	0,42
Réplica	2	0,67	12,58	0,74	0,77	0,81	26,10	1,046	0,00	0,74	0,01	0,84	0,00
t*C	12	4,01*	75,42	7,26*	7,60	1,70	54,62	3,72*	0,00	0,42	0,00	1,46	0,01

*Significancia a p<0,05

Cuadro VIII. Comparación de los promedios de concentración de xilitol, rendimiento de xilitol y productividad de xilitol, mediante la prueba de Tukey, en el proceso de fermentación durante cuatro tiempos de muestreo (50, 70, 77 y 100 h), al variar la concentración inicial de xilosa en un medio de fermentación sintético.

Concentración de xilosa inicial (g/L)	Concentración de xilitol (g/L)	Rendimiento de xilitol (g xilitol/ g xilosa consumida)	Productividad de xilitol (g*L⁻¹*h⁻¹)
20,62	3,88 ^c	0,20 ^c	0,06 ^c
40,42	19,45 ^b	0,51 ^b	0,28 ^b
59,55	33,16^a	0,66^a	0,45^a
74,57	37,72^a	0,67^a	0,52^a
106,24	14,15 ^b	0,48 ^b	0,20 ^b

Promedios con diferente letra son estadísticamente diferentes, con un nivel de confianza del 95%.

Cuadro IX. Comparación de los promedios de concentración de xilitol, rendimiento de xilitol y productividad de xilitol, mediante la prueba de Tukey, al variar la concentración de xilosa inicial, para cada uno de los tiempos de muestreo (50, 70, 77 y 100 horas) realizados durante el proceso de fermentación sintético.

Tiempo (h)	Concentración de xilitol (g/L)	Productividad de xilitol (g*L⁻¹*h⁻¹)
50	18,11 ^b	0,33^a
70	22,98^{ab}	0,32^{ab}
77	20,98^{ab}	0,27 ^b
100	24,63^a	0,25 ^b

Promedios con diferente letra son estadísticamente diferentes, con un nivel de confianza del 95%.

Cuadro X. Variación en los promedios*(n=3) de la concentración de xilosa, concentración de etanol, concentración de xilitol, concentración celular, concentración de glucosa, concentración de galactosa, concentración de ácido acético, rendimiento de xilitol y productividad de xilitol en una fermentación con la levadura *Candida guilliermondii* en un medio con hidrolizado de residuos hemicelulósicos de piña.

Concentración inicial xilosa (g/L)	Tiempo (horas)	Xilosa (g/L)	Etanol (g/L)	Xilitol (g/L)	Concentración celular (log #cel/mL)	Glucosa (g/L)	Galactosa (g/L)	Ácido acético (g/L)
62,63	0	63±3	3±3	0,0±0,0	8,88±0,02	40±5	16,1±0,9	15,0±0,2
62,63	5	62±4	6±3	0,0±0,0	8,99±0,04	32±8	15±3	14±1
62,63	22	66±2	2±2	0,0±0,0	9,14±0,04	42±3	15±1	15,2±0,6
62,63	29	60,6±0,1	0,1±0,0	0,0±0,0	9,09±0,03	45,1±0,1	13±4	15±1
62,63	50	69±1	0,092±0,002	0,0±0,0	9,11±0,03	45,4±0,6	15±1	16,0±0,3
62,63	70	68±1	1±1	0,0±0,0	9,14±0,02	45±1	16±2	16,0±0,3
71,32	0	71±2	0,05±0,00	0,0±0,0	8,80±0,08	42,1±0,9	9,5±0,9	20,6±0,5
71,32	5	71±3	0,01±0,07	0,0±0,0	9,0±0,2	42±1	9,8±0,7	20,0±0,6
71,32	22	69±7	0,01±0,07	0,0±0,0	9,2±0,4	41±4	9,6±0,3	20±2
71,32	29	64±7	0,01±0,07	0,0±0,0	8,95±0,08	38±4	9,4±0,5	18±2
71,32	50	72±2	0,01±0,07	0,0±0,0	9,1±0,1	42,7±0,9	9,3±0,7	20,7±0,7
71,32	70	72±1	0,01±0,07	0,0±0,0	9,2±0,2	43,4±0,8	9,6±0,3	20,8±0,5

*: Para las tres réplicas analizadas en cada tratamiento.

Cuadro XI. Valores F y cuadrado medio del error (CME) para determinar el efecto de la variación de la concentración y del tipo de xilosa inicial en cada uno de los tiempos evaluados sobre el rendimiento de xilitol, la productividad de xilitol, concentración de xilosa, concentración de etanol, concentración de xilitol y concentración celular de la cepa *Candida guilliermondii*.

Factores e interacción	GL	Concentración de xilosa (g/L)		Concentración de etanol (g/L)		Concentración de xilitol (g/L)		Concentración celular (log #cel/mL)		Rendimiento de xilitol (g xilitol/ g xilosa consumida)		Productividad de xilitol (g*L ⁻¹ *h ⁻¹)	
		Valor de F	CME	Valor de F	CME	Valor de F	CME	Valor de F	CME	Valor de F	CME	Valor de F	CME
Tiempo (t)	2	23,94*	879,74	100,83*	19,79	44,78*	451,63	7,41*	0,06	4,67*	0,05	16,40*	0,04
Concentración (C)	1	11,36*	417,49	0,36	0,07	2,71	27,38	1,27	0,01	11,42*	0,13	28,52*	0,07
Tipo de xilosa (X)	1	388,10*	14264,66	597,66*	117,320	637,47*	6429,032	45,41*	0,38	325,45*	3,60	847,00*	2,06
Réplica	2	2,75	101,14	3,02	0,593	1,00	9,960	2,82	0,02	1,29	0,01	1,15	0,00
t*C	2	1,49	54,59	3,97*	0,779	1,82	18,317	0,48	0,00	9,72*	0,11	13,84*	0,03
X*C	1	9,17*	336,84	1,57	0,309	2,71	27,375	0,03	0,00	11,42*	0,13	28,52*	0,07
t*X	2	39,56*	1453,82	76,46*	15,009	44,78*	451,627	0,00	0,00	4,67*	0,05	16,40*	0,04
t*C*X	2	0,50	18,25	1,26	0,248	1,82	18,317	2,22	0,02	9,72*	0,11	13,84*	0,03

*Significancia a $p < 0,05$

Cuadro XII. Comparación de los promedios de la concentración celular, mediante la prueba de Tukey, al variar el tiempo del proceso de fermentación.

Tiempo (h)	Concentración celular log(#cel/mL)
29	9,12 ^b
50	9,20 ^{ab}
70	9,26 ^a

Promedios con diferente letra son estadísticamente diferentes, con un nivel de confianza del 95%

Cuadro XIII. Comparación de los promedios de concentración de concentración celular, mediante la prueba de Tukey, al variar la el tipo de xilosa utilizada en el proceso de fermentación (comercial o extraída).

Tipo de xilosa	Concentración celular log(#cel/mL)
Comercial	9,30 ^a
Extraída	9,09 ^b

Promedios con diferente letra son estadísticamente diferentes, con un nivel de confianza del 95%

