

Universidad de Costa Rica
Facultad de Ciencias Agroalimentarias
Escuela de Tecnología de Alimentos

**“EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE XILITOL A NIVEL PILOTO, POR VÍA
FERMENTATIVA A PARTIR DE XILOSA COMERCIAL”**

Proyecto de graduación presentado como requisito parcial para optar por el grado
de Licenciatura en Tecnología de Alimentos

Tatiana Milanés Rodríguez

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
San José, Costa Rica

2007

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

Tatiana Milanés Rodríguez



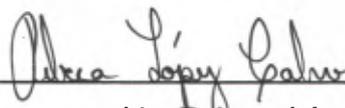
M.Sc. Alicia Hernández Peñaranda

Directora del proyecto



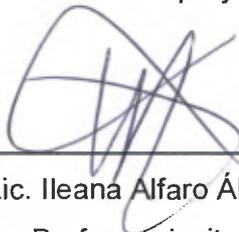
Lic. Laura Arce Aita

Asesora del proyecto



Lic. Rebeca López Calvo

Asesora del proyecto



Lic. Ileana Alfaro Álvarez

Profesora invitada



Ph.D. Elba Cubero Castillo

Presidente del Tribunal

DEDICATORIA

*A todos aquellos que, con su apoyo incondicional,
me llenaron de perseverancia*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a:

Dios por colmarme de bendiciones cada día.

Alicia Hernández por hacer posible la realización de este proyecto, por su gran apoyo, disponibilidad y guía a lo largo del mismo.

Laura Arce y Rebeca López por su apoyo, orientación y disponibilidad a lo largo del proyecto.

La Vicerrectoría de Investigación y el CIPRONA por el financiamiento de este proyecto.

El CIPRONA y el CITA por abrirme sus puertas y permitir el desarrollo de mi proyecto de graduación en sus instalaciones.

Laboratorio de Bacteriología Médica de la Escuela de Microbiología por el préstamo de equipos y materiales necesarios para realizar este proyecto.

El personal del CIPRONA y del CITA por brindarme su ayuda, consejos y los equipos necesarios durante el desarrollo de este proyecto.

El personal del laboratorio de Microbiología del CITA, Ligia Mora, Andrea Quesada y Hellen Treminio, por su gran apoyo, consejos y compañía a lo largo de este proyecto.

Juan Carlos Cordero por su gran ayuda, apoyo y disponibilidad a lo largo de este proyecto.

Elba Cubero por su apoyo y disponibilidad durante el desarrollo de este proyecto.

Guillermo, por su apoyo incondicional y compañía en todo este tiempo.

Ivannia, por su apoyo incondicional de tantos años.

Mi familia y amigos por su apoyo y consejos a lo largo de mi vida.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE	v
RESUMEN	vii
1. JUSTIFICACIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. MARCO TEÓRICO	6
3.1 Xilosa.....	6
3.2 Xilitol.....	7
3.3 Producción de xilitol	12
3.3.1 Factores que afectan la producción de xilitol.....	15
3.3.1.1 Adición de etanol.....	16
3.3.1.2 Nivel de aireación (velocidad de agitación)	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
4.1 Localización del proyecto	18
4.2 Materiales.....	18
4.2.1 Microorganismo.....	18
4.2.2 Medios de cultivo.....	18
4.2.2.1 Mantenimiento de la cepa	18
4.2.2.2 Fermentaciones.....	18
4.2.3 Equipo de fermentación.....	19
4.3 Preparación de copias de la levadura X.....	20
4.3.1 Reconstitución y propagación	20
4.3.2 Mantenimiento.....	20
4.4 Curva de crecimiento	20
4.4.1 Preparación del inóculo	21
4.4.2 Crecimiento del microorganismo	22
4.4.3 Toma de muestra	23
4.5 Análisis de la variabilidad del proceso de producción de xilitol	24
4.6 Evaluación de las condiciones de producción de xilitol y otros metabolitos.....	24
4.6.1 Adición de etanol.....	24
4.6.2 Niveles de aireación (velocidad de agitación)	25
4.6.3 Tiempo de fermentación.....	25
4.6.4 Diseño experimental.....	26
4.7 Comparación de resultados.....	27
4.8 Métodos de análisis.....	27
4.8.1 Concentración de biomasa.....	27
4.8.2 Concentración de xilosa, xilitol, glucosa, etanol y glicerol	28

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
5.1 Curva de crecimiento	29
5.2 Variabilidad del proceso de producción de xilitol	36
5.3 Evaluación de las condiciones de producción de xilitol y otros metabolitos	37
5.3.1 Rendimiento de la producción de xilitol	41
5.3.2 Concentración de xilosa residual.....	46
5.3.3 Concentración de xilitol producido.....	51
5.3.4 Concentración de etanol residual	54
5.3.5 Concentración de glicerol producido	59
5.3.6 Concentración celular.....	61
5.3.7 Productividad de xilitol.....	65
5.3.8 Comparación de resultados.....	69
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	72
6.1 Curva de crecimiento	72
6.2 Evaluación de las condiciones de producción de xilitol y otros metabolitos	72
7. ANEXO.....	74
8. BIBLIOGRAFÍA	78

RESUMEN

El presente proyecto se realizó con el objetivo de evaluar la producción de xilitol a nivel piloto, por vía fermentativa a partir de xilosa comercial. El microorganismo a utilizar fue donado por la Dra. Bärbel Hahn-Hägerdal de la Universidad de Lund, Suecia; y por razones de confidencialidad se le denominó levadura X. Tomando como base las condiciones de fermentación propuestas por Arce (2004), se estudió la producción y el consumo de metabolitos por medio de la curva de crecimiento de la cepa en un bioreactor de 2.2 L; con y sin control del pH del medio. Seguidamente se evaluó el efecto de la adición de etanol y distintos niveles de aireación (velocidad de agitación) sobre la producción de xilitol, en tres diferentes tiempos durante la fermentación. A partir de los resultados obtenidos, se eligió el tratamiento que produjo el mayor rendimiento de xilitol y se comparó con los resultados obtenidos a nivel de laboratorio por Arce (2004).

Las variables respuesta en el estudio de la curva de crecimiento de la levadura X fueron la concentración de cada uno de los metabolitos y sustratos involucrados en el proceso (glucosa, xilosa, glicerol, etanol, xilitol), el rendimiento en la producción de xilitol (g de xilitol/ g de xilosa inicial) y la productividad de xilitol (g/L*h). Se encontró que el xilitol es producido en la fase estacionaria. Tanto para el rendimiento de la producción de xilitol como para la productividad de xilitol se obtuvieron resultados más satisfactorios durante la curva de crecimiento sin control del pH del medio.

Para evaluar el efecto de la adición de etanol y distintos niveles de aireación (velocidad de agitación) sobre la producción de xilitol se realizaron un total de 4 tratamientos distintos por duplicado, y se analizaron a las 50, 70 y 94 horas de fermentación. La evaluación estadística de los datos consistió en un análisis de variancia (ANDEVA) para determinar si existían diferencias en los promedios de cada variable respuesta entre los distintos niveles de cada factor y si las interacciones entre los factores fueron significativas, para cada uno de los tiempos de fermentación evaluados.

El tratamiento que generó el mayor rendimiento en la producción de xilitol fue el empleo de la velocidad de agitación de 250 rpm, sin adición de etanol al medio, a las 94 horas de fermentación. Esta combinación de factores produjo un rendimiento de 0.93 g de

xilitol/ g de xilosa inicial. Asimismo, esta combinación de factores generó una mayor productividad de xilitol, siendo similar en los tres tiempos de fermentación evaluados.

Tanto la producción de xilitol a nivel de laboratorio como a nivel piloto generaron altos rendimientos, lográndose un rendimiento ligeramente mayor con la producción a nivel de laboratorio. Además, uno de los principales resultados de esta investigación es que se logró un escalamiento del proceso 60 veces mayor al estudiado previamente por Arce (2004). Por lo tanto, la levadura X se puede utilizar de manera efectiva para la producción de xilitol.

1. JUSTIFICACIÓN

El xilitol, un alcohol pentahidroxilado (pentiol) de la xilosa, es un producto intermedio del metabolismo de carbohidratos en humanos y animales (Hyvönen *et al.*, 1982; Silva *et al.*, 1993/94; Singh & Mishra, 1995). Es un edulcorante natural tan dulce como la sacarosa, por lo que goza de buenas aplicaciones como sustituto del azúcar en la industria de alimentos procesados (Emodi, 1978; Mäkinen, 1978; Silva *et al.*, 1993/94; Nigam & Singh, 1995; Biswas & Vashishtha, 2003). La incorporación de xilitol en alimentos es permitida por ser reconocido como un aditivo GRAS “Generally Regarded As Safe” por la FDA (Silva *et al.*, 1993/94). Asimismo, el xilitol producido comercialmente es un producto similar en estructura y propiedades a la sustancia natural (Hyvönen *et al.*, 1982).

En la industria de alimentos, el xilitol se usa para productos como gomas de mascar, confites, mentas, chocolates, gelatina, pudín, jaleas, productos de repostería, helados, caramelos, leche condensada, salsa de tomate y salsas en general (Emodi, 1978; Hyvönen *et al.*, 1982; Biswas & Vashishtha, 2003).

La producción de xilitol normalmente es llevada a cabo químicamente, ya sea a partir de xilosa comercial, o mediante la reducción de la xilosa presente en los hidrolizados de hemicelulosa. Este proceso incluye operaciones de purificación y separación para remover subproductos, lo cual aumenta el costo del proceso y produce un bajo rendimiento de xilitol (50-60%) (Meinander *et al.*, 1994; Nigam & Singh, 1995; Silva *et al.*, 1996). Esto ha motivado el estudio de la producción de xilitol por vía biotecnológica ya que se emplean enzimas o microorganismos específicos que generan un mayor rendimiento, convirtiéndose en una opción atractiva desde el punto de vista económico (Mussatto & Roberto, 2004).

Entre los microorganismos que se emplean se pueden mencionar algunas levaduras, hongos filamentosos y bacterias. Estos contienen la enzima xilosa reductasa que permite la reducción de xilosa a xilitol (Silva *et al.*, 1996). La levadura X presenta la ventaja de reducir la xilosa a xilitol sin metabolizar posteriormente el xilitol producido, lo cual genera mayores rendimientos en dicha producción (Hallborn *et al.*, 1991).

Los residuos agrícolas ricos en carbohidratos, tales como la hemicelulosa, se producen en enormes cantidades a lo largo del mundo. Al ser la D-xilosa el componente predominante entre el total de azúcares presentes en los hidrolizados de hemicelulosa (80-85%), ésta puede convertirse en una fuente económica para la producción de xilitol (Nigam & Singh, 1995). Además, es una forma de aprovechar los desechos agroindustriales que por lo general poseen un bajo costo y representan un grave problema de contaminación. En Costa Rica, hacia 1990, dichos residuos representaban un 86% de la generación total diaria de desechos (Martínez, 1996).

Para la producción industrial del xilitol es muy importante elevar el porcentaje de producción y el rendimiento, optimizando tanto las condiciones de proceso como las del microorganismo a utilizar. Nigam y Singh (1995), estudiaron: el nivel de aireación, la fuente de nitrógeno, la concentración de xilosa, la presencia de otros azúcares y/o cosustratos en el medio de fermentación, el pH y la temperatura. Así encontraron, por ejemplo, que la conversión más efectiva de xilosa a xilitol (empleando bagazo de caña de azúcar), por medio de la *Candida utilis*, es lograda a un pH de 8.0, una temperatura de 30 °C y bajo condiciones aeróbicas.

La producción de xilitol a nivel de laboratorio, por vía fermentativa a partir de xilosa comercial, es estudiada actualmente en el Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA). Como parte de esta investigación, se evaluó la influencia de la concentración inicial de la levadura X, de la fuente de carbono (proporción glucosa:xilosa) y de la aireación (variando el volumen de trabajo) utilizada durante la fermentación sobre el rendimiento en la producción de xilitol. Según el estudio realizado por Arce (2004) en el CIPRONA, el tratamiento que generó los mayores rendimientos en la producción de xilitol utilizando la levadura X bajo una temperatura de 30 °C y una agitación de 100 rpm fue: concentración inicial de glucosa de 20 g/L, concentración inicial de xilosa de 10 g/L, nivel de aireación igual a 5:1 (volumen del recipiente de fermentación vs. volumen del cultivo), y concentración inicial de inóculo ya sea de 2.3×10^5 células / mL o de 1.5×10^5 células / mL. Arce (2004), logró alcanzar un rendimiento del 100% (g xilitol / g xilosa inicial) con esta combinación de factores.

Tomando como base las condiciones del estudio de Arce (2004), la presente investigación representó una continuación del mismo, en la que se evaluó la producción de xilitol a nivel piloto (empleando un bioreactor), por vía fermentativa a partir de xilosa comercial utilizando la levadura X. Específicamente, se estudió el efecto de la adición de etanol durante la fermentación y distintos niveles de aireación (variando la agitación), en tres diferentes tiempos para detectar el menor tiempo en el que se produce la mayor cantidad de xilitol; monitoreando el pH del medio.

Para la bioconversión de xilosa a xilitol, la levadura X requiere la presencia de un cosustrato oxidable, tal como el etanol, para el mantenimiento de energía y la regeneración de los cofactores requeridos por la enzima xilosa reductasa (Hallborn *et al.*, 1994). Por este motivo, Meinander *et al.* (1994), sugieren adicionar etanol al medio de fermentación para lograr la conversión de grandes cantidades de xilosa a xilitol. Los resultados obtenidos por Arce (2004), presumen que existe una sincronía entre el consumo de etanol y la producción de xilitol; de ahí el interés por estudiar esta variable.

El nivel de oxígeno durante la fermentación establece los cambios en el crecimiento celular, el consumo de sustratos y la formación de productos (Winkelhausen *et al.*, 1996). Se han realizado estudios bajo condiciones aerobias, anaerobias y con oxígeno limitado, obteniéndose diferentes rendimientos en la producción de xilitol. Según Mussatto y Roberto (2003), para lograr altos niveles de oxígeno disuelto en el medio, la agitación debe ser mayor, mientras que para disminuir el oxígeno disuelto, la agitación debe ser menor. Arce (2004), afirma que el nivel de aireación (volumen de cultivo) fue el factor que ejerció la mayor influencia sobre la producción de xilitol.

El nivel de aireación debe ser optimizado no sólo considerando el rendimiento de xilitol, sino también el pH del proceso, debido a que la acumulación de ácido acético en el medio (por la oxidación del etanol llevada a cabo por la levadura X), podría causar envenenamiento de las células a un bajo pH, con la simultánea suspensión de la producción de xilitol. Dicho envenenamiento puede evitarse ya sea aumentando el pH mediante la adición de un álcali, o aireando el medio lo suficiente para lograr un ambiente aerobio en el que ni el etanol ni el ácido acético logran acumularse (Meinander *et al.*, 1994). La investigación realizada por Arce (2004), no contempló el estudio del pH del

medio, por lo que en la presente se evaluó si existe diferencia en la producción de xilitol cuando se controla esta variable.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la producción de xilitol a nivel piloto, por vía fermentativa a partir de xilosa comercial, utilizando la levadura X.

2.2 Objetivos específicos

- * Estudiar la producción y el consumo de metabolitos (xilitol, etanol, glicerol, glucosa, xilosa), por medio de la curva de crecimiento de la levadura X bajo condiciones predeterminadas, con y sin control del pH del medio, en un bioreactor de 2.2 L.
- * Evaluar el efecto de la adición de etanol sobre la producción de xilitol, en tres diferentes tiempos durante la fermentación; en un bioreactor de 2.2 L.
- * Evaluar la influencia de distintos niveles de aireación (velocidad de agitación) sobre la producción de xilitol, en tres diferentes tiempos durante la fermentación; en un bioreactor de 2.2 L.
- * Comparar los resultados obtenidos a nivel piloto con aquellos obtenidos a nivel de laboratorio.

3. MARCO TEÓRICO

La materia lignocelulósica es el recurso natural renovable más abundante en la tierra. Se encuentra en residuos agrícolas, maderas, frutas y vegetales, entre otros. Representa más del 60% del total de la biomasa. Independientemente de su origen dicha materia contiene celulosa, hemicelulosa y lignina como componentes principales (Singh & Mishra, 1995).

La celulosa está compuesta por unidades de D-glucosa, y es el componente principal de las células vegetales, donde se encuentra asociada a la lignina, pectina y hemicelulosas (Belitz & Grosch, 1997). La hemicelulosa representa el 10-40% de la biomasa lignocelulósica (Skoog & Hanh-Hägerdal, 1990); es un polisacárido integrado por hexosas y pentosas. La D-glucosa, D-galactosa y D-manosa constituyen sus hexosas, mientras que la D-xilosa y L-arabinosa son sus principales pentosas (Singh & Mishra, 1995).

Los azúcares derivados de la hemicelulosa tienen muchos usos potenciales pues pueden ser convertidos por microorganismos a varios productos, tales como etanol, azúcar-alcoholes como el xilitol, solventes, ácidos orgánicos, entre otros (Singh & Mishra, 1995).

3.1 Xilosa

La xilosa (figura 1) es un monosacárido perteneciente a la familia de las aldosas. Se designa como una pentosa por el número total de átomos de carbono (Belitz & Grosch, 1997). Es el componente mayoritario de la fracción hemicelulósica, representando más del 90% del azúcar presente en esta fracción (Mussatto & Roberto, 2003).

La xilosa puede ser convertida por métodos biotecnológicos en varios productos químicos de alto valor económico. El xilitol es uno de tales productos que tiene gran cantidad de aplicaciones en la industria de alimentos, farmacéutica y odontológica (Silva *et al.*, 1993/94; Silva *et al.*, 1996).

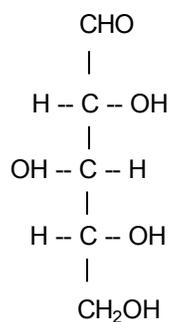


Figura 1. Estructura química de la D-xilosa (Singh & Mishra, 1995).

3.2 Xilitol

El xilitol es un azúcar-alcohol de cinco carbonos que se obtiene a partir de la xilosa. Es un producto intermedio del metabolismo de carbohidratos en microorganismos (Singh & Mishra, 1995), humanos y animales (Emodi, 1978; Hyvönen *et al.*, 1982; Silva *et al.*, 1993/94; Singh & Mishra, 1995). También se encuentra en setas (*Psalliota campestris*), frutas y vegetales (Hyvönen *et al.*, 1982; Silva *et al.*, 1993/94); siendo algunas de sus fuentes naturales: ciruela, fresa, frambuesa, coliflor, lechuga, espinaca, cebolla, entre otras (Counsell, 1978; Mäkinen, 1978; Pepper & Olinger, 1988; Biswas & Vashishtha, 2003).

El xilitol presenta algunas características que lo hacen particularmente atractivo en la industria de alimentos procesados, tales como: gomas de mascar, caramelos, confites, chocolates, helados, jaleas y mermeladas, bebidas, entre otros (Emodi, 1978; Hyvönen *et al.*, 1982; Pepper & Olinger, 1988; Silva *et al.*, 1993/94; Hollingsworth, 2002; Biswas & Vashishtha, 2003).

Algunas propiedades físico-químicas del xilitol son:

- Fórmula química: C₅H₁₂O₅ (Emodi, 1978; Mäkinen, 1978; Hyvönen *et al.*, 1982; Silva *et al.*, 1993/94). La estructura química del xilitol se puede apreciar en la figura 2.

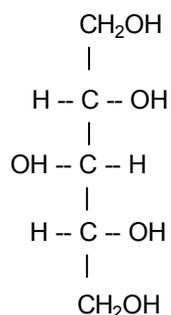


Figura 2. Estructura química del xilitol (Singh & Mishra, 1995).

- Peso molecular: 152.15 (Emodi, 1978; Mäkinen, 1978; Hyvönen *et al.*, 1982; Silva *et al.*, 1993/94; Biswas & Vashishtha, 2003).
- Apariencia: polvo cristalino de color blanco (Emodi, 1978; Mäkinen, 1978; Silva *et al.*, 1993/94; Biswas & Vashishtha, 2003).
- Olor: ninguno (Emodi, 1978; Mäkinen, 1978; Silva *et al.*, 1993/94; Biswas & Vashishtha, 2003).
- Sabor: dulce (Emodi, 1978; Mäkinen, 1978; Silva *et al.*, 1993/94). Tiene un excelente sabor e imparte una sensación refrescante similar a la del mentol. Esto se debe a su calor específico de disolución negativo (-34.8 cal/g). Otros azúcar-alcoholes también presentan este efecto pero en menor grado, por ejemplo el sorbitol cuyo calor de disolución es de -26.5 cal/g. El xilitol debe usarse en su forma cristalina para lograr dicho efecto, ya que en su forma amorfa o en disolución no lo presenta (Emodi, 1978).
- Poder edulcorante: igual al de la sacarosa (Emodi, 1978; Mäkinen, 1978; Silva *et al.*, 1993/94); mayor al del sorbitol (Emodi, 1978; Silva *et al.*, 1993/94) y al del manitol (Emodi, 1978).
- Valor calórico: 2.4 cal/g (FDA, 2005).
- Calor específico de disolución: -34.8 cal/g (Emodi, 1978; Mäkinen, 1978; Silva *et al.*, 1993/94; Biswas & Vashishtha, 2003).
- Punto de fusión: 92-96 °C (Mäkinen, 1978; Silva *et al.*, 1993/94; Biswas & Vashishtha, 2003).
- Punto de ebullición: 216 °C, a presión atmosférica (Counsell, 1978; Emodi, 1978; Mäkinen, 1978; Hyvönen *et al.*, 1982; Silva *et al.*, 1993/94; Biswas & Vashishtha, 2003).

- pH: para una disolución al 5% es de 5-7 (Mäkinen, 1978; Silva *et al.*, 1993/94).
- Densidad: para una disolución al 60% es de 1.23 (Mäkinen, 1978).
- Viscosidad: significativamente menor a la de la sacarosa, por lo que dará menor cuerpo al producto; razón por la cual se deben hacer las modificaciones necesarias en la formulación (Pepper & Olinger, 1988). Para una disolución al 60% la viscosidad es de 20.63 cP (Counsell, 1978; Mäkinen, 1978; Silva *et al.*, 1993/94).
- Higroscopicidad: con una elevada humedad relativa, el xilitol es más higroscópico que la sacarosa (Emodi, 1978; Mäkinen, 1978; Silva *et al.*, 1993/94), y menos que el sorbitol (Emodi, 1978; Silva *et al.*, 1993/94).
- Solubilidad: se disuelve rápidamente en agua y la disolución acuosa es estable aún bajo calentamiento o almacenamiento prolongados (Emodi, 1978). Su solubilidad a 25 °C es de 179.3 g/100 g agua (Mäkinen, 1978).
- Caramelización: debido a la ausencia de grupos aldo o ceto, no sufre la reacción de Maillard (Hyvönen *et al.*, 1982; Silva *et al.*, 1993/94). Sólo puede presentarse si se calienta por varios minutos a temperaturas cercanas a su punto de ebullición (Mäkinen, 1978). El leve amarillento que se forma cuando se calienta por encima de los 150 °C se debe a la presencia de pequeñas impurezas en el xilitol (Emodi, 1978; Hyvönen *et al.*, 1982).
- Impurezas: la presencia de impurezas depende de la materia prima y el proceso, algunas de ellas son el manitol, sorbitol, galactitol y arabitol. (Emodi, 1978; Mäkinen, 1978).
- Cariogenicidad: no es metabolizado por la flora microbiana normal de la boca, lo cual inhibe la formación de caries (Emodi, 1978; Silva *et al.*, 1993/94). Los estudios clínicos han demostrado que el xilitol favorece la salud dental pues no sólo interfiere con la nueva formación de caries sino también con el progreso de la caries existente (Pepper & Olinger, 1988; Kim *et al.* 1999; Hollingsworth, 2002).

El xilitol posee características que representan una ventaja respecto al uso de la sacarosa, entre ellas cabe mencionar:

- Su poder anticariogénico (Emodi, 1978; Hyvönen *et al.*, 1982; Pepper & Olinger, 1988; Silva *et al.*, 1993/94; Nigam & Singh, 1995; Kim *et al.* 1999; Lee *et al.*, 2000;

Hollingsworth, 2002; Biswas & Vashishtha, 2003; Lee *et al.*, 2003; Mussatto & Roberto, 2004);

- No requiere de insulina para su metabolismo (Counsell, 1978; Mäkinen, 1978; Pepper & Olinger, 1988; Silva *et al.*, 1993/94; Kim *et al.* 1999; Lee *et al.*, 2000; Biswas & Vashishtha, 2003; Lee *et al.*, 2003; Mussatto & Roberto, 2004);
- Es un edulcorante permitido para ser utilizado en la dieta para diabéticos, según el Codex Alimentarius (Silva *et al.*, 1993/94; Mussatto & Roberto, 2003);
- No es metabolizado por muchos microorganismos, por lo que los productos que lo contienen presentan un mayor período de conservación (Emodi, 1978; Mäkinen, 1978; Silva *et al.*, 1993/94);
- Brinda un excelente sabor y en su forma cristalina imparte un efecto refrescante similar al del mentol, realzando algunos sabores tales como menta, limón y frutas (Emodi, 1978; Hollingsworth, 2002;).
- No sufre la reacción de Maillard, incluso a altas temperaturas (120-150 °C) (Emodi, 1978; Mäkinen, 1978; Hyvönen *et al.*, 1982; Silva *et al.*, 1993/94).

Entre las potenciales aplicaciones del xilitol en la industria de alimentos están: (Counsell, 1978; Emodi, 1978; Hyvönen *et al.*, 1982; Pepper & Olinger, 1988)

- *Gomas de mascar*: actualmente la principal aplicación del xilitol es su uso como edulcorante en gomas de mascar sin azúcar. La sacarosa puede sustituirse fácilmente tanto con xilitol, manitol o sorbitol, pero el xilitol es el único con el que se puede sustituir en una relación 1:1. En Finlandia, por ejemplo, las gomas con xilitol representan aproximadamente el 60% del mercado. Sin embargo, al utilizar xilitol se deben realizar algunas modificaciones en la formulación del producto para corregir su baja cohesividad y mayor higroscopicidad. El contenido de xilitol, menos del 50% del total de la composición del producto, es efectivo para mejorar su calidad y estabilidad durante el almacenamiento (Biswas & Vashishtha, 2003).
- *Chocolates*: el xilitol es uno de los edulcorantes preferidos para la elaboración de chocolates sin azúcar, siendo el único sustituto del azúcar con suficiente dulzor para ser usado como único edulcorante en el producto. La sustitución de la sacarosa con el xilitol es en una relación 1:1; sin embargo, el chocolate presenta

una menor viscosidad, la cual puede ser corregida con el uso de aditivos. La concentración de xilitol en las barras de chocolate está entre 17-42%. El sabor y la textura del chocolate son comparables a las del producto elaborado con sacarosa.

- *Confités*: los confites confeccionados con xilitol tienen propiedades sensoriales similares a los elaborados con sacarosa, brindando además una agradable sensación de frescura, con la ventaja de ser un producto no cariogénico; asimismo no necesitan edulcorantes artificiales y su sabor es superior a cualquier otro confite sin azúcar.
- *Jaleas y mermeladas*: el xilitol puede sustituir a la sacarosa en una relación 1:1; sin embargo, no se recomiendan concentraciones superiores a 40% pues el xilitol puede cristalizar durante el almacenamiento. No se requiere la adición de preservantes extras, como en el caso de los productos elaborados con sacarosa, ya que el xilitol no favorece el crecimiento de hongos, levaduras u otros microorganismos de deterioro. El sabor y la estabilidad del color son mejores en los productos elaborados con xilitol. La viscosidad es menor pero se puede compensar con un leve aumento en el contenido de pectina.
- *Repostería*: para la elaboración de estos productos utilizando xilitol no es necesario alterar sus formulaciones. Sin embargo, si se desea la formación de corteza, caramelización, o pardeamiento no enzimático, se recomienda la adición de fructosa, ya que el xilitol no forma parte de dichas reacciones. Los productos elaborados con xilitol son menos voluminosos que los obtenidos con sacarosa.
- *Helados*: el xilitol puede ser un sustituto de la sacarosa, sirope de glucosa o azúcar invertido; sin embargo, es necesaria la adición de espesantes pues las propiedades de fusión del producto son alteradas, ya que a igual temperatura los productos elaborados con xilitol tienen una consistencia más suave.
- *Bebidas*: una forma de reducir los carbohidratos y el contenido energético en bebidas es mediante el uso de edulcorantes en sustitución de la sacarosa. Un contenido de xilitol del 4% ha demostrado ser una cantidad adecuada, logrando una viscosidad, entre otras propiedades sensoriales, igual a la del producto elaborado con sacarosa.
- *Salsa de tomate (ketchup) y leche condensada*: ambos son productos con un alto contenido de azúcar, susceptibles al deterioro por microorganismos y a la caramelización; lo cual puede evitarse al reemplazar el azúcar con el xilitol.

- *Salsas y pastas*: estos productos contienen muy poco azúcar, la sustitución del xilitol en una relación 1:1 permite obtener buenos resultados sin ningún problema.

3.3 Producción de xilitol

La mayoría del xilitol es producido en Finlandia (alrededor de 3.0×10^5 toneladas al año), y recientemente se ha introducido al mercado el xilitol hecho en China (Rivas *et al.*, 2006). Existen varias tecnologías para la producción de xilitol, tales como: extracción a partir de frutas y vegetales, síntesis química y procesos biotecnológicos (Náhlík *et al.*, 2003). La extracción del xilitol a partir de fuentes naturales, donde se encuentra en pequeñas cantidades, es poco práctico y no económico (Hyvönen *et al.*, 1982; Nigam & Singh, 1995; Parajó *et al.*, 1997; Buhner & Agblevor, 2003).

Para la producción de xilitol por reducción química o microbiológica se utiliza la D-xilosa o hidrolizados de hemicelulosa ricos en xilano (Hyvönen *et al.*, 1982; Affleck, 2000; Buhner & Agblevor, 2003). En la producción química los residuos de hemicelulosa se hidrolizan con una disolución ácida aplicando calor y presión. Posteriormente el hidrolizado debe someterse a una purificación por pasos para remover los subproductos indeseables que se forman simultáneamente durante la hidrólisis, y lograr así aislar la xilosa. La xilosa aislada es hidrogenada, luego se purifica, se concentra y se cristaliza para obtener el xilitol (Counsell, 1978; Hyvönen *et al.*, 1982). La desventaja de este proceso es que requiere de altas temperaturas y presiones, así como de etapas de separación y purificación para la obtención del xilitol, lo cual lo convierte en un proceso costoso (Hyvönen *et al.*, 1982; Kim *et al.* 1999; Lee *et al.*, 2000; Kim *et al.* 2002; Lee *et al.*, 2003). Además, el rendimiento en la producción de xilitol a partir del xilano inicial es relativamente bajo (40-60%) (Meinander *et al.*, 1994; Nigam & Singh, 1995; Silva *et al.*, 1996; Kim *et al.* 1999; Kim *et al.* 2002).

Los procesos biotecnológicos para la producción de xilitol por medio de la fermentación de la xilosa por levaduras representan una alternativa a los procesos químicos tradicionales, con la ventaja de la selectiva conversión de la xilosa a xilitol, alcanzando así altos rendimientos (Hallborn *et al.*, 1991; Kim *et al.* 1999; Kim *et al.* 2002).

Una amplia variedad de levaduras se han utilizado en la producción de xilitol, tales como *Candida guilliermondii*, *Candida boidinii*, *Candida tropicales*, *Candida parapsilosis*, *Candida mongii*, *Candida pelliculosa*, *Candida shehatae*, *Debaryomyces hansenii*, *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis* (Skoog & Hanh-Hägerdal, 1990; Hallborn *et al.*, 1994; Meinander *et al.*, 1994; Nigam & Singh, 1995; Parajó *et al.*, 1997; Kim *et al.* 1999; Kim *et al.* 2002; Lee *et al.*, 2003; Náhlík *et al.*, 2003). Estos microorganismos tienen la capacidad de convertir la xilosa a xilitol por medio de la enzima xilosa reductasa (XR) (Hallborn *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 1996; Kim *et al.* 1999; Kim *et al.* 2002; Náhlík *et al.*, 2003); sin embargo, posteriormente el xilitol es reducido a xilulosa por medio de la xilitol deshidrogenasa (XDR). La xilulosa es fosforilada a xilulosa 5-fosfato por medio de la xilulosa quinasa que luego entra en la vía de la pentosa fosfato. A partir de la vía pentosa fosfato se obtiene la fructosa 6-fosfato y el gliceraldehído 3-fosfato, los cuales son posteriormente metabolizados a través de la glucólisis para producir piruvato. Dependiendo de la disponibilidad de oxígeno, el piruvato puede ser oxidado a dióxido de carbono por la fosforilación oxidativa, o puede ser fermentado a etanol por medio de la piruvato descarboxilasa y la etanol deshidrogenasa (Hallborn, 1995). El máximo rendimiento en la producción de xilitol con estas levaduras es cercano al 75% (Hallborn *et al.*, 1991); siendo difícil obtener mayores rendimientos debido a que metabolizan el xilitol formado. Es por ello que recientemente se ha prestado especial atención al uso de cepas modificadas genéticamente. Estas levaduras no utilizan la xilosa de forma natural, por lo que se les han incorporado el gen codificador de la enzima xilosa reductasa de manera que puedan convertir la xilosa en xilitol. Debido a la ausencia de la enzima xilitol deshidrogenasa no metabolizan el xilitol producido, generando rendimientos cercanos al 100% (Hallborn *et al.*, 1991; Kim *et al.* 1999; Lee *et al.*, 2000; Kim *et al.* 2002).

Estas cepas necesitan de otra fuente de carbono además de la xilosa, tal como la glucosa, el etanol o el acetato. La glucosa, por ejemplo, es empleada para la regeneración de los cofactores reducidos NAD(P)H requeridos en la reacción de producción de xilitol (figura 3) y para suplir de la energía de mantenimiento metabólica (Hallborn *et al.*, 1994; Meinander & Hahn-Hägerdal, 1997). A partir del metabolismo de la glucosa se produce glicerol, el cual es importante para mantener el balance redox de la célula (Hallborn *et al.*, 1994). El glicerol generalmente es producido durante la fermentación para oxidar el

exceso de NADH (Oura, 1977; Thestrup & Hahn-Hägerdal, 1995). Cuando la levadura está creciendo, la utilización del piruvato para la biosíntesis celular puede generar una acumulación del NADH, la producción de glicerol regenera el NAD⁺ y mantiene el balance redox de la célula (Russel, 2003).

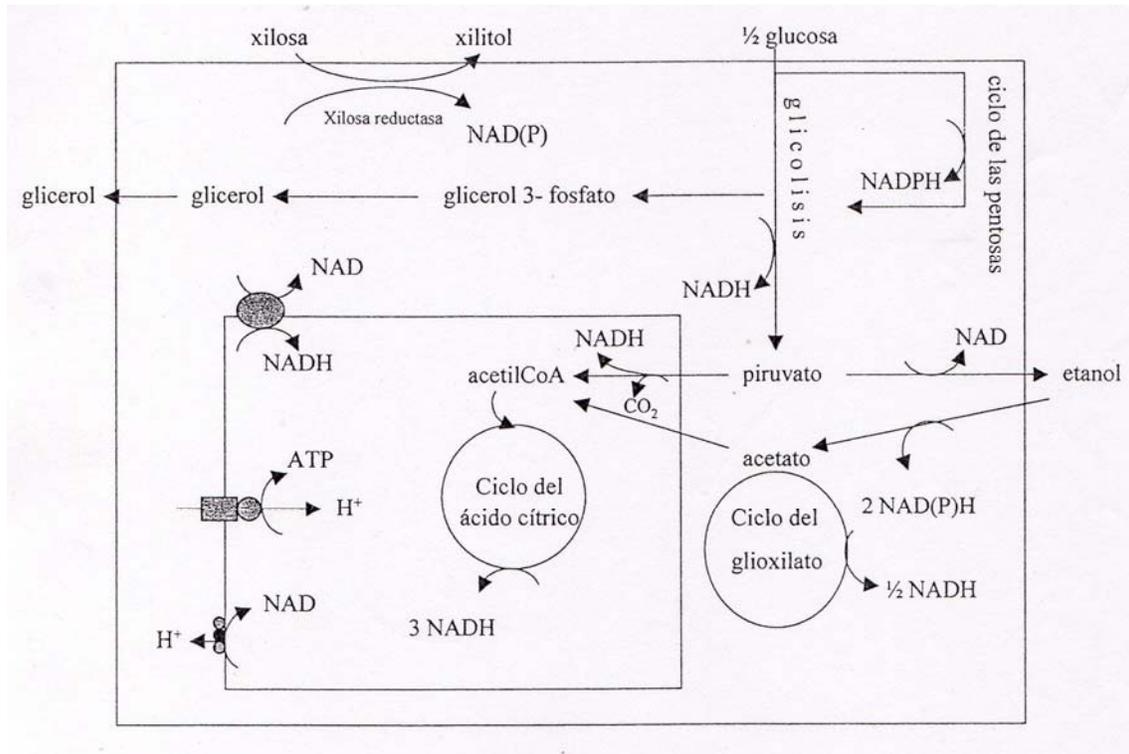


Figura 3. Modelo de reacciones redox involucradas en la transformación de xilitol utilizando una cepa modificada genéticamente (Hallborn *et al.*, 1994).

Una vez que la glucosa ingresa a la célula es convertida en piruvato por la vía glicolítica. El piruvato producido puede tomar dos vías: puede ser oxidado y convertido en dióxido de carbono por la vía del ácido cítrico y la cadena respiratoria, o puede ser convertido en etanol mediante el proceso de fermentación (Hallborn, 1995). En la mitocondria se lleva a cabo la oxidación del piruvato, para producir acetil-CoA, la cual ingresa al ciclo del ácido cítrico y sus dos carbonos son liberados como dióxido de carbono. Las reacciones oxidativas del ciclo del ácido cítrico generan transportadores electrónicos reducidos NADH cuya reoxidación induce la biosíntesis de ATP a través de procesos de la cadena respiratoria mitocondrial: el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa (Mathews *et al.*, 2002).

Los transportadores electrónicos reducidos NADH generados en la glucólisis transfieren sus equivalentes reductores a la matriz mitocondrial. Estos electrones son bombeados hacia el espacio intermembrana, luego los protones entran nuevamente a la mitocondria en donde se proporciona la energía necesaria para producir la síntesis del ATP. La oxidación aeróbica de un mol de glucosa produce 38 moles de ATP mientras que se obtienen dos moles de ATP por vía anaeróbica. Por lo tanto, el metabolismo aerobio resulta ser más eficiente en cuanto a generación de energía para la biosíntesis celular (Mathews *et al.*, 2002).

La xilosa es convertida en xilitol por medio de la enzima xilosa reductasa consumiendo un NAD(P)H y produciendo un NAD(P). Debido a que la cepa no posee la enzima xilitol deshidrogenasa, el xilitol producido no es metabolizado, y por ende se acumula en el medio (Hallborn *et al.*, 1991).

El NAD(P)H requerido para la producción de xilitol proviene de varias fuentes, tal como se aprecia en la figura 3. La oxidación del etanol a acetato (en la vía fermentativa), y la posterior oxidación del acetato en el ciclo del glioxilato genera NADH (Hallborn *et al.*, 1994). También se genera NAD(P)H en el ciclo de las pentosas fosfato y NADH en el ciclo del ácido cítrico, en la glucólisis y en la oxidación del piruvato a acetil-CoA. Sin embargo, Hallborn *et al.* (1994), encontraron que el NAD(P)H que se utiliza para la producción de xilitol proviene de la oxidación del etanol.

3.3.1 Factores que afectan la producción de xilitol

Entre los factores que afectan la producción de xilitol están: el nivel de aireación, la fuente de nitrógeno, la concentración de xilosa, la presencia de otros azúcares y/o cosustratos en el medio de fermentación, el pH y la temperatura (Nigam & Singh, 1995; Silva & Roberto, 1999; Mussatto & Roberto, 2003).

En esta investigación se estudiaron los siguientes factores:

3.3.1.1 Adición de etanol

Para la bioconversión de xilosa a xilitol, la levadura X requiere la presencia de un cosustrato oxidable, tal como la glucosa, el etanol o el acetato; para el mantenimiento de energía y la regeneración de los cofactores requeridos por la enzima xilosa reductasa (Hallborn *et al.*, 1994). Estos autores encontraron que el NAD(P)H que se utiliza para la producción de xilitol proviene de la oxidación del etanol, ya que la producción de xilitol está relacionada estequiométricamente con el consumo del etanol. Por cada mol de etanol convertido en acetato dos moles de NAD(P) se consumen, y por cada dos moles de xilitol producido dos moles de NAD(P) se hacen recircular (Hallborn *et al.*, 1994).

Por este motivo, Meinander *et al.* (1994), sugieren adicionar etanol al medio de fermentación para lograr la conversión de grandes cantidades de xilosa a xilitol. Empleando glucosa o etanol como cosustrato el rendimiento de conversión de la levadura X es cercano a 1 g xilitol / g xilosa consumido; sin embargo, la tasa inicial de conversión es más rápida utilizando glucosa como cosustrato (Hallborn *et al.*, 1994). Por lo que en la presente investigación la glucosa constituirá el principal cosustrato y el etanol será de uso complementario.

3.3.1.2 Nivel de aireación (velocidad de agitación)

La aireación estimula el transporte de azúcares en algunas levaduras, y una gran variedad de organismos requieren oxígeno para el consumo de azúcar. En la producción de xilitol vía microbiana, el nivel de aireación se relaciona con la disponibilidad de los cofactores reducidos NAD(P)H. El NAD(P)H se utiliza para la formación del xilitol y además se emplea en la biosíntesis respiratoria del ATP. Bajo niveles de oxígeno disminuido, una menor cantidad del NAD(P)H es utilizado en la biosíntesis respiratoria del ATP y está más disponible para la producción de xilitol, obteniéndose mayores rendimientos (Hallborn *et al.*, 1994).

Por lo tanto, para una efectiva producción de xilitol, el primer paso a considerar es la rápida acumulación de células microbianas en el medio, lo cual se logra manteniendo un elevado nivel de oxígeno disuelto. Sin embargo, dado que el xilitol es producido bajo condiciones limitadas de oxígeno, no es recomendable mantener un alto nivel de oxígeno

disuelto durante todo el proceso. Por eso, el elevado nivel de oxígeno es necesario sólo en las primeras etapas y luego debe disminuirse al más bajo nivel para simplemente mantener la respiración del microorganismo, que resulta en la acumulación de xilitol (Nigam & Singh, 1995).

Según Mussatto y Roberto (2003), para lograr altos niveles de oxígeno disuelto en el medio, la agitación debe ser mayor, mientras que para disminuir el oxígeno disuelto, la agitación debe ser menor. Otros investigadores (Meinander *et al.*, 1994; Parajó *et al.*, 1997; Domínguez, 1998) también han relacionado distintas velocidades de agitación con el nivel de oxígeno disuelto en el medio; obteniendo mayores rendimientos en la producción de xilitol cuando se generan condiciones limitadas de oxígeno.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización del proyecto

El proyecto se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) y en el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA). Además se contó con el apoyo del Laboratorio de Bacteriología Médica de la Facultad de Microbiología. Dichos lugares están ubicados en la Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca.

4.2 Materiales

4.2.1 Microorganismo

El microorganismo utilizado fue donado por la Dra. Bärbel Hahn-Hägerdal de la Universidad de Lund, Suecia; se recibió crecido en el medio de cultivo Sc-leu con 20 g/L de glucosa. Por razones de confidencialidad se le denominará levadura X.

4.2.2 Medios de cultivo

4.2.2.1 Mantenimiento de la cepa

Para el mantenimiento y crecimiento de la cepa se utilizó el medio de cultivo Sc-leu el cual tiene la siguiente composición: 6.7 g/L de Base Nitrogenada de Levadura sin aminoácidos, y 0.05 g/L de uracilo, L-histidina y L-triptófano (Thestrup & Hahn-Hägerdal, 1995).

4.2.2.2 Fermentaciones

Para las fermentaciones se utilizó un medio con la siguiente composición: 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de bactopectona, 10 g/L de xilosa y 20 g/L de glucosa (Arce, 2004).

Todos los componentes del medio se esterilizaron a 121 °C; la glucosa y la xilosa se autoclavaron por aparte durante 15 minutos y el resto de los componentes durante 30 minutos. Los tiempos de esterilización aplicados se escogieron según las características del recipiente utilizado (erlenmeyers, carboys, entre otros), ya que en pruebas preliminares estas condiciones aseguraron la esterilidad.

4.2.3 Equipo de fermentación

Para realizar las fermentaciones se empleó un fermentador / bioreactor marca New Brunswick modelo BIOFLO 110 de 2.2 L, con un volumen de trabajo de 1.5 L (figura 4). Este equipo cuenta con controladores de: temperatura, velocidad de agitación, pH, y oxígeno disuelto. Además, posee mecanismos de alimentación, toma de muestra y drenaje.



Figura 4. Equipo de fermentación utilizado en la presente investigación.

La calibración del sensor de pH se realizó con una solución buffer de 7.0 seguida de una de 4.0. La calibración del sensor de oxígeno se llevó a cabo mediante la aspersion de nitrógeno gaseoso en el medio de fermentación para establecer el 0% de oxígeno

disuelto, seguida de una aspersión de aire para el 100% de oxígeno disuelto. La esterilización del bioreactor se realizó a 121 °C durante 30 minutos.

4.3 Preparación de copias de la levadura X¹

4.3.1 Reconstitución y propagación

Para reconstituir y propagar el microorganismo se tomaron varias asadas de la levadura X y se dispersaron en un tubo de ensayo que contenía 1 mL del medio líquido Sc-leu sin glucosa. Con un gotero se succionó una porción de la suspensión líquida, se expulsó en un erlenmeyer que contenía medio sólido Sc-leu con 20 g/L de glucosa y se incubó a 30 °C durante 48 horas.

4.3.2 Mantenimiento

Para el mantenimiento de la levadura X se preparó un medio líquido con 9 partes de glucosa (20 g/L), y una parte del medio Sc-leu y glicerol (20% v/v). El medio se distribuyó en viales criogénicos. La cepa, crecida previamente en el erlenmeyer, se resuspendió con medio Sc-leu sin glucosa y se distribuyó en los viales. Los viales se congelaron a -70 °C y se mantuvieron a esa temperatura.

4.4 Curva de crecimiento

Tomando como base las condiciones de fermentación propuestas por Arce (2004), se estudió la producción y el consumo de metabolitos (glucosa, xilosa, etanol, glicerol, xilitol) por medio de la curva de crecimiento de la levadura X, pero esta vez llevando a cabo la fermentación en el bioreactor. Esto permitió observar el comportamiento de la cepa en el medio de cultivo de fermentación, determinar el momento propicio para la adición de etanol, establecer los niveles de aireación (velocidad de agitación), definir los tiempos de fermentación y si era necesario controlar el pH del medio.

¹ Tomando como referencia lo expuesto por Arce (2004) en: "Evaluación de la producción de xilitol a nivel de laboratorio, por vía fermentativa a partir de xilosa comercial".

4.4.1 Preparación del inóculo

Se tomó uno de los viales mantenidos a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, se descongeló rápidamente en un baño con agua a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, parte de su contenido se inoculó en un erlenmeyer de 250 mL con 50 mL del medio Sc-leu y 20 g/L de glucosa, y la otra parte se inoculó en placas de Petri con 20 mL del medio Sc-leu, 20 g/L de agar y 20 g/L de glucosa. Ambas partes se incubaron a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. En la figura 5 se muestran los erlenmeyers y placas de Petri en los que se preparó el inóculo.



Figura 5. Material y medios en los que se preparó el inóculo.

Posteriormente, el cultivo se inoculó en erlenmeyers con medio Sc-leu, 20 g/L de agar y 20 g/L de glucosa, y se incubó a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante otras 48 horas. Por último, se tomó una cantidad de la cepa crecida y se dispersó en agua destilada estéril hasta obtener una absorbancia inicial promedio de 0.800; que corresponde a una concentración celular de 1.1×10^6 células/mL. Este es el inóculo que se empleó en las fermentaciones.

4.4.2 Crecimiento del microorganismo

Para determinar la curva de crecimiento de la levadura X, se alimentó el bioreactor con 1200 mL de disolución de extracto de levadura (10 g/L) y bactopectona (20 g/L), 150 mL de disolución de glucosa (20 g/L) y xilosa (10 g/L), y 150 mL de la suspensión del inóculo con una absorbancia promedio de 0.800 que corresponde a una concentración celular de 1.1×10^6 células/mL; para un volumen total de trabajo de 1500 mL. En la figura 6 se observa el proceso de alimentación del bioreactor.

Durante la determinación de la curva de crecimiento la temperatura se fijó en 30 °C, el flujo de aireación en 0.8 L/min, y la velocidad de agitación en 200 rpm. El muestreo se llevó a cabo a lo largo de 100 horas de fermentación.



Figura 6. Proceso de alimentación del bioreactor con los distintos componentes del medio de fermentación.

Se realizaron dos curvas: una de ellas sin control del pH del medio para familiarizarse con el metabolismo de la cepa; y en la otra curva se controló el pH a un valor fijo de 6.5 mediante la adición de NaOH 5 N. Esto para evaluar si existe diferencia en la producción de xilitol cuando se controla esta variable.

4.4.3 Toma de muestra

A través del mecanismo de toma de muestra del bioreactor, se extrajeron 10 mL de caldo fermentado en cada muestreo. Las muestras experimentales fueron centrifugadas a 12000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante fue microfiltrado (membrana de 0.45 μm) y congelado para su posterior análisis. En la figura 7 se presenta el material requerido para la centrifugación y posterior filtración de las muestras extraídas.

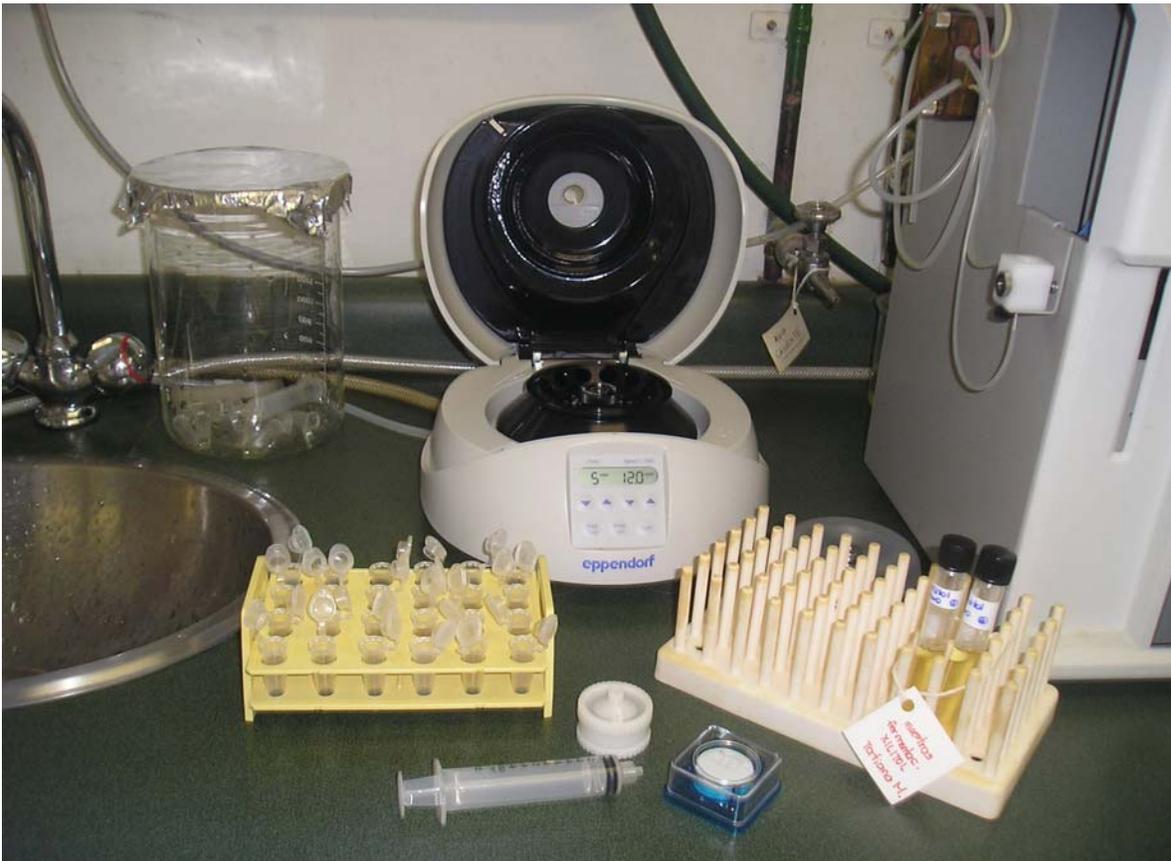


Figura 7. Material necesario para la centrifugación y filtración de las muestras.

A cada muestra se le determinó la concentración de glucosa, xilosa, etanol glicerol, xilitol y la concentración celular, según los procedimientos que se describen en las secciones 4.8.1 y 4.8.2.

4.5 Análisis de la variabilidad del proceso de producción de xilitol

Para determinar el mínimo número de repeticiones a utilizar en la evaluación de las condiciones de producción de xilitol, se realizaron fermentaciones con 1200 mL de disolución de extracto de levadura (10 g/L) y bactopectona (20 g/L), 150 mL de disolución de glucosa (20 g/L) y xilosa (10 g/L), y 150 mL de la suspensión del inóculo con una absorbancia promedio de 0.779 que corresponde a una concentración celular de 1.1×10^6 células/mL; para un volumen total de trabajo de 1500 mL. La temperatura se fijó en 30 °C, el flujo de aireación en 0.8 L/min, y la velocidad de agitación en 200 rpm.

Se tomaron muestras a lo largo de las fermentaciones para determinar la concentración de xilitol. Por efectos prácticos, se analizaron las muestras a las 25 horas, se compararon los resultados y se analizó la variabilidad del proceso de producción de xilitol.

4.6 Evaluación de las condiciones de producción de xilitol y otros metabolitos

Se procedió a estudiar el efecto de dos variables sobre la producción de xilitol: el efecto de la adición de etanol durante la fermentación, y el efecto de distintos niveles de aireación (velocidad de agitación). Con base en la literatura y en los resultados obtenidos durante la prueba preliminar, se eligieron dos niveles para cada una de estas variables (Sección 4.6.1 y 4.6.2). Además se evaluó la producción de xilitol en tres diferentes tiempos durante la fermentación.

4.6.1 Adición de etanol

Los resultados obtenidos por Arce (2004), presumen que existe una sincronía entre el consumo de etanol y la producción de xilitol; de ahí el interés por estudiar esta variable.

Para estudiar el efecto de la adición de etanol sobre la producción de xilitol se eligieron las concentraciones de 0 g/L y 3 g/L. Hallborn *et al.* (1994), recomiendan hasta 10 g/L de etanol como cosustrato al inicio de la fermentación; sin embargo, según los

resultados de la prueba preliminar, cuando la concentración de etanol es de 3 g/L todavía mantiene la producción de xilitol. El momento indicado para la alimentación de etanol se estableció a las 50 horas, según el comportamiento observado en la curva de crecimiento de la levadura X, llevada a cabo durante la prueba preliminar.

4.6.2 Niveles de aireación (velocidad de agitación)

Para llevar a cabo las fermentaciones se aireó el medio con un flujo de 0.6 L/min, y se escogieron dos niveles de aireación logrados al variar la agitación (rpm); medidos por el bioreactor, a través de uno de sus sensores, como porcentaje de oxígeno disuelto en el medio (% dO₂). Las velocidades de agitación de 200 rpm y 250 rpm se escogieron con base en los resultados de la prueba preliminar. Estas corresponden a condiciones limitadas de oxígeno y condiciones aerobias, respectivamente (Parajó *et al.*, 1997).

La aireación se llevó a cabo a través de una tubería de aire, conectada al bioreactor usando uno de los mecanismos de alimentación. El aire se esterilizó por filtración con membrana de 0.22 μm, y posteriormente ingresó al sistema para disolverse en el medio. El flujo de aire se midió con un rotámetro.

4.6.3 Tiempo de fermentación

Se evaluó la producción de xilitol en tres diferentes tiempos para detectar el menor tiempo en el que se producía la mayor cantidad de xilitol. Los tres tiempos evaluados fueron 50, 70 y 94 horas, los cuales se eligieron con base en los resultados obtenidos en la curva de crecimiento de la levadura X, llevada a cabo durante la prueba preliminar.

Cada tratamiento se realizó con un medio compuesto de extracto de levadura (10 g/L), bactopectona (20 g/L), glucosa (20 g/L) y xilosa (10 g/L), y la suspensión del inóculo con una absorbancia promedio de 0.821 que corresponde a una concentración celular de 1.1×10^6 células/mL. La temperatura se fijó en 30 °C y el flujo de aireación en 0.6 L/min. La velocidad de agitación fue de 200 rpm ó 250 rpm; con o sin adición de etanol, según el tratamiento.

4.6.4 Diseño experimental

La evaluación de los resultados se llevó a cabo mediante un diseño factorial de 2^2 para cada tiempo de fermentación evaluado, orientado hacia la determinación de condiciones de fermentación apropiadas para la producción de xilitol.

De esta forma se realizaron un total de 4 tratamientos diferentes por duplicado, conforme a los resultados obtenidos en la sección 4.5. A continuación se presentan los factores, sus niveles y el arreglo matricial.

Cuadro 1. Niveles de los factores del diseño factorial 2^2

Factor	Niveles	
	-	+
Concentración de etanol añadida (g/L)	0	3
Nivel de aireación (velocidad de agitación) (rpm)	200	250

Cuadro 2. Arreglo matricial del diseño factorial 2^2

Tratamiento	Variables	
	Etanol (g/L)	Agitación (rpm)
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+

Las variables respuesta en este estudio fueron la concentración de cada uno de los metabolitos y sustratos involucrados en el proceso (glucosa, xilosa, glicerol, etanol, xilitol), el rendimiento en la producción de xilitol (g de xilitol/ g de xilosa inicial) y la productividad de xilitol (g/L*h).

La evaluación estadística de los datos consistió en un análisis de variancia (ANDEVA) para determinar si existían diferencias en los promedios de cada variable

respuesta entre los distintos niveles de cada factor y si las interacciones entre los factores fueron significativas, para cada uno de los tiempos de fermentación evaluados.

4.7 Comparación de resultados

A partir de los resultados obtenidos, se eligió el tratamiento que produjo el mayor rendimiento de xilitol (g de xilitol/ g de xilosa inicial), y se comparó con los resultados obtenidos a nivel de laboratorio por Arce (2004); con el fin de valorar el efecto de las variables estudiadas: adición de etanol y nivel de aireación (velocidad de agitación), en los tiempos de fermentación evaluados. De esta forma se pretendió establecer las condiciones de fermentación que propician la máxima producción de xilitol. Asimismo, se pudo comparar la máxima productividad de xilitol (g/L*h) alcanzada a nivel de laboratorio y a nivel piloto.

4.8 Métodos de análisis

Se realizaron los siguientes análisis a las muestras: determinación de la concentración de biomasa y determinación de la concentración de xilosa, xilitol, glucosa, etanol, y glicerol en diferentes tiempos de fermentación.

4.8.1 Concentración de biomasa

La concentración de biomasa se determinó por densidad óptica empleando un espectrofotómetro Shimadzu UV-240. Para ello se construyó una curva de calibración empleando suspensiones de la levadura X con diferentes densidades ópticas a las cuales se les determinó la concentración celular realizando conteos al microscopio, utilizando una cámara de Neubauer (Bright Line Counting Chamber, marca Hausser Scientific Company).

A las muestras experimentales se les midió la absorbancia a 620 nm y por medio de la curva de calibración se calculó su concentración celular. En algunos casos fue necesario diluir las muestras, pipeteando 0.5 mL ó 1.0 mL y aforando con agua destilada en balones de 10 mL. En dichos casos se aplicó el factor de dilución respectivo.

4.8.2 Concentración de xilosa, xilitol, glucosa, etanol y glicerol

La determinación de xilosa, xilitol, glucosa, etanol y glicerol se llevó a cabo mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), haciendo uso de un cromatógrafo marca Merck Hitachi, con un detector de índice de refracción y una columna Aminex HPX 87C, marca Biorad. Las condiciones, definidas por Arce (2004), fueron: temperatura de 85 °C, agua desionizada como fase móvil y un flujo de 0.4 mL/min.

Se construyó una curva de calibración al relacionar las concentraciones de patrones de xilosa, xilitol, glucosa, etanol y glicerol con el área bajo la curva generada por su señal en el cromatógrafo.

Para analizar las muestras experimentales fue necesario diluirlas, para ello se pipetearon 1.0 mL de la muestra y 3.0 mL de agua destilada. Posteriormente, se filtraron con membrana de 0.45 μm y se inyectaron en el cromatógrafo. Los analitos de las muestras fueron detectados al comparar sus tiempos de retención con los de los patrones correspondientes, y fueron cuantificados haciendo uso de la curva de calibración construida, aplicando el factor de dilución que corresponde.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tomando como base las condiciones de fermentación propuestas por Arce (2004), se estudió la producción y el consumo de metabolitos (glucosa, xilosa, etanol, glicerol, xilitol) por medio de la curva de crecimiento de la levadura X en un bioreactor de 2.2 L. Esto permitió observar el comportamiento de la cepa en el medio de cultivo de fermentación, determinar el momento propicio para la adición de etanol, establecer los niveles de aireación (velocidad de agitación), definir los tiempos de fermentación y si era necesario controlar el pH del medio; en una escala 60 veces mayor a la estudiada previamente por Arce (2004).

5.1 Curva de crecimiento

Los resultados para la curva de crecimiento de la levadura X se presentan en la figura 8 y en el cuadro 5 del Anexo. En esta gráfica se aprecia una fase logarítmica o de crecimiento exponencial y una fase estacionaria.

Con base en los datos analizados para la concentración celular se puede observar en la figura 8 que la fase logarítmica se presentó dentro de las primeras 23 horas, donde la concentración celular aumentó a $7.4 \cdot 10^6$ células/mL; para un volumen de trabajo de 1500 mL. Probablemente esta fase terminó en un periodo menor a las 23 horas; sin embargo, no se tienen datos entre las 12 y 23 horas pues correspondían a horas no hábiles para la toma de muestra, por lo que no se puede decir con exactitud donde termina esta fase e inicia la siguiente. Arce (2004), reporta que la fase logarítmica se presenta durante las primeras 14 horas de fermentación (se puede apreciar en la figura 42 del Anexo), donde la concentración celular aumentó a $2.3 \cdot 10^7$ células/mL; para un volumen de trabajo de 25 mL.

Durante esta fase la glucosa es consumida para la biosíntesis celular y la generación de etanol y glicerol. A partir de los resultados del cuadro 5 del Anexo se obtiene que durante las primeras 23 horas, la glucosa se ha consumido en un 79.1%, y no en su totalidad como reporta Arce (2004) para esta fase. Sin embargo, la concentración

de glucosa inicial utilizada por Arce (2004) (10.69 g/L), corresponde a un 54.1% menos que la empleada en esta investigación (23.31 g/L).

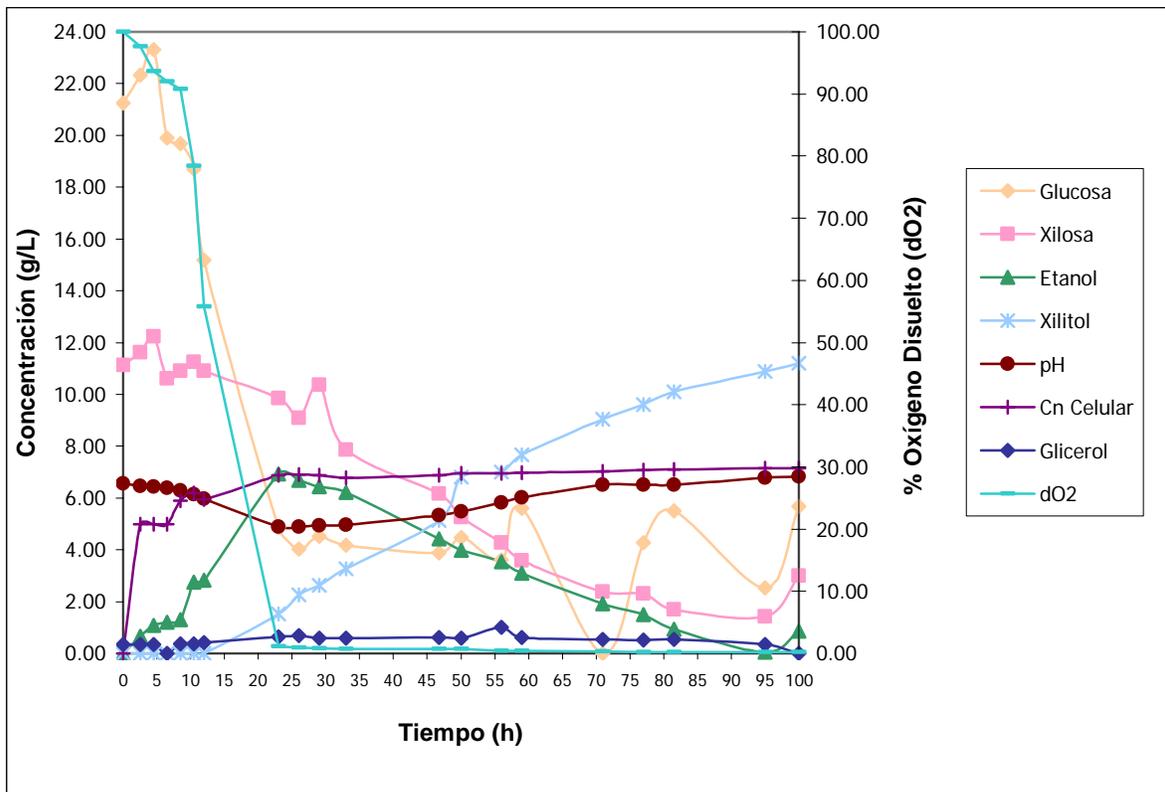


Figura 8. Cambios en la concentración de glucosa, xilosa, etanol, xilitol, glicerol, concentración celular, pH y oxígeno disuelto durante el crecimiento de la levadura X, en un sistema de fermentación por lote.

Una vez que la glucosa ingresa a la célula, parte de ella es convertida en piruvato por la vía glicolítica. El piruvato producido es convertido en etanol mediante el proceso de fermentación (Hallborn, 1995). La glucosa es empleada para la regeneración de los cofactores reducidos NAD(P)H requeridos en la reacción de producción de xilitol y para suplir la energía de mantenimiento metabólica (Hallborn *et al.*, 1994; Meinander & Hahn-Hägerdal, 1997).

En la figura 8 se puede observar que en esta fase se produjo etanol; esto sugiere que la levadura experimentó el efecto “crabtree” o “efecto de la glucosa” en donde a pesar de la presencia de oxígeno (el oxígeno disuelto (dO₂) disminuyó de 100% a 1.1%, ver cuadro 5 del Anexo), la cepa toma la vía fermentativa anaerobia para utilizar la glucosa si

ésta se encuentra en altas concentraciones (Postma *et al.*, 1988). A las 23 horas de fermentación se produjo la máxima concentración de etanol, siendo igual a 6.92 g/L, que posteriormente fue consumido por la cepa. Este resultado es ligeramente mayor al obtenido por Arce (2004), en donde a las 14 horas de fermentación se produjo 5.19 g/L de etanol; y por Hallborn *et al.* (1994), en donde a partir de 10 g/L de glucosa y en condiciones aerobias, se generó alrededor de 5 g/L de etanol.

Además de etanol y biomasa, a partir de glucosa se genera glicerol. En la figura 8 se puede observar que se produjo alrededor de 0.65 g/L de glicerol. Este resultado duplica el obtenido por Arce (2004), en donde a las 14 horas de fermentación se produjo alrededor de 0.3 g/L de glicerol. El glicerol es un componente importante para mantener el balance redox de la célula (Hallborn *et al.*, 1994) y generalmente se produce durante la fermentación para oxidar el exceso de NADH (Oura, 1977; Thestrup & Hahn-Hägerdal, 1995). Cuando la levadura está creciendo, la utilización del piruvato para la biosíntesis celular puede generar una acumulación del NADH, la producción de glicerol regenera el NAD⁺ y mantiene el balance redox de la célula (Russel, 2003).

Después de las 23 horas se observa una fase estacionaria donde la concentración celular alcanza $9.4 \cdot 10^6$ células/mL y se mantiene constante hasta el final de la fermentación. Esto es característico de la fase estacionaria en el crecimiento microbiano, en donde el número de células nuevas generadas es igual al número de células que muere (Russel, 2003). De la figura 8 se puede ver que al inicio de esta fase la xilosa empieza a ser consumida. Este microorganismo al ser genéticamente modificado, no utiliza la xilosa como su principal fuente de carbono sino que requiere de glucosa para iniciar sus funciones metabólicas. En los estudios similares en los que se emplea 10 g/L de glucosa y xilosa como fuente de carbono, se ha observado que la xilosa no empieza a ser consumida hasta que se acabe la glucosa del medio. Esto se debe a que la glucosa comparte el mismo sistema de transporte de la xilosa pero con una mayor afinidad, por lo que cuando se encuentra en altas concentraciones satura dicho sistema e inhibe el ingreso de la xilosa a la célula (Meinander & Hahn-Hägerdal, 1996; Meinander & Hahn-Hägerdal, 1997). Sin embargo, según se observa en la figura 8, a las 23 horas aún hay presencia de glucosa en el medio (4.87 g/L) pero no la suficiente como para impedir el ingreso de la xilosa a la célula, dado que se observa un ligero consumo de ésta.

Asimismo, se aprecia que inicia el consumo de etanol. En este aspecto Meinander y Hahn-Hägerdal (1997), aseguran que el sistema de transporte de la glucosa puede saturarse por el etanol, retardando así el metabolismo del cosustrato. El etanol inhibe el sistema de transporte de la glucosa de manera no-competitiva, al interferir con las regiones hidrofóbicas de la membrana celular; inhibiendo así la conversión de la xilosa en un 15%.

Es en esta fase estacionaria que se lleva a cabo la producción de xilitol, coincidiendo también con lo observado por Meinander y Hahn-Hägerdal (1997). De la figura 8 se puede ver que a las 23 horas inicia la producción de xilitol, siendo igual a 1.52 g/L (cuadro 5 del Anexo). La xilosa es reducida y produce el xilitol, y el etanol es utilizado para la regeneración de los cofactores NAD(P)H necesarios para llevar a cabo esta transformación (Hallborn *et al.*, 1991). Así, de la figura 8 se puede observar que una vez que la xilosa empieza a ser consumida la concentración de etanol también disminuye e inicia la producción de xilitol. Lo anterior coincide con lo propuesto por Hallborn *et al.* (1994), quienes aseguran que el consumo de etanol y la producción de xilitol mantienen una relación estequiométrica por medio de la regeneración del NAD(P) ya que 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 recircular.

Analizando el porcentaje de oxígeno disuelto (%dO₂) a lo largo de la fermentación (cuadro 5 del Anexo) se puede ver que conforme entró oxígeno al sistema fue consumido para el mantenimiento celular debido a que el %dO₂ es cada vez menor; y se presume así que no hubo muerte celular pues en este caso se observaría una acumulación de oxígeno en el medio. Asimismo, observando la producción de xilitol hacia el final de la fermentación (100 horas) no se aprecia una interrupción en la misma, ni en el consumo de xilosa y etanol, lo que permite descartar que la fase de muerte de la levadura X haya iniciado en ese tiempo.

Según se mencionó en la sección 4.4, en la presente investigación se evaluó si existe diferencia en la producción de xilitol cuando se controla el pH del proceso, debido a que según reportes de Meinander *et al.* (1994), la acumulación de ácido acético en el medio, por la oxidación del etanol llevada a cabo por la levadura X, podría causar

envenenamiento de las células a un pH por debajo de 4.5; con la simultánea suspensión de la producción de xilitol. Dicho envenenamiento puede evitarse ya sea aumentando el pH de 4.5 a 6.5 mediante la adición de un álcali; o por una más efectiva aireación del medio para promover la producción de masa celular (Meinander *et al.*, 1994). El ácido acético se puede difundir a través de la membrana celular sólo en su forma disociada. Conforme más bajo es el pH del ambiente hay más moléculas disociadas del ácido acético y, por lo tanto, es más tóxico para las células. Bajo condiciones limitadas de oxígeno el ácido acético es secretado en el medio, y su acumulación podría causar envenenamiento de las células a bajo pH. En condiciones aerobias las células son capaces de metabolizar el ácido acético a través del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) y la glucogénesis, para la producción de masa celular (Meinander *et al.*, 1994).

Los resultados para la curva de crecimiento de la levadura X con control del pH del medio de fermentación se observan en la figura 9 (cuadro 6 del Anexo). Las tendencias observadas coinciden con las obtenidas para la curva de crecimiento sin control del pH (figura 8), con algunas pequeñas diferencias en las concentraciones de los metabolitos analizados.

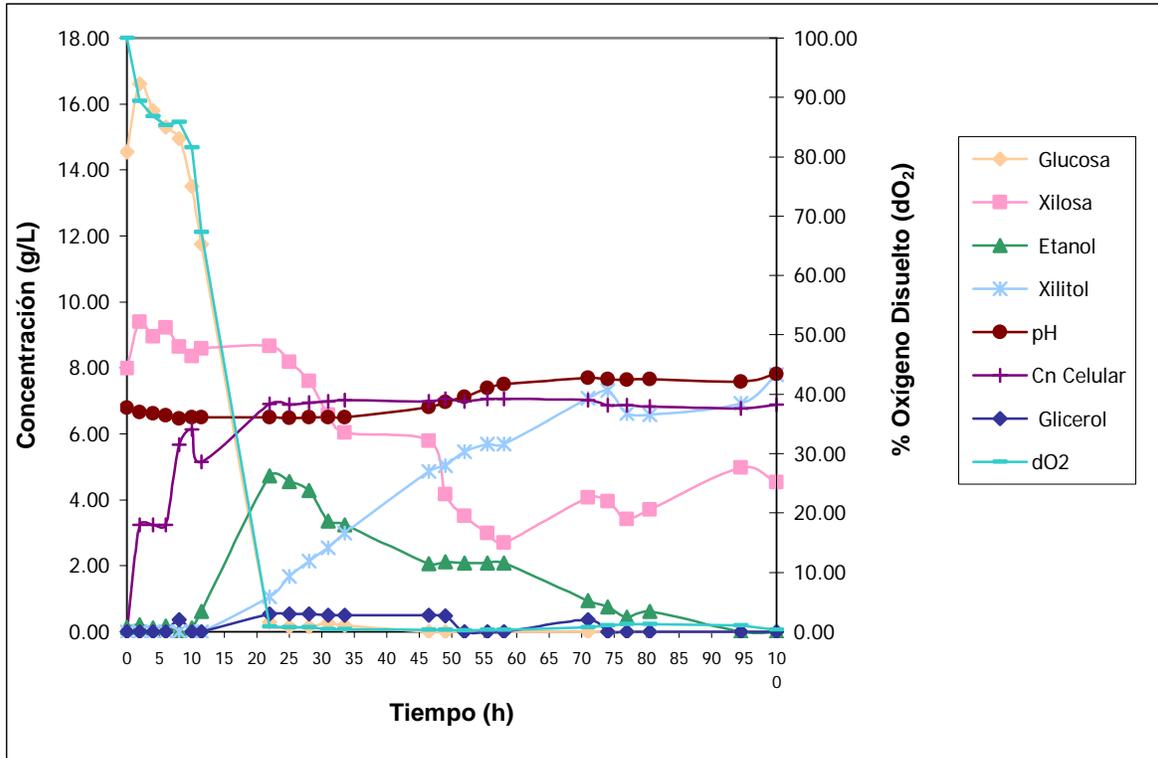


Figura 9. Cambios en la concentración de glucosa, xilosa, etanol, xilitol, glicerol, concentración celular y oxígeno disuelto durante el crecimiento de la levadura X, fijando el pH en 6.5, en un sistema de fermentación por lote.

Con base en los datos analizados para la concentración celular se puede observar en la figura 9 que la fase logarítmica se presentó dentro de las primeras 22 horas, donde la concentración celular fue de $8.1 \cdot 10^6$ células/mL; concentración similar a la de la curva de crecimiento sin control del pH que correspondió a $7.4 \cdot 10^6$ células/mL. El consumo de glucosa para la curva de crecimiento sin control del pH fue de 18.44 g/L para esta fase; valor similar al de la curva con control de pH que correspondió a 16.32 g/L. A las 22 horas de fermentación se produjo la máxima concentración de etanol, siendo igual a 4.73 g/L, resultado menor en comparación al obtenido durante la curva de crecimiento sin control del pH (6.92 g/L). En el cuadro 6 se puede observar que para este tiempo se produjo alrededor de 0.54 g/L de glicerol, resultado similar al obtenido durante la curva de crecimiento sin control del pH (0.65 g/L). En esta fase el oxígeno disuelto (dO_2) disminuyó de 100% a 0.9% (ver cuadro 6 del Anexo), resultado similar al obtenido durante la curva de crecimiento sin control del pH, donde el oxígeno disuelto (dO_2) disminuyó de 100% a 1.1%.

Después de las 22 horas se observa una fase estacionaria donde la concentración celular alcanza $8.8 \cdot 10^6$ células/mL y se mantiene constante hasta el final de la fermentación. De la figura 9 se puede observar que después de las 22 horas la xilosa y el etanol empiezan a ser consumidos, e inicia la producción de xilitol, siendo igual a 1.07 g/L (cuadro 6 del Anexo), mientras que para la curva de crecimiento sin control del pH fue de 1.52 g/L.

Analizando el porcentaje de oxígeno disuelto (%dO₂) a lo largo de la fermentación con control del pH (cuadro 6 del Anexo) se puede ver que conforme entró oxígeno al sistema fue consumido para el mantenimiento celular debido a que el %dO₂ es cada vez menor; y se presume así que tampoco hubo muerte celular en este caso. Asimismo, observando la producción de xilitol hacia el final de la fermentación (100 horas) no se aprecia una interrupción en la misma, ni en el consumo de xilosa, lo que permite descartar que la fase de muerte de la levadura X haya iniciado en ese tiempo.

De ambas figuras (8 y 9) puede observarse que el pH se mantuvo relativamente constante a lo largo de la fermentación, aún cuando no se controló el pH del medio, y en este caso nunca fue menor de 4.90; por lo que se descartó la posibilidad de intoxicación de las células. Cuando no se controló el pH se produjo más etanol y, dado que la oxidación del etanol llevada a cabo por la levadura X resulta en la acumulación de ácido acético en el medio (Meinander *et al.*, 1994), era de esperar un pH menor en la curva de crecimiento sin control del pH.

Se obtuvieron resultados más satisfactorios en el rendimiento de la producción de xilitol durante la curva de crecimiento sin control del pH siendo de 0.91 g xilitol/ g xilosa inicial, en comparación con 0,83 g xilitol/ g xilosa inicial con control del pH. De igual forma, la productividad de xilitol obtenida durante la curva de crecimiento sin control del pH (0.11 g/L*h) es mayor a la lograda con control de pH (0.078 g/L*h).

Con base en estos resultados se decidió llevar a cabo los siguientes experimentos sin controlar el pH a lo largo del tiempo, pues la producción de xilitol se vio favorecida debido a que se dio una mayor producción de etanol. En este aspecto, Hallborn *et al.*

(1994), aseguran que el NAD(P)H que se utiliza para la producción de xilitol proviene de la oxidación del etanol.

5.2 Variabilidad del proceso de producción de xilitol

Para encontrar la variabilidad del proceso de producción de xilitol y definir así el número de repeticiones a utilizar en la evaluación de las condiciones de producción de xilitol, se prepararon 3 fermentaciones con una concentración inicial promedio de glucosa de 18.88 g/L y de xilosa igual a 9.84 g/L.

Se tomaron muestras a lo largo de cada una de las fermentaciones y se les determinó la concentración de xilitol. Se analizaron las muestras a las 25 horas pues según los resultados de las figuras 8 y 9 para este tiempo ya se ha producido xilitol, además permite realizar este análisis sin necesidad de esperar a que termine la fermentación (100 horas). Los resultados obtenidos aparecen en el cuadro 3.

Cuadro 3. Concentración de xilitol obtenida a las 25 horas para las diferentes fermentaciones.

Réplica	Concentración de xilitol (g/L)
1	2,2608
2	1,6772
3	2,0858

La varianza de la concentración de xilitol obtenida para las tres réplicas fue de 0.0576. Utilizando este resultado junto con un $d = 1$ g/L (mínima diferencia a detectar), un $\alpha = 0.05\%$ y un $\beta = 0.20$ o una potencia de prueba de 80%, se determinó que es necesario llevar a cabo cada tratamiento dos veces. No se realizaron más repeticiones dadas las limitaciones en el tiempo de preparación y uso del bioreactor, así como el costo de cada cinética. Además, se considera que una potencia de prueba del 80% es un valor aceptable tratándose de un proceso biológico de difícil control (Cubero, 2006).

5.3 Evaluación de las condiciones de producción de xilitol y otros metabolitos

En este apartado se determinó el efecto de la adición de etanol durante la fermentación, y distintos niveles de aireación (velocidad de agitación) sobre la producción de xilitol. Además se evaluó la producción de xilitol en tres diferentes tiempos durante la fermentación. Esto con el fin de analizar los resultados desde el punto de vista de mayor rendimiento en la producción de xilitol (g de xilitol/ g de xilosa inicial) y mayor productividad de xilitol (g/L*h).

En cuanto a la adición de etanol, el momento indicado para la alimentación del mismo se estableció a las 50 horas de fermentación pues, según las pruebas preliminares, es cerca de este tiempo que la concentración de etanol en el medio se ha consumido alrededor de la mitad; y en el caso de agotarse podría interrumpir la producción de xilitol. De las figuras 8 y 9 (cuadros 6 y 7 del Anexo, respectivamente) se puede apreciar que para las 50 horas ya se ha consumido alrededor de la mitad de la máxima concentración de etanol producido en la fase logarítmica. Para la curva de crecimiento sin control de pH (cuadro 5 del Anexo) la concentración de etanol disminuyó de 6.92 g/L a 3.97 g/L a las 50 horas. Mientras que para la curva de crecimiento con control de pH (cuadro 6 del Anexo) la concentración de etanol disminuyó de 4.73 g/L a 2.12 g/L a las 50 horas.

Durante el estudio del nivel de aireación (velocidad de agitación), por limitaciones de diseño en el bioreactor no se pudo trabajar con velocidades de agitación mayores a 250 rpm y flujos de aire superiores a 0.6 L/min, ya que incluso para estas condiciones fue necesario adaptar una trampa de agua al sistema, tal como se observa en la figura 10; esto para ayudar a liberar la presión interna generada dentro del bioreactor. La velocidad de agitación de 200 rpm se mantuvo debido a que con ésta se obtuvieron buenos resultados durante las pruebas preliminares.



Figura 10. Equipo de fermentación con trampa de agua adaptada al sistema.

La selección de los tiempos de fermentación se realizó con base en los siguientes criterios. Se estudió el tiempo de 50 horas pues es el escogido para la adición de etanol. El tiempo de 94 horas fue seleccionado por efectos prácticos para finalizar la fermentación ya que correspondía a horas hábiles para la toma de muestra. Arce (2004), afirma que a las 92 horas de fermentación se pudo detectar una interrupción en el consumo de xilosa y en la producción de xilitol debido a que se terminó el etanol presente en el medio. En la presente investigación, de las figuras 8 y 9 se puede apreciar que pese a que el etanol se agota del medio alrededor de las 94.5 horas, la producción de xilitol continúa hasta el final de la fermentación. El tiempo de 70 horas representa, por su parte, un punto intermedio entre las 50 y 94 horas.

El análisis de varianza (ANDEVA) reveló que en los tiempos de fermentación evaluados uno o ambos factores, y/o la interacción entre ellos, presentaron efecto

significativo ($p < 0.05$) sobre las variables respuesta analizadas. Las únicas variables respuesta para las cuales no se hallaron diferencias significativas fueron la concentración de glucosa, dado que ya para las 50 horas se había agotado del medio de fermentación; y la concentración de glicerol en el tiempo de 94 horas. Los resultados obtenidos en el ANDEVA se resumen en el cuadro 4.

La ausencia de glucosa en el medio para las 50 horas de fermentación, sugiere que ésta fue usada como la principal fuente de carbono para generar la energía para la duplicación y mantenimiento celular y para la generación de etanol; así a partir de este último se genera el NAD(P)H, cofactor esencial para la bioconversión de xilosa a xilitol (Hallborn *et al.*, 1994; Meinander *et al.*, 1994; Martínez *et al.*, 2003).

A continuación se analiza cada una de las variables respuesta estudiadas en cada uno de los diferentes tiempos de fermentación para los cuatro tratamientos.

Cuadro 4. Valores de F y Cuadrado Medio del Error (CME) para el efecto de cada uno de los factores estudiados y su interacción sobre el rendimiento de xilitol, la productividad de xilitol, la concentración de xilitol producido, la concentración de xilosa residual, la concentración de etanol residual, la concentración de glicerol producido y la concentración celular de la levadura X.

Factores e Interacción	Tiempo (horas)	gl	Rendimiento de xilitol		Productividad de xilitol		Cn. Xilitol producido		Cn. Xilosa residual		Cn. Etanol residual		Cn. Glicerol producido		Cn. Celular	
			Valor de F	CME	Valor de F	CME	Valor de F	CME	Valor de F	CME	Valor de F	CME	Valor de F	CME	Valor de F	CME
Agitación (A)	50	1	0.16	0.0018	0.00	0.00	0.01	0.0049	14.29*	7.79	2.22	1.65	0.25	0.0071	5.50*	0.0084
Adición de Etanol (E)		1	30.75*	0.34	31.81*	0.011	31.90*	27.26	10.42*	5.68	83.21*	62.13	12.34*	0.35	0.29	0.0004
A*E		1	1.47	0.016	0.53	0.0002	0.54	0.47	38.66*	21.09	21.78*	16.27	40.83*	1.16	0.29	0.0004
Agitación (A)	70	1	0.04	0.0006	0.19	0.00	0.19	0.25	28.05*	26.07	1.56	0.78	21.48*	0.76	11.67*	0.011
Adición de Etanol (E)		1	31.39*	0.53	34.44*	0.009	33.52*	43.04	12.44*	11.57	144.65*	72.31	0.00	0.0001	1.30	0.0012
A*E		1	4.19	0.071	2.49	0.0006	2.32	2.98	54.71*	50.86	9.50*	4.75	1.32	0.047	0.47	0.0004
Agitación (A)	94	1	0.05	0.0009	0.39	0.00	0.43	0.58	0.24	0.21	8.33*	3.71	0.80	0.087	12.47*	0.0098
Adición de Etanol (E)		1	47.14*	0.82	49.19*	0.0076	49.09*	67.09	57.17*	51.08	101.48*	45.18	0.01	0.0007	2.29	0.0018
A*E		1	9.31*	0.16	4.95*	0.0008	5.22*	7.13	18.27*	16.33	1.90	0.85	1.85	0.20	9.16*	0.0072

Valores en negrita con *: significancia a $p < 0.05$

5.3.1 Rendimiento de la producción de xilitol

El rendimiento en la producción de xilitol (g de xilitol/ g de xilosa inicial) es una de las variables respuesta más importantes ya que da una idea muy clara de la eficacia en la conversión de xilosa en xilitol.

A las 50 horas de fermentación el rendimiento en la producción de xilitol se vio afectado negativamente por la adición de etanol ($p < 0.05$) (cuadro 4). En la figura 11 se puede apreciar que cuando se adicionó etanol al medio se presentó una disminución del 46.0% en el rendimiento, en comparación a cuando no se añadió etanol.

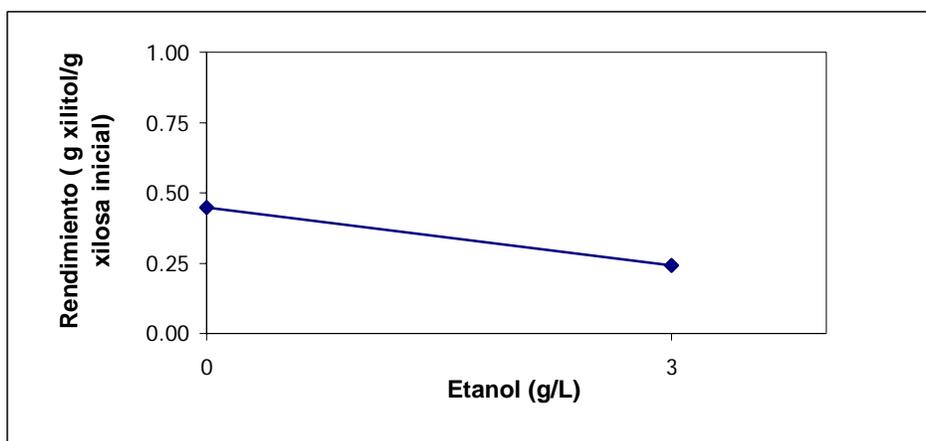


Figura 11. Variación en el rendimiento de la producción de xilitol en función de la concentración de etanol añadida, a las 50 horas de fermentación.

Este comportamiento fue contrario a lo que se esperaba, pues Arce (2004) sugiere adicionar etanol para impedir que se detenga la producción de xilitol. Además, tanto Hallborn *et al.* (1994) como Meinander *et al.* (1994), sugieren adicionar etanol como cosustrato para lograr la conversión de grandes cantidades de xilosa a xilitol. Dado que el NAD(P)H que se utiliza para la producción de xilitol proviene de la oxidación del etanol, ya que la producción de xilitol está relacionada estequiométricamente con el consumo del etanol (Hallborn *et al.*, 1994), con la adición de etanol se pretendía favorecer dicha producción; pues en el momento que se agota el etanol del medio se interrumpe la producción de xilitol (Meinander *et al.*, 1994).

Según Meinander *et al.* (1994), bajo condiciones limitadas de oxígeno el ácido acético se acumula en el medio, por la oxidación del etanol llevada a cabo por la levadura X, y esto podría causar envenenamiento de las células a un pH por debajo de 4.5; con la simultánea suspensión de la producción de xilitol. Sin embargo, observando el pH medido en cada toma de muestra (cuadro 7 del Anexo), pareciera que no fuera el caso; aunque no se puede descartar la posibilidad de una disminución en el pH en los momentos en que éste no se monitoreó.

A las 70 horas de fermentación el rendimiento en la producción de xilitol se vio afectado de igual manera que a las 50 horas por la adición de etanol ($p < 0.05$) (cuadro 4). En la figura 12 se puede apreciar que cuando se adicionó etanol al medio se presentó una disminución del 39.7% en el rendimiento, en comparación a cuando no se añadió etanol.

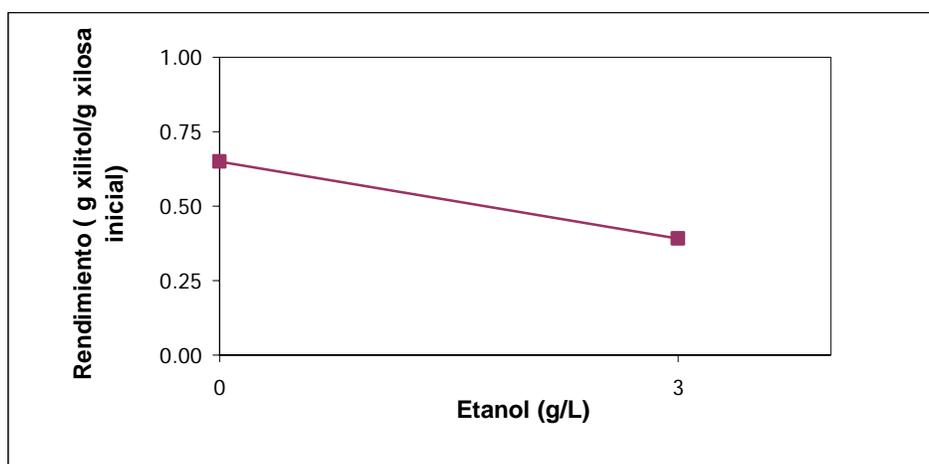


Figura 12. Variación en el rendimiento de la producción de xilitol en función de la concentración de etanol añadida, a las 70 horas de fermentación.

A las 94 horas de fermentación el rendimiento en la producción de xilitol se vio afectado por la interacción entre la concentración de etanol añadida y el nivel de aireación (velocidad de agitación) ($p < 0.05$) (cuadro 4).

En la figura 13 se puede apreciar que cuando la agitación fue de 200 rpm y se añadió etanol (3 g/L), el rendimiento de la producción de xilitol disminuyó un 22.8%; mientras que con 250 rpm disminuyó un 49.5%. Sin adición de etanol al medio, el aumento en el nivel de aireación (velocidad de agitación) de 200 a 250 rpm causó un

aumento del 16.3% en el rendimiento de la producción de xilitol; mientras que con adición de etanol al medio, el aumento en el nivel de aireación (velocidad de agitación) de 200 a 250 rpm causó una disminución del 21.8%. El mayor rendimiento se alcanzó cuando no se adicionó etanol al medio de fermentación y al emplear el nivel alto de aireación (velocidad de agitación), siendo igual a 0.93 g de xilitol/ g de xilosa inicial.

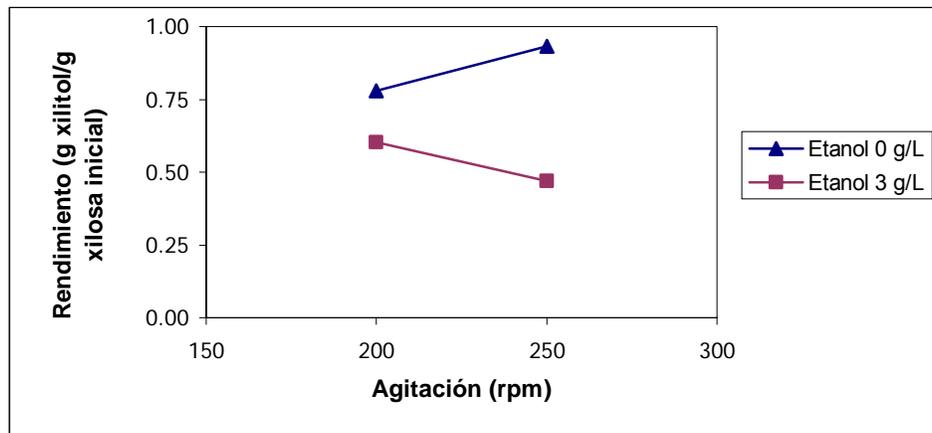


Figura 13. Variación en el rendimiento de la producción de xilitol en función de la concentración de etanol añadida y el nivel de aireación (agitación), a las 94 horas de fermentación.

Varios investigadores como Meinander *et al.* (1994), Parajó *et al.* (1997), Domínguez (1998), Mussatto y Roberto (2003) han relacionado distintas velocidades de agitación con el nivel de oxígeno disuelto en el medio; obteniendo mayores rendimientos en la producción de xilitol cuando se generan condiciones limitadas de oxígeno. Esto porque hay una menor utilización del NAD(P)H para la biosíntesis respiratoria del ATP y por lo tanto está más disponible para la generación de xilitol (Hallborn *et al.*, 1994); mientras que bajo condiciones aerobias el NAD(P)H se utiliza principalmente en dicha biosíntesis. Cuando la fermentación se da bajo condiciones anaerobias, el metabolismo del cosustrato es muy lento y por lo tanto la limitante en la producción de xilitol es la disponibilidad del NAD(P)H formado a partir del mismo (Hallborn *et al.*, 1994). Tanto Meinander *et al.* (1994) como Thestrup y Hahn-Hägerdal (1995), aseguran que bajo condiciones anaerobias el etanol no puede ser usado como cosustrato porque las células no producirían ATP, el cual es necesario para el mantenimiento de las células; interrumpiendo así la producción de xilitol.

En la figura 13 se puede ver que cuando la fermentación se llevó a cabo sin adición de etanol y con la agitación de 200 rpm se presentó un menor rendimiento de la producción de xilitol (0.78 g de xilitol/ g de xilosa inicial) comparado al obtenido cuando se trabajó con la agitación de 250 rpm (0.93 g de xilitol/ g de xilosa inicial). Se cree que la agitación de 200 rpm provocó una disminución en el consumo del cosustrato y, dado que a partir del cosustrato se genera el NAD(P)H requerido para la transformación de xilosa a xilitol (Hallborn, 1991), su bajo metabolismo ocasionó un consumo de xilosa más lento y por lo tanto una menor producción de xilitol.

Por lo tanto, se puede decir que al emplear el nivel alto de aireación (velocidad de agitación) y sin adicionar etanol al medio se logró un metabolismo más rápido del cosustrato (glucosa); lo cual ocasionó que se consumiera más xilosa y etanol, se generara más xilitol y por ende se alcanzara un mayor rendimiento en la producción de xilitol. Esto se cumplió para los tres tiempos de fermentación evaluados (cuadro 7 del Anexo).

Según Hallborn *et al.* (1994), una relación volumen de cultivo/volumen del recipiente de fermentación igual a 0.2 corresponde a condiciones aerobias, una relación de 0.6 corresponde a condiciones limitadas de oxígeno, y una de 0.8 corresponde a condiciones anaerobias. Bajo las condiciones experimentales empleadas en la presente investigación, la combinación entre el nivel alto de aireación (velocidad de agitación), el flujo de aire de 0.6 L/min y el volumen de trabajo de 1.5 L en el bioreactor (relación volumen de cultivo/volumen del recipiente de fermentación igual a 0.68) generaron porcentajes de oxígeno disuelto en el medio que oscilan entre 0.3-0.5% (promedio igual a 0.4%) en los tiempos de fermentación evaluados (cuadro 7 del Anexo); mientras que con el nivel bajo de aireación (velocidad de agitación) se generaron porcentajes de oxígeno disuelto en el medio que oscilan entre 0.2-0.3% (promedio igual a 0.2%).

Pese a que no hay grandes diferencias entre estos rangos de valores y que de acuerdo a Meinander *et al.* (1994), un porcentaje de oxígeno disuelto (% dO₂) igual a 30% corresponde a condiciones aerobias, mientras que un 0% corresponde a condiciones limitadas de oxígeno (utilizando un bioreactor con un volumen de trabajo de 1.5 L, una aireación de 0.75 L/min y una agitación de 400 rpm que se hace variar para controlar el oxígeno disuelto en el medio); el promedio del primero (0.4%) difiere del segundo (0.2%)

en un 50%, y esto podría explicar las desigualdades en el rendimiento de la producción de xilitol, que se observan en la figura 13, al emplear uno y otro nivel de aireación (velocidad de agitación).

La figura 14 permite visualizar la variación en el rendimiento de la producción de xilitol en función de la concentración de etanol añadida, en los tres tiempos de fermentación evaluados. Se observa como aumenta el rendimiento en la producción de xilitol a través del tiempo, independientemente de la concentración de etanol añadida; sin embargo, se alcanzaron mayores rendimientos cuando no se adicionó etanol al medio de fermentación.

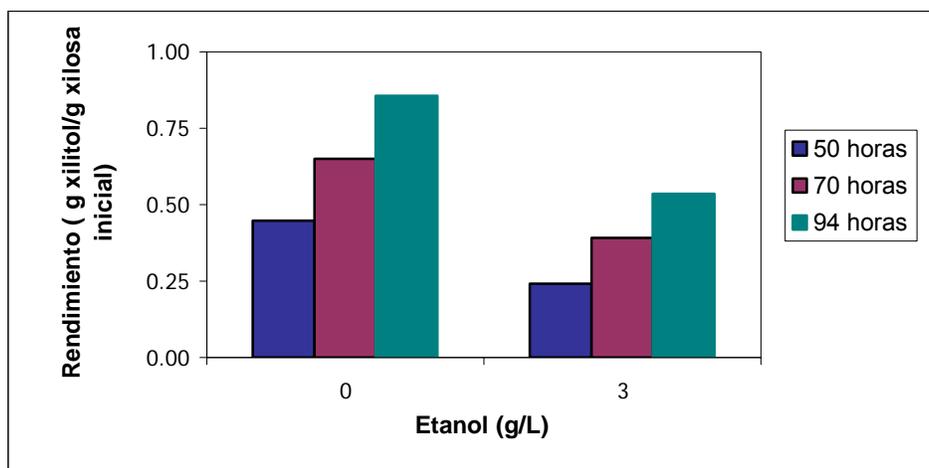


Figura 14. Variación en el rendimiento de la producción de xilitol en función de la concentración de etanol añadida, en los tiempos de fermentación evaluados.

En forma general, se obtiene que de las 50 a las 94 horas sin adición de etanol al medio, se consumió el 60.2% del etanol producido durante la fermentación, la xilosa residual disminuyó un 58.4%, se produjo un 47.9% de xilitol, y el rendimiento aumentó un 47.7%. Mientras que de las 70 a las 94 horas sin adición de etanol al medio, se consumió el 56.8% del etanol existente a las 70 horas, la xilosa residual disminuyó un 54.0%, se produjo un 24.2% de xilitol con respecto al obtenido a las 70 horas, y el rendimiento aumentó un 24.1% con respecto al alcanzado a las 70 horas. De esto se puede afirmar que el etanol y la xilosa se siguen consumiendo a través del tiempo y el xilitol continúa produciéndose, por lo que el rendimiento es cada vez mayor.

Por otra parte, de las 50 a las 94 horas adicionando etanol al medio de fermentación, sólo se consumió el 41.4% del etanol presente (residual y adicionado), y la xilosa residual disminuyó un 46.5%. Es decir, de las 50 a las 94 horas se consume un 18.8% menos de etanol y un 11.9% menos de xilosa cuando hay adición de etanol con respecto a cuando no se adiciona; de ahí que el mayor rendimiento se haya alcanzado sin adición de etanol al medio de fermentación.

Al analizar los rendimientos obtenidos en la producción de xilitol para cada uno de los tratamientos realizados se pudo estimar que el empleo del mayor nivel de aireación generó mejores condiciones para esta producción. Además, bajo estas condiciones y sin adición de etanol al medio se alcanzó el mayor rendimiento (figura 13); por lo tanto, la mejor combinación de los niveles de los factores estudiados para lograr mayores rendimientos en la producción de xilitol fue el empleo de una agitación de 250 rpm sin adición de etanol, en el tiempo de fermentación de 94 horas.

Esta combinación de factores produjo un rendimiento promedio de 0.93 g xilitol / g xilosa inicial; valor que coincide con el obtenido por Meinander *et al.* (1994) quienes obtuvieron un rendimiento de 0.93 g xilitol / g xilosa inicial a las 95 horas de fermentación, a nivel piloto (bioreactor con volumen de trabajo de 1.5 L). Otros investigadores como Hallborn *et al.* (1994) y Arce (2004), han obtenido rendimientos de 1.0 g xilitol / g xilosa inicial empleando cepas modificadas genéticamente a nivel de laboratorio. En la presente investigación se pudo corroborar lo eficaz que resulta la levadura X en la transformación de la xilosa a xilitol, ya que alcanza rendimientos superiores al obtenido con las levaduras que fermentan el xilitol de forma natural, el cual es cercano al 75% (Hallborn *et al.*, 1991).

5.3.2 Concentración de xilosa residual

A las 50 horas de fermentación la concentración de xilosa residual se vio afectada por la interacción entre la concentración de etanol añadida y el nivel de aireación (velocidad de agitación) ($p < 0.05$) (cuadro 4).

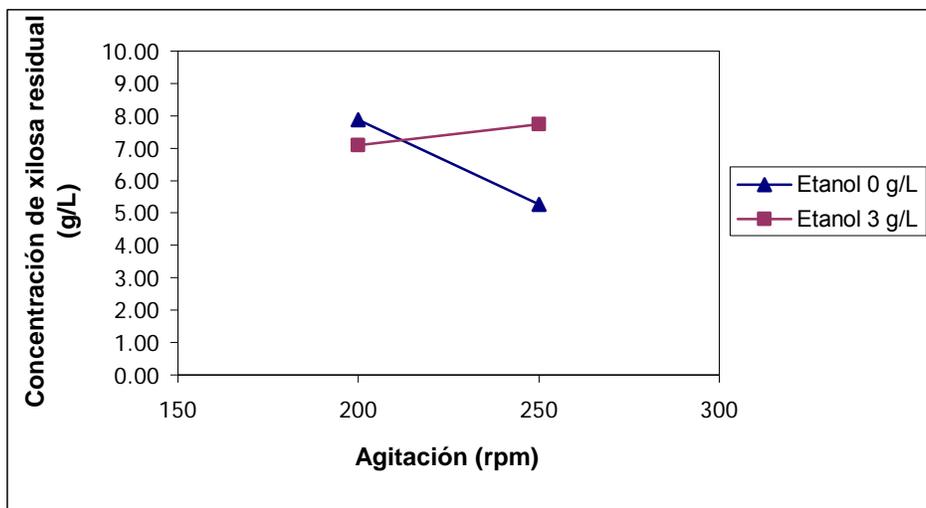


Figura 15. Variación en la concentración de xilosa residual en función de la concentración de etanol añadida y el nivel de aireación (agitación), a las 50 horas de fermentación.

En la figura 15 se puede apreciar que cuando la agitación fue de 200 rpm y se agregó etanol (3 g/L), el consumo de xilosa fue un 9.9% mayor con respecto a la fermentación en la que no se adicionó etanol; mientras que con 250 rpm se consumió un 31.9% menos de xilosa. Sin adición de etanol al medio, el aumento en el nivel de aireación (velocidad de agitación) de 200 a 250 rpm ocasionó un mayor consumo de xilosa (33.1%); mientras que con adición de etanol al medio, el aumento en el nivel de aireación (velocidad de agitación) de 200 a 250 rpm causó un menor consumo de xilosa (8.3%).

Es decir, la concentración de xilosa residual fue menor, o lo que es lo mismo, se consumió más xilosa; al emplear el nivel alto de aireación (velocidad de agitación) y cuando no se adicionó etanol al medio, siendo igual a 5.27 g/L (cuadro 7 del Anexo); debido a que como se mencionó en la sección anterior (5.3.1), estas condiciones estimulan un metabolismo más rápido de la glucosa; y dado que a partir del cosustrato se genera el NAD(P)H requerido para la transformación de xilosa a xilitol (Hallborn, 1991), se generó la cantidad suficiente de los equivalentes de reducción con lo que más xilosa pudo ser convertida en xilitol; lográndose a su vez un mayor rendimiento en la producción de xilitol bajo estas condiciones (sección 5.3.1).

A las 70 horas de fermentación la concentración de xilosa residual se vio afectada de igual manera que a las 50 horas por la interacción entre la concentración de etanol añadida y el nivel de aireación (velocidad de agitación) ($p < 0.05$) (cuadro 4).

En la figura 16 se puede apreciar que cuando la agitación fue de 200 rpm y se agregó etanol (3 g/L), el consumo de xilosa fue un 18.2% mayor con respecto a la fermentación en la que no se adicionó etanol; mientras que con 250 rpm se consumió un 56.1% menos de xilosa. Sin adición de etanol al medio, el aumento en el nivel de aireación (velocidad de agitación) de 200 a 250 rpm ocasionó un mayor consumo de xilosa (59.8%); mientras que con adición de etanol al medio, el aumento en el nivel de aireación (velocidad de agitación) de 200 a 250 rpm causó un menor consumo de xilosa (10.9%).

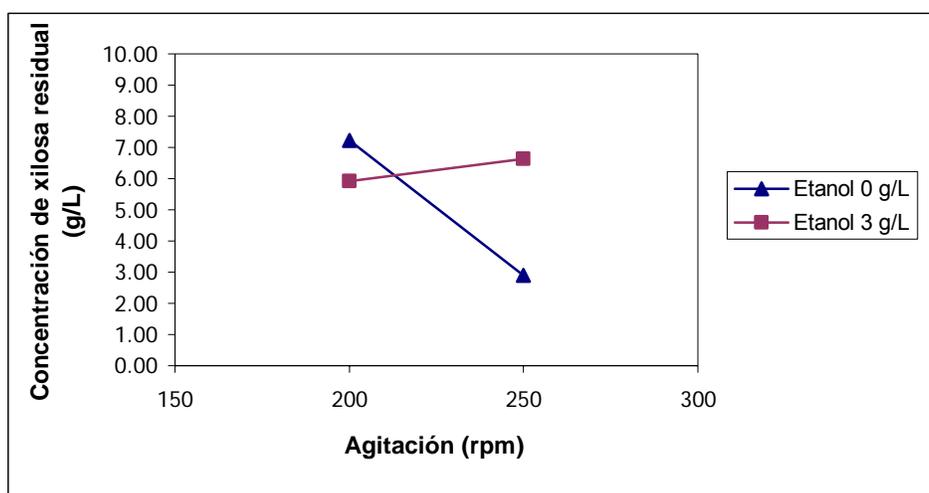


Figura 16. Variación en la concentración de xilosa residual en función de la concentración de etanol añadida y el nivel de aireación (agitación), a las 70 horas de fermentación.

Es decir, la concentración de xilosa residual fue menor al emplear el nivel alto de aireación (velocidad de agitación) y cuando no se adicionó etanol al medio, siendo igual a 2.91 g/L (cuadro 7 del Anexo); coincidiendo con las tendencias observadas en el tiempo de 50 horas, y representando un consumo de xilosa, entre las 50 y 70 horas, del 44.8%.

A las 94 horas de fermentación la concentración de xilosa residual se vio afectada de igual manera que a las 50 y 70 horas por la interacción entre la concentración de etanol añadida y el nivel de aireación (velocidad de agitación) ($p < 0.05$) (cuadro 4).

En la figura 17 se puede apreciar que cuando la agitación fue de 200 rpm y se adicionó etanol (3 g/L), el consumo de xilosa fue un 23.8% menor con respecto a la fermentación en la que no se adicionó etanol; mientras que con 250 rpm se consumió un 67.1% menos de xilosa. Sin adición de etanol al medio, el aumento en el nivel de aireación (velocidad de agitación) de 200 a 250 rpm ocasionó un mayor consumo de xilosa (45.0%); mientras que con adición de etanol al medio, el aumento en el nivel de aireación (velocidad de agitación) de 200 a 250 rpm causó un menor consumo de xilosa (21.4%).

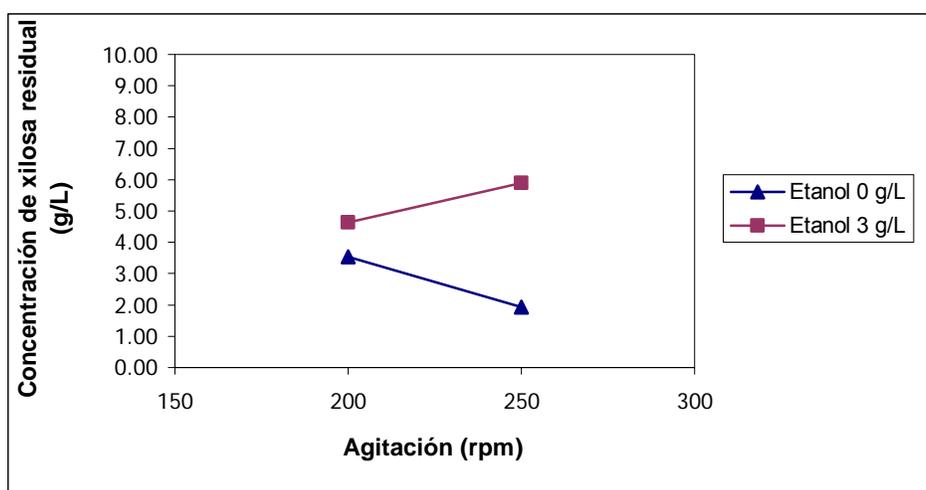


Figura 17. Variación en la concentración de xilosa residual en función de la concentración de etanol añadida y el nivel de aireación (agitación), a las 94 horas de fermentación.

Es decir, la concentración de xilosa residual fue menor al emplear el nivel alto de aireación (velocidad de agitación) y cuando no se adicionó etanol al medio, siendo igual a 1.94 g/L (cuadro 7 del Anexo); coincidiendo con las tendencias observadas a las 50 y 70 horas bajo las mismas condiciones; representando un consumo de xilosa del 63.2% entre las 50 y 94 horas, y del 66.7% entre las 70 y 94 horas para la xilosa existente a las 70 horas. Esta menor concentración de xilosa residual para las 94 horas de fermentación coincide con el máximo rendimiento obtenido en la producción de xilitol (sección 5.3.1).

En las figuras 18 y 19 se puede apreciar la variación en la concentración de xilosa residual en los tres tiempos de fermentación evaluados. De ambas figuras se observa claramente que la xilosa se consume a través del tiempo. En la figura 18 se aprecia una

gran diferencia en el consumo de xilosa en función de la concentración de etanol añadida, lográndose un mayor consumo de xilosa cuando no se adicionó etanol al medio de fermentación. De la figura 19 se puede ver que con la mayor velocidad de agitación se favorece el consumo de xilosa a las 50 y 70 horas, pero pareciera que a las 94 horas se obtienen concentraciones de xilosa residual similares con una u otra agitación.

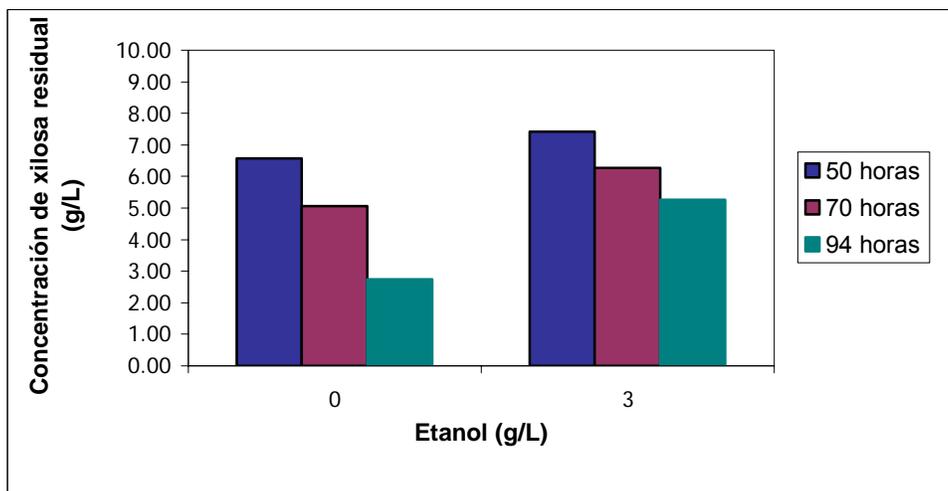


Figura 18. Variación en la concentración de xilosa residual en función de la concentración de etanol añadida, en los tiempos de fermentación evaluados.

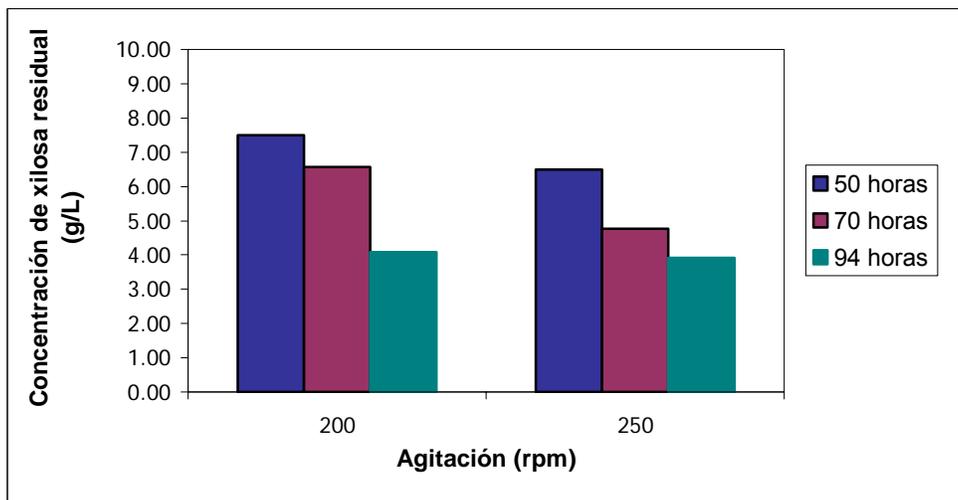


Figura 19. Variación en la concentración de xilosa residual en función del nivel de aireación (agitación), en los tiempos de fermentación evaluados.

5.3.3 Concentración de xilitol producido

A las 50 horas de fermentación la producción de xilitol se vio afectada negativamente por la adición de etanol ($p < 0.05$) (cuadro 4). En la figura 20 se puede apreciar que cuando se adicionó etanol al medio se presentó una disminución del 45.2% en la concentración de xilitol producido, en comparación a cuando no se añadió etanol.

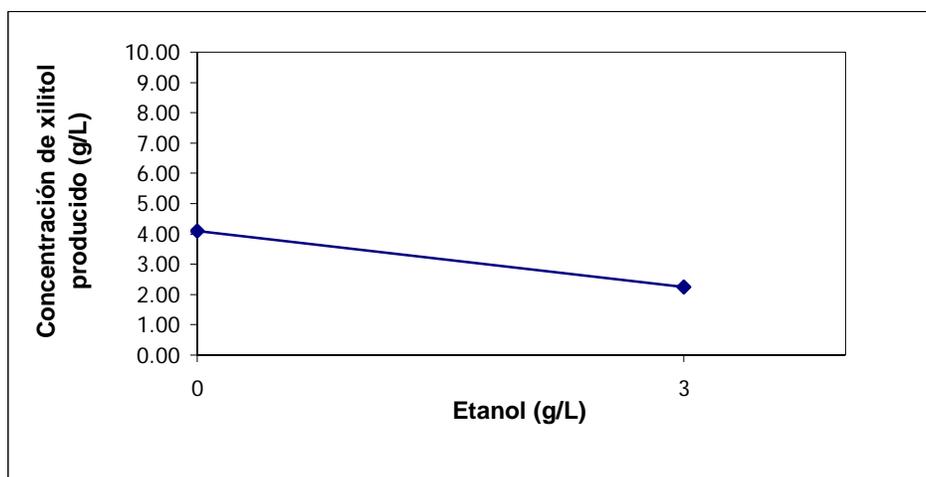


Figura 20. Variación en la producción de xilitol en función de la concentración de etanol añadida, a las 50 horas de fermentación.

Esto fue contrario a lo que se esperaba, pues tanto Hallborn *et al.* (1994) como Meinander *et al.* (1994), sugieren adicionar etanol como cosustrato para lograr la conversión de grandes cantidades de xilosa a xilitol. Con la adición de etanol se pretendía favorecer dicha conversión dado que el NAD(P)H que se utiliza para la producción de xilitol proviene de la oxidación del etanol, ya que la producción de xilitol está relacionada estequiométricamente con el consumo del etanol (Hallborn *et al.*, 1994); pues en el momento que se agota el etanol del medio se interrumpe la producción de xilitol (Meinander *et al.*, 1994).

A las 70 horas de fermentación la producción de xilitol se vio afectada de igual manera que a las 50 horas por la adición de etanol ($p < 0.05$) (cuadro 4). En la figura 21 se puede apreciar que cuando se adicionó etanol al medio se presentó una disminución del 38.9% en la concentración de xilitol producido, en comparación a cuando no se añadió etanol.

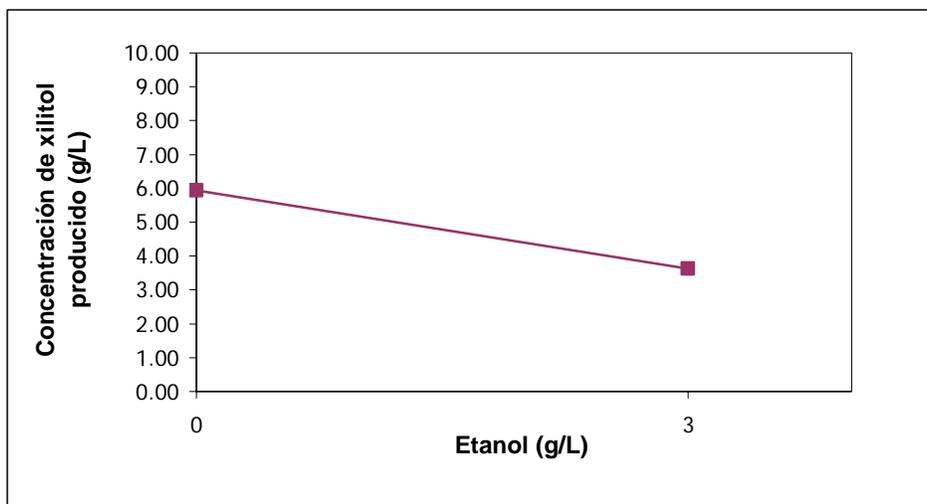


Figura 21. Variación en la producción de xilitol en función de la concentración de etanol añadida, a las 70 horas de fermentación.

A las 94 horas de fermentación la producción de xilitol se vio afectada por la interacción entre la concentración de etanol añadida y el nivel de aireación (velocidad de agitación) ($p < 0.05$) (cuadro 4).

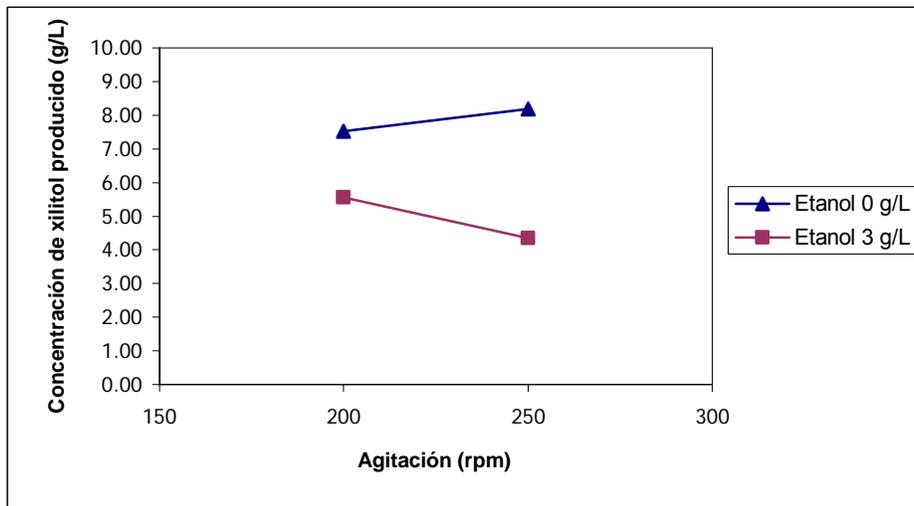


Figura 22. Variación en la producción de xilitol en función de la concentración de etanol añadida y el nivel de aireación (agitación), a las 94 horas de fermentación.

En la figura 22 se puede apreciar que con una agitación de 200 rpm la adición de etanol (3 g/L) causó una disminución del 26.1% en la producción de xilitol; mientras que con 250 rpm ocasionó una disminución del 46.9%. Sin adición de etanol al medio, el

aumento en el nivel de aireación (velocidad de agitación) de 200 a 250 rpm causó un aumento del 8.2% en la producción de xilitol; mientras que con adición de etanol al medio, el aumento en el nivel de aireación (velocidad de agitación) de 200 a 250 rpm causó una disminución del 21.8%. La mayor producción de xilitol se alcanzó cuando no se adicionó etanol al medio de fermentación y al emplear el nivel alto de aireación (velocidad de agitación), siendo igual a 8.19 g/L.

En la figura 23 se puede observar la variación en la producción de xilitol en función de la concentración de etanol añadida, en los tres tiempos de fermentación evaluados. Se observa como aumenta la producción de xilitol a través del tiempo, independientemente de la concentración de etanol añadida; sin embargo, se alcanzaron mayores concentraciones de xilitol cuando no se adicionó etanol al medio de fermentación.

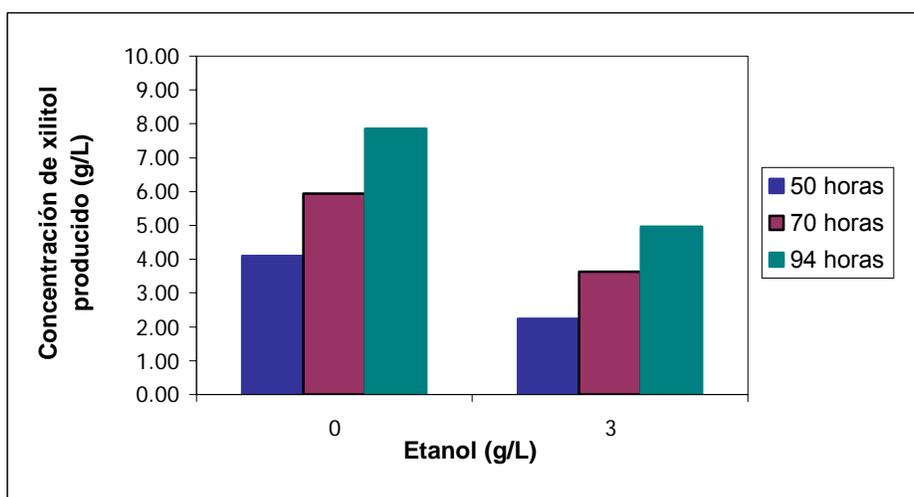


Figura 23. Variación en la producción de xilitol en función de la concentración de etanol añadida, en los tiempos de fermentación evaluados.

En forma general, se obtiene que de las 50 a las 94 horas sin adición de etanol al medio, se produjo un 47.9% de xilitol, y el rendimiento aumentó un 47.7%. Mientras que de las 70 a las 94 horas sin adición de etanol al medio, se produjo un 24.2% de xilitol con respecto al obtenido a las 70 horas, y el rendimiento aumentó un 24.1% con respecto al alcanzado a las 70 horas.

5.3.4 Concentración de etanol residual

A las 50 horas de fermentación, la concentración de etanol residual se vio afectada por la interacción entre la concentración de etanol añadida y el nivel de aireación (velocidad de agitación) ($p < 0.05$) (cuadro 4).

En la figura 24 se puede apreciar que con una agitación de 200 rpm la adición de etanol (3 g/L) causó un aumento del 23.3% en la concentración de etanol residual; mientras que con 250 rpm se presentó un incremento del 54.5%. Sin adición de etanol al medio, el aumento en el nivel de aireación (velocidad de agitación) de 200 a 250 rpm ocasionó una disminución del 21.6% en la concentración de etanol residual; mientras que con adición de etanol al medio, el aumento en el nivel de aireación (velocidad de agitación) de 200 a 250 rpm causó un aumento del 24.4%.

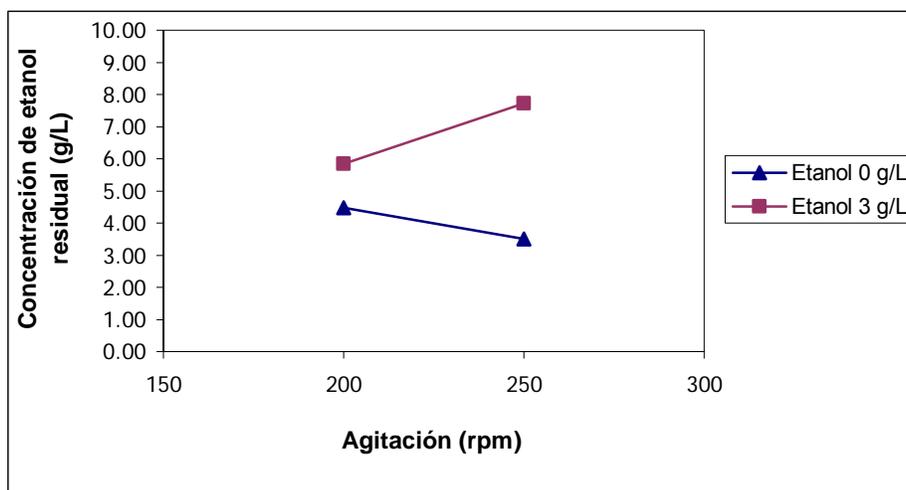


Figura 24. Variación en la concentración de etanol residual en función de la concentración de etanol añadida y el nivel de aireación (agitación), a las 50 horas de fermentación.

La menor concentración de etanol residual se alcanzó cuando no se adicionó etanol al medio de fermentación y al emplear el nivel alto de aireación (velocidad de agitación), siendo igual a 3.51 g/L; ya que, como se ha mencionado anteriormente, bajo estas condiciones se logró un metabolismo más rápido del cosustrato (glucosa); lo cual ocasionó que se consumiera más xilosa y etanol, se generara más xilitol y por ende se alcanzara un mayor rendimiento en la producción de xilitol.

A las 70 horas de fermentación la concentración de etanol residual se vio afectada de igual manera que a las 50 horas por la interacción entre la concentración de etanol añadida y el nivel de aireación (velocidad de agitación) ($p < 0.05$) (cuadro 4).

En la figura 25 se puede apreciar que con una agitación de 200 rpm la adición de etanol (3 g/L) causó un aumento del 42.4% en la concentración de etanol residual; mientras que con 250 rpm se presentó un incremento del 59.5%. Sin adición de etanol al medio, el aumento en el nivel de aireación (velocidad de agitación) de 200 a 250 rpm ocasionó una disminución del 15.2% en la concentración de etanol residual; mientras que con adición de etanol al medio, el aumento en el nivel de aireación (velocidad de agitación) de 200 a 250 rpm causó un aumento del 17.0%.

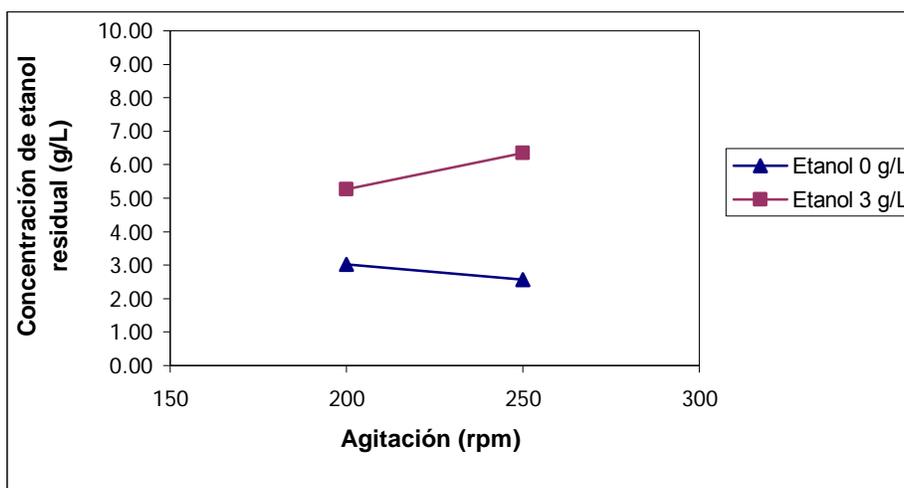


Figura 25. Variación en la concentración de etanol residual en función de la concentración de etanol añadida y el nivel de aireación (agitación), a las 70 horas de fermentación.

Es decir, la concentración de etanol residual fue menor al emplear el nivel alto de aireación (velocidad de agitación) y cuando no se adicionó etanol al medio, siendo igual a 2.57 g/L (cuadro 7 del Anexo); coincidiendo con las tendencias observadas en el tiempo de 50 horas, y representando un consumo de etanol, entre las 50 y 70 horas, del 26.8%.

A las 94 horas de fermentación la concentración de etanol residual se vio afectada por el efecto del nivel de aireación (velocidad de agitación) ($p < 0.05$) (cuadro 4). En la figura 26 se puede apreciar que la concentración de etanol residual fue menor cuando la velocidad de agitación era de 200 rpm, representando una disminución del 21.8% en la

concentración de etanol residual, con respecto a la velocidad de agitación de 250 rpm. Esto fue contrario a lo que se esperaba pues el nivel bajo de agitación (nivel de aireación) se presume favorece la acumulación de etanol en el medio, debido a que menores niveles de aireación propician la producción de etanol (Crueger & Crueger, 1993) y evitan su oxidación (Meinander *et al.*, 1994); debido a que el menor nivel de oxígeno estimula el metabolismo anaerobio del piruvato y por lo tanto la producción de etanol mediante el proceso de fermentación (Russel, 2003).

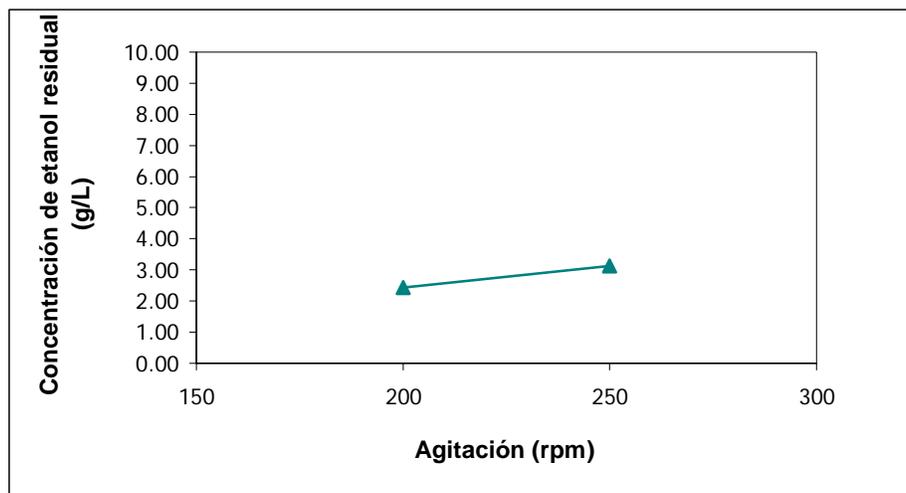


Figura 26. Variación en la concentración de etanol residual en función del nivel de aireación (agitación), a las 94 horas de fermentación.

Sin embargo, a las 94 horas de fermentación, la concentración de etanol residual no sólo se vio afectada por el efecto del nivel de aireación (velocidad de agitación), sino también por la adición de etanol ($p < 0.05$) (cuadro 4). En la figura 27 se puede apreciar que cuando se adicionó etanol al medio se presentó un aumento del 59.9% en la concentración de etanol residual, en comparación a cuando no se añadió etanol.

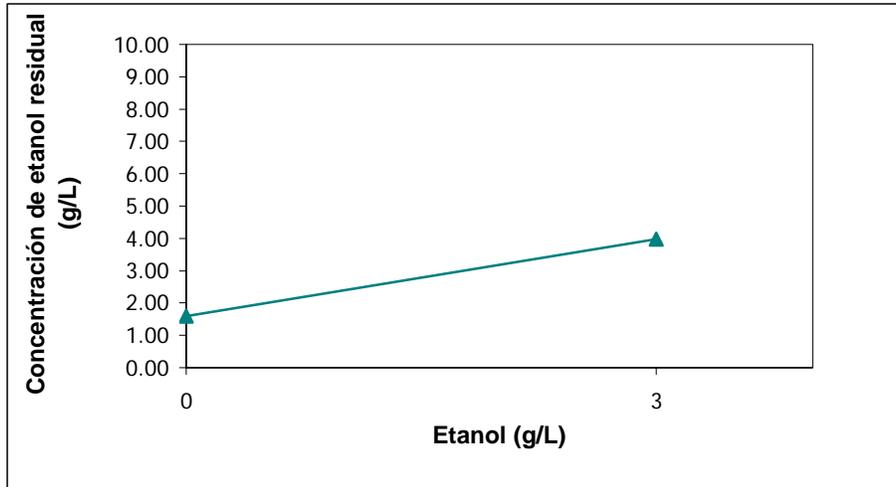


Figura 27. Variación en la concentración de etanol residual en función de la concentración de etanol añadida, a las 94 horas de fermentación.

La adición de etanol aumentó la cantidad de etanol en el medio de fermentación (etanol residual y añadido). A partir de los resultados del cuadro 7 del Anexo se obtuvo que para las 50, 70 y 94 horas de fermentación, sin adición de etanol al medio, la concentración de etanol residual correspondió a 3.99 g/L, 2.80 g/L y 1.59 g/L, respectivamente. Por otro lado, al adicionar este alcohol (3 g/L) la concentración de etanol residual correspondió a 6.78 g/L, 5.80 g/L y 3.97 g/L, respectivamente. Sin embargo, si a los datos con adición de etanol se les resta la concentración añadida se obtienen los siguientes valores: 3.78 g/L, 2.80 g/L y 0.97 g/L, respectivamente; y estas concentraciones son similares a las obtenidas cuando no se adicionó etanol al medio.

En la figura 28 se aprecia la variación en la concentración de etanol residual en función de la concentración de etanol añadida, en los tres tiempos de fermentación evaluados. Se observa como disminuyó la concentración de etanol residual a través del tiempo, independientemente de la concentración de etanol añadida; sin embargo, se alcanzaron menores concentraciones de etanol residual cuando no se adicionó etanol al medio de fermentación, como era de suponerse.

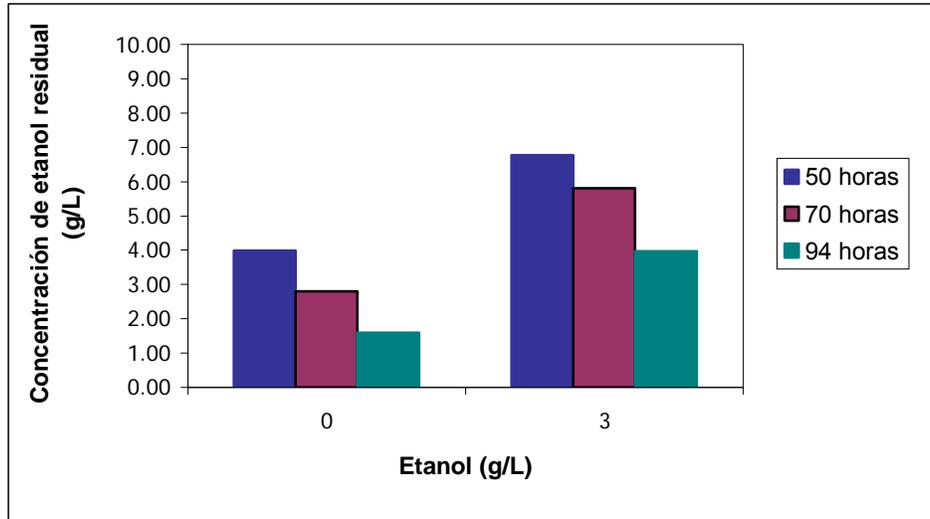


Figura 28. Variación en la concentración de etanol residual en función de la concentración de etanol añadida, en los tiempos de fermentación evaluados.

Según estos resultados pareciera que la adición de etanol al medio no era necesaria pues con la cantidad de glucosa agregada al inicio se produjo el suficiente etanol para mantener la producción de xilitol hasta el final de la fermentación, quedando incluso una cantidad de etanol residual, que pareciera no aportar mayor beneficio en dicha producción.

Por otro lado, en la figura 29 se aprecia la variación en la concentración de etanol residual en función del nivel de aireación (velocidad de agitación), en los tres tiempos de fermentación evaluados. Se observa como disminuyó la concentración de etanol residual a través del tiempo, independientemente del nivel de aireación (velocidad de agitación); sin embargo, con la menor velocidad de agitación se favorece el consumo de etanol a las 94 horas, pero pareciera que a las 50 y 70 horas se obtienen concentraciones de etanol residual similares con una u otra agitación.

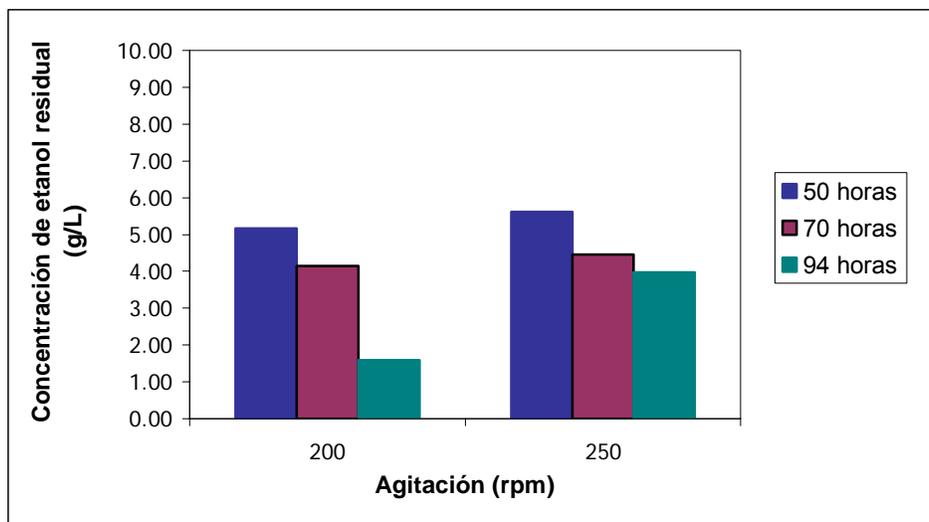


Figura 29. Variación en la concentración de etanol residual en función del nivel de aireación (agitación), en los tiempos de fermentación evaluados.

5.3.5 Concentración de glicerol producido

A las 50 horas de fermentación la concentración de glicerol producido se vio afectada por la interacción entre la concentración de etanol añadida y el nivel de aireación (velocidad de agitación) ($p < 0.05$) (cuadro 4).

En la figura 30 se puede apreciar que con una agitación de 200 rpm la adición de etanol (3 g/L) causó una disminución del 100% en la concentración de glicerol; mientras que con 250 rpm ocasionó un aumento del 47.9%. Sin adición de etanol al medio, el aumento en el nivel de aireación (velocidad de agitación) de 200 a 250 rpm causó una disminución del 59.7% en la concentración de glicerol; mientras que con adición de etanol al medio, el aumento en el nivel de aireación (velocidad de agitación) de 200 a 250 rpm causó un incremento del 100%. La mayor concentración de glicerol se alcanzó cuando no se adicionó etanol al medio de fermentación y al emplear el nivel bajo de aireación (velocidad de agitación), siendo igual a 0.62 g/L.

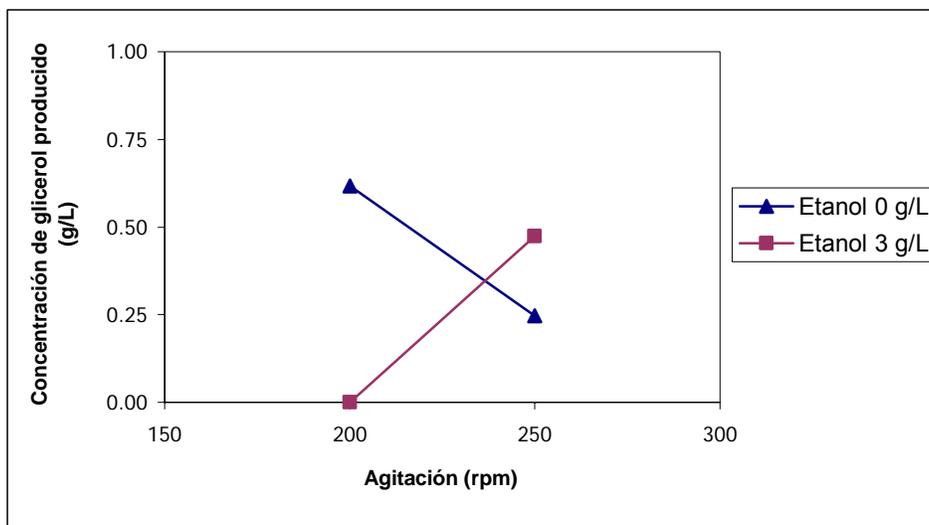


Figura 30. Variación en la producción de glicerol en función de la concentración de etanol añadida y el nivel de aireación (agitación), a las 50 horas de fermentación.

El glicerol generalmente es producido durante la fermentación para oxidar el exceso de NADH (Oura, 1977; Thestrup & Hahn-Hägerdal, 1995). Cuando la levadura está creciendo, la utilización del piruvato para la biosíntesis celular puede generar una acumulación del NADH, por lo que la cepa debe producir glicerol para regenerar el NAD^+ y mantener el balance redox de la célula (Russel, 2003). Cabe mencionar que con la levadura X, la regeneración del NAD^+ se lleva a cabo también con la transformación de la xilosa a xilitol.

Según Russel (2003), bajo condiciones aerobias el exceso de NADH generado por la utilización del piruvato es consumido en la cadena respiratoria llevada a cabo en la mitocondria, debido a esto, bajo condiciones anaerobias es cuando se observan las mayores producciones de glicerol. Esto se observa en la figura 30 cuando al disminuir el nivel de aireación (velocidad de agitación) se generó una mayor concentración de glicerol, sin adición de etanol. Meinander y Hahn-Hägerdal (1997), aseguran que la producción de glicerol por sí sola no da un panorama completo del metabolismo redox, debido a que se producen cofactores reducidos adicionales en la vía de la pentosa fosfato; y esto puede variar entre diferentes cosustratos.

A las 70 horas de fermentación la producción de glicerol se vio afectada por el efecto del nivel de aireación (velocidad de agitación) ($p < 0.05$) (cuadro 4). En la figura 31

se puede apreciar que la concentración de glicerol fue mayor cuando la velocidad de agitación era de 200 rpm, representando un aumento del 57.6% en la concentración de glicerol, con respecto a la velocidad de agitación de 250 rpm. Esto coincide con los resultados obtenidos a las 50 horas de fermentación donde al disminuir el nivel de aireación (velocidad de agitación) se generó una mayor concentración de glicerol.

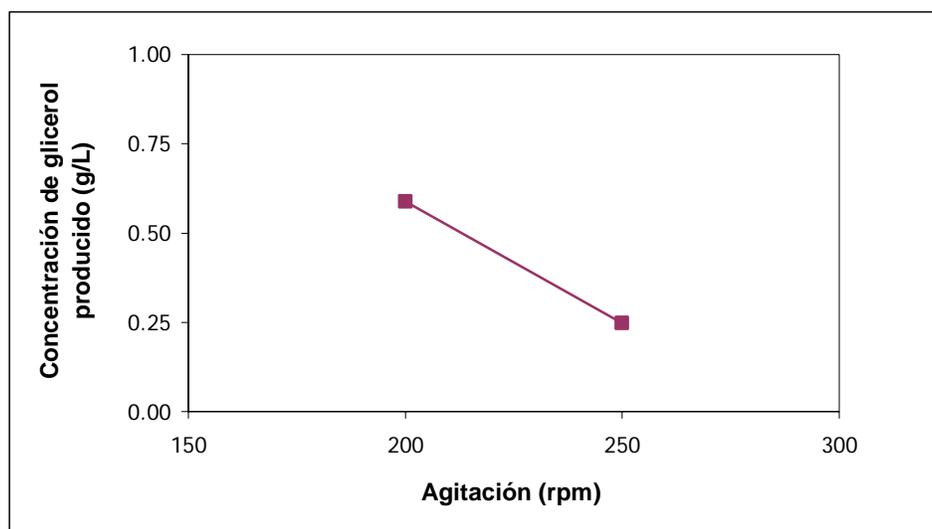


Figura 31. Variación en la producción de glicerol en función del nivel de aireación (agitación), a las 70 horas de fermentación.

A las 94 horas de fermentación la producción de glicerol no se vio afectada (cuadro 4) por ninguno de los efectos evaluados ni por la interacción entre ellos.

5.3.6 Concentración celular

A las 50 horas de fermentación la concentración celular se vio afectada por el efecto del nivel de aireación (velocidad de agitación) ($p < 0.05$) (cuadro 4). En la figura 32 se puede observar que la concentración celular fue mayor cuando la velocidad de agitación era de 250 rpm, representando un aumento del 0.5% en la concentración celular, con respecto a la velocidad de agitación de 200 rpm.

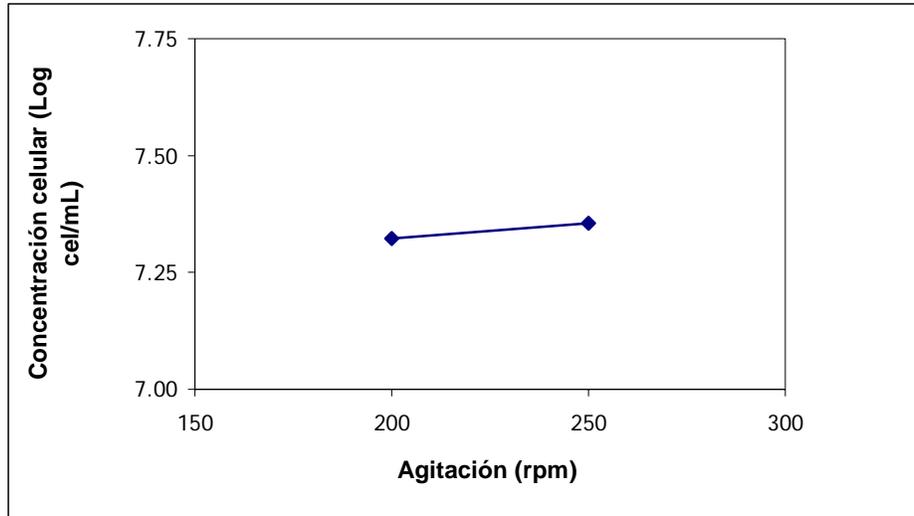


Figura 32. Variación en la concentración celular en función del nivel de aireación (agitación), a las 50 horas de fermentación.

Según Mathews *et al.* (2002), el metabolismo aerobio de la glucosa resulta ser más eficiente en cuanto a generación de energía para la biosíntesis celular. De ahí que al emplear el nivel alto de aireación se favoreció el crecimiento celular en mayor medida que bajo las condiciones de menor aireación. Por otro lado, Russel (2003), afirma que a concentraciones de oxígeno bajas y/o concentraciones de glucosa mayores al 10% (m/v) menos del 5% del azúcar es metabolizado para el crecimiento y la producción celular es aproximadamente el 10% de lo que es posible bajo condiciones aerobias. Bajo estas condiciones el etanol es producido. Se presume que las condiciones de trabajo no favorecieron el crecimiento celular de forma plena ya que se utilizaron concentraciones de glucosa igual al 20%, bajo condiciones limitadas de oxígeno (250 rpm y 200 rpm).

A las 70 horas de fermentación la concentración celular se vio afectada de igual manera que a las 50 horas por el efecto del nivel de aireación (velocidad de agitación) ($p < 0.05$) (cuadro 4). En la figura 33 se puede apreciar que la concentración celular fue mayor cuando la velocidad de agitación era de 250 rpm, representando un aumento del 0.5% en la concentración celular, con respecto a la velocidad de agitación de 200 rpm. Esto coincide con lo expuesto por Nigam y Singh (1995), quienes afirman que la acumulación de células microbianas en el medio se logra manteniendo un mayor nivel de oxígeno.

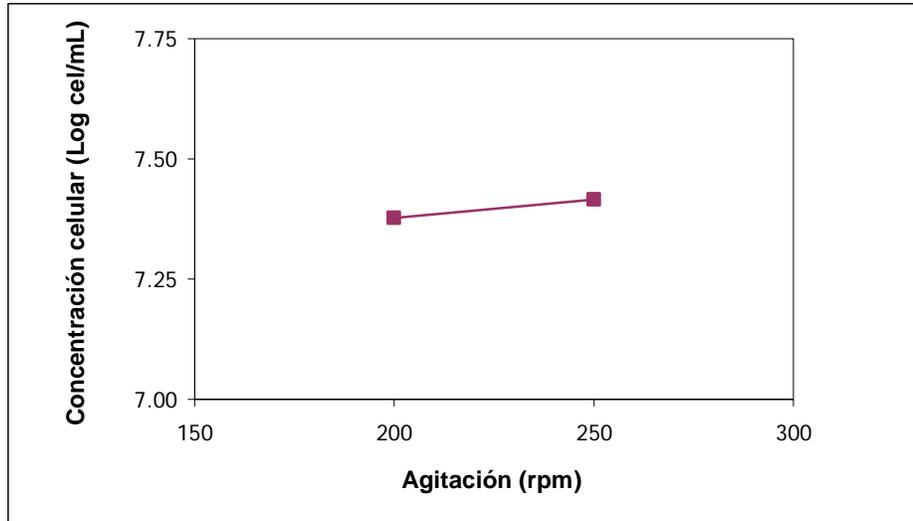


Figura 33. Variación en la concentración celular en función del nivel de aireación (agitación), a las 70 horas de fermentación.

A las 94 horas de fermentación la concentración celular se vio afectada por la interacción entre la concentración de etanol añadida y el nivel de aireación (velocidad de agitación) ($p < 0.05$) (cuadro 4).

En la figura 34 se puede apreciar que con una agitación de 200 rpm la adición de etanol (3 g/L) causó un aumento del 0.5% en la concentración celular; mientras que con 250 rpm ocasionó una disminución del 0.1%. Sin adición de etanol al medio, el aumento en el nivel de aireación (velocidad de agitación) de 200 a 250 rpm causó un aumento del 0.8% en la concentración de glicerol; mientras que con adición de etanol al medio, el aumento en el nivel de aireación (velocidad de agitación) de 200 a 250 rpm causó un incremento del 0.1%. La mayor concentración celular se alcanzó cuando no se adicionó etanol al medio de fermentación y al emplear el nivel alto de aireación (velocidad de agitación), siendo igual a $2.8 \cdot 10^7$ células/mL; coincidiendo con las condiciones para el máximo rendimiento obtenido en la producción de xilitol (sección 5.3.1).

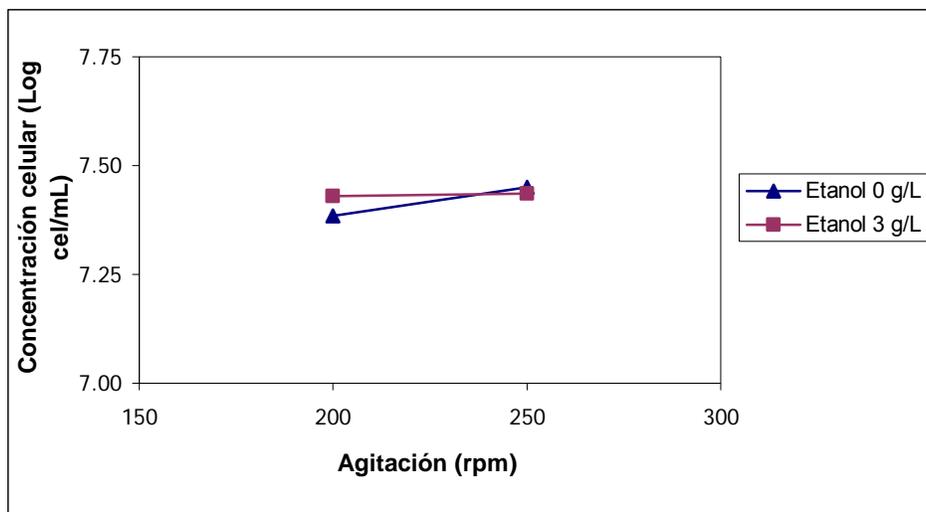


Figura 34. Variación en la concentración celular en función de la concentración de etanol añadida y el nivel de aireación (agitación), a las 94 horas de fermentación.

Del cuadro 8 se observa que, comparando ambos niveles de aireación (velocidad de agitación), a las 50 horas de fermentación, el aumento de $2.1 \cdot 10^7$ a $2.3 \cdot 10^7$ células/mL (8.7%) en la concentración celular se relacionó con un aumento de 0.34 a 0.36 g xilitol/ g xilosa inicial (5.6%) en el rendimiento de la producción de xilitol cuando la velocidad de agitación era de 250 rpm. A las 70 horas de fermentación, el aumento de $2.4 \cdot 10^7$ a $2.6 \cdot 10^7$ células/mL (7.7%) en la concentración celular se relacionó con un aumento de 0.52 a 0.53 g xilitol/ g xilosa inicial (1.9%) en el rendimiento de la producción de xilitol cuando la velocidad de agitación era de 250 rpm. A las 94 horas de fermentación, el aumento de $2.6 \cdot 10^7$ a $2.8 \cdot 10^7$ células/mL (7.1%) en la concentración celular se relacionó con un aumento de 0.69 a 0.70 g xilitol/ g xilosa inicial (1.4%) en el rendimiento de la producción de xilitol cuando la velocidad de agitación era de 250 rpm.

Cuadro 8. Datos de rendimiento de la producción de xilitol y concentración celular para ambos niveles de aireación (velocidad de agitación), en los distintos tiempos de fermentación.

Tiempo (h)	Agitación (rpm)	Rendimiento xilitol (g xilitol / g xilosa inicial)	Concentración celular (células/mL)
50	200	0.34	$2.1 \cdot 10^7$
	250	0.36	$2.3 \cdot 10^7$
70	200	0.52	$2.4 \cdot 10^7$
	250	0.53	$2.6 \cdot 10^7$
94	200	0.69	$2.6 \cdot 10^7$
	250	0.70	$2.8 \cdot 10^7$

Así se presume que el aumento en el rendimiento de la producción de xilitol al emplear el nivel alto de aireación se relacionó con una mayor concentración celular para la transformación de la xilosa en xilitol, lográndose a la vez una menor concentración de etanol y xilosa residual, a través del tiempo.

La figura 35 permite visualizar la variación en la concentración celular en función del nivel de aireación (velocidad de agitación), en los tres tiempos de fermentación evaluados. Se observa como aumenta la concentración celular a través del tiempo, independientemente del nivel de aireación (agitación); sin embargo, con la mayor velocidad de agitación se obtienen mayores concentraciones celulares; debido a que mayores niveles de aireación favorecen el crecimiento celular.

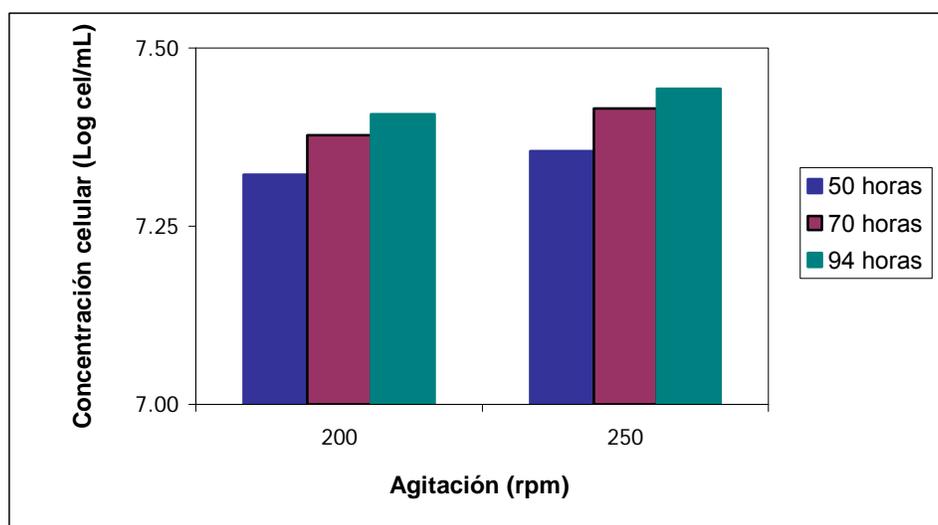


Figura 35. Variación en la concentración celular en función del nivel de aireación (agitación), en los tiempos de fermentación evaluados.

5.3.7 Productividad de xilitol

La productividad de xilitol (g/L*h) se define como la concentración de xilitol alcanzada en determinado tiempo de fermentación. A las 50 horas de fermentación la productividad de xilitol se vio afectada negativamente por la adición de etanol ($p < 0.05$) (cuadro 4). En la figura 36 se puede apreciar que cuando se adicionó etanol al medio se presentó una disminución del 45.1% en la productividad, en comparación a cuando no se

añadió etanol; valor que coincide con la variación en la concentración de xilitol producido para este tiempo bajo las mismas condiciones (sección 5.3.3).

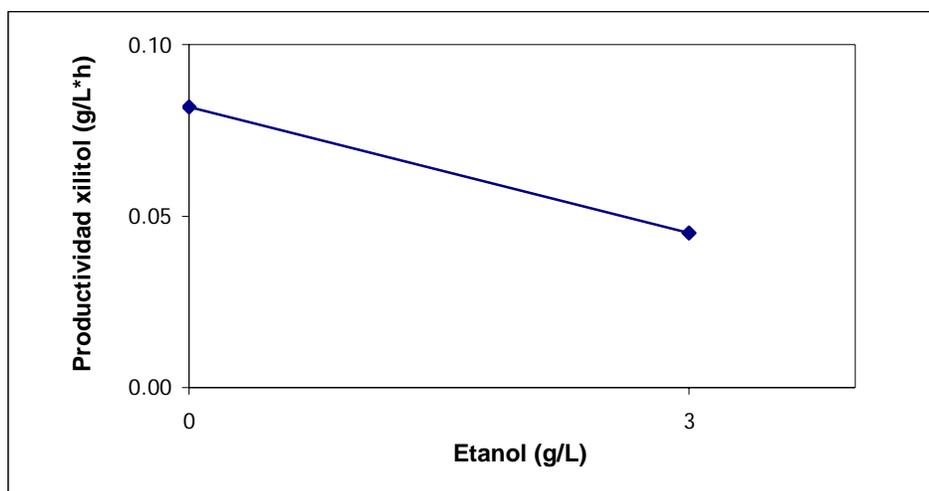


Figura 36. Variación en la productividad de xilitol en función de la concentración de etanol añadida, a las 50 horas de fermentación.

Esto fue contrario a lo que se esperaba, pues tanto Hallborn *et al.* (1994) como Meinander *et al.* (1994), sugieren adicionar etanol como cosustrato para lograr la conversión de grandes cantidades de xilosa a xilitol. Dado que el NAD(P)H que se utiliza para la producción de xilitol proviene de la oxidación del etanol, ya que la producción de xilitol está relacionada estequiométricamente con el consumo del etanol (Hallborn *et al.*, 1994), con la adición de etanol se pretendía favorecer dicha producción; pues en el momento que se agota el etanol del medio se interrumpe la producción de xilitol (Meinander *et al.*, 1994).

A las 70 horas de fermentación la productividad de xilitol se vio afectada de igual manera que a las 50 horas por la adición de etanol ($p < 0.05$) (cuadro 4). En la figura 37 se puede apreciar que cuando se adicionó etanol al medio se provocó una disminución del 38.8% en la productividad, en comparación a cuando no se añadió etanol; valor que coincide con la variación en la concentración de xilitol producido para este tiempo bajo las mismas condiciones (sección 5.3.3).

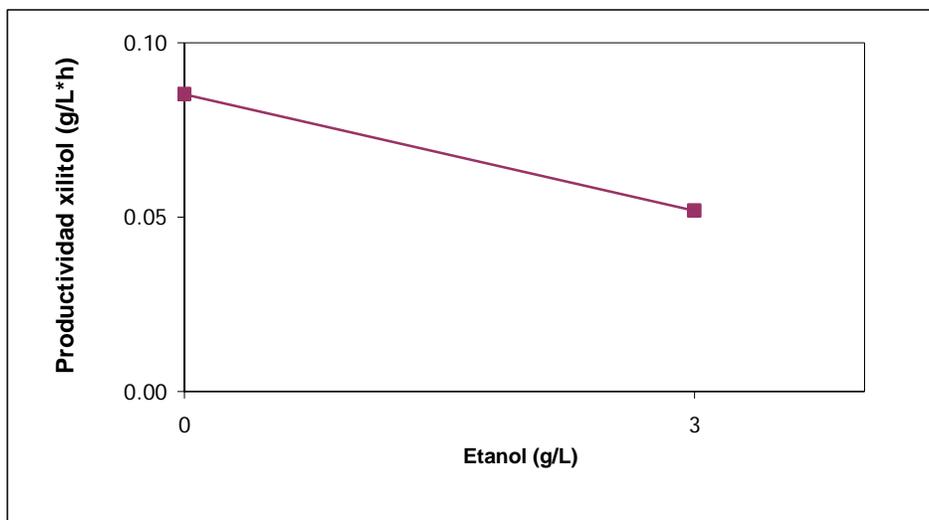


Figura 37. Variación en la productividad de xilitol en función de la concentración de etanol añadida, a las 70 horas de fermentación.

A las 94 horas de fermentación la productividad de xilitol se vio afectada por la interacción entre la concentración de etanol añadida y el nivel de aireación (velocidad de agitación) ($p < 0.05$) (cuadro 4).

En la figura 38 se puede apreciar que con una agitación de 200 rpm la adición de etanol (3 g/L) causó una disminución del 26.2% en la productividad de xilitol; mientras que con 250 rpm ocasionó una disminución del 46.0%. Sin adición de etanol al medio, el aumento en el nivel de aireación (velocidad de agitación) de 200 a 250 rpm causó un aumento del 8.0% en la productividad de xilitol; mientras que con adición de etanol al medio, el aumento en el nivel de aireación (velocidad de agitación) de 200 a 250 rpm causó una disminución del 20.3%.

Es decir, la mayor productividad se alcanzó cuando no se adicionó etanol al medio de fermentación y al emplear el nivel alto de aireación (velocidad de agitación), siendo igual a 0.087 g/L*h; coincidiendo con las condiciones para el máximo rendimiento obtenido en la producción de xilitol (sección 5.3.1).

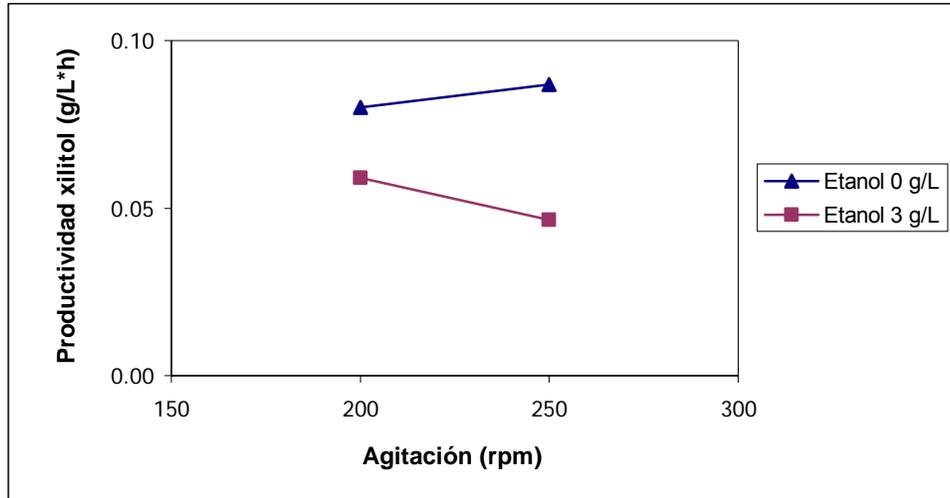


Figura 38. Variación en la productividad de xilitol en función de la concentración de etanol añadida y el nivel de aireación (agitación), a las 94 horas de fermentación.

En la figura 39 se puede apreciar la variación en la productividad de xilitol en función de la concentración de etanol añadida, en los tres tiempos de fermentación evaluados. Se obtuvieron mayores productividades de xilitol cuando no se adicionó etanol al medio, siendo ligeramente mayor para las 70 horas (0.089 g/L*h). Este incremento representa un 1% con respecto a la productividad obtenida a las 94 horas (0.087 g/L*h), y un 3.5% con respecto a la obtenida a las 50 horas (0.084 g/L*h).

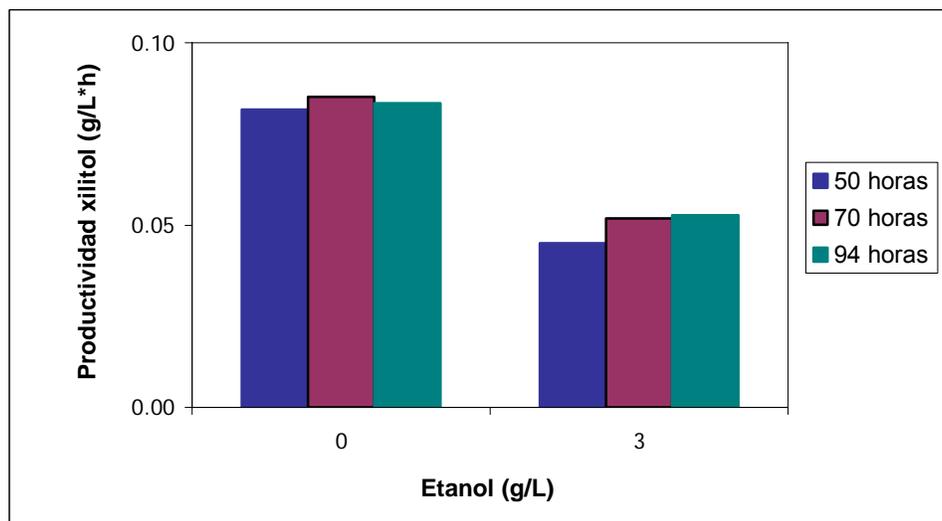


Figura 39. Variación en la productividad de xilitol en función de la concentración de etanol añadida, en los tiempos de fermentación evaluados.

Dado que en la presente investigación la productividad de xilitol es bastante similar a las 50, 70 y 94 horas, entonces hay que evaluar si económicamente vale la pena dejar el cultivo hasta las 94 horas; es decir, se debe valorar si se justifican los gastos en que se incurriría al mantener la fermentación hasta las 94 horas en función del rendimiento en la producción de xilitol alcanzado en ese tiempo, y comparar con las 50 y 70 horas de fermentación.

Otros investigadores como Meinander *et al.* (1994), han obtenido productividades de xilitol entre 0.18 g/L*h y 1.0 g/ L*h, dependiendo de las condiciones experimentales, empleando cepas modificadas genéticamente a nivel piloto. Mientras que a nivel de laboratorio Arce (2004), obtuvo una productividad de xilitol máxima promedio igual a 0.12 g/L*h.

5.3.8 Comparación de resultados

A partir de los rendimientos obtenidos en la producción de xilitol, se pudo comparar con los resultados alcanzados a nivel de laboratorio por Arce (2004); con el fin de valorar el efecto de las variables estudiadas en la presente investigación: adición de etanol y el nivel de aireación (velocidad de agitación).

En la figura 40 se aprecia la comparación de rendimientos en la producción de xilitol. La producción de xilitol a nivel piloto (0.93 g xilitol / g xilosa inicial) proyectó una disminución del 7.0% en el rendimiento de la producción de xilitol en comparación con la producción a nivel de laboratorio (1.0 g xilitol / g xilosa inicial), pero ambas generaron buenos resultados.

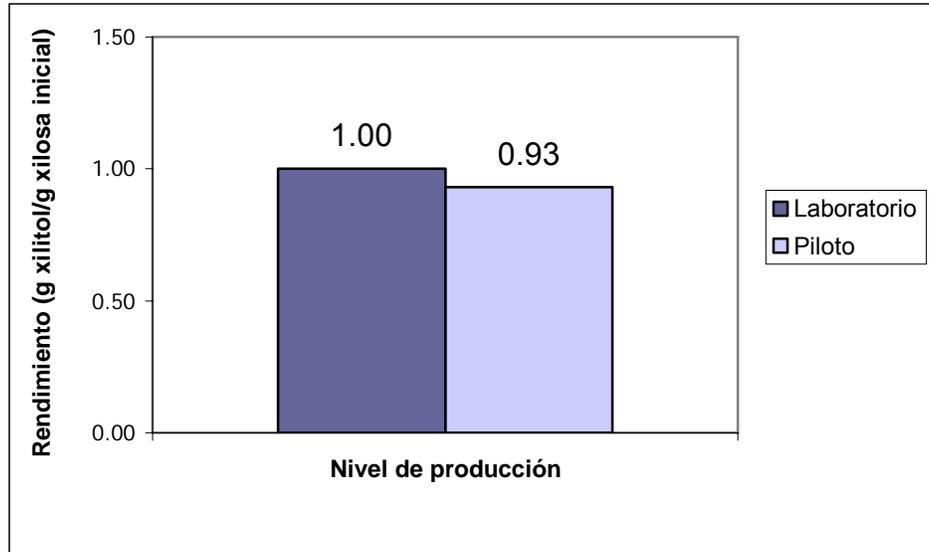


Figura 40. Comparación del máximo rendimiento obtenido en la producción de xilitol en función del nivel de producción.

De ambas investigaciones se puede concluir que el empleo del mayor nivel de aireación, correspondiente a condiciones de oxígeno limitado en ambos casos, generó mejores condiciones para esta producción. Además, a nivel piloto, bajo estas condiciones y sin adición de etanol al medio se alcanzó el mayor rendimiento en la producción de xilitol, en el tiempo de fermentación de 94 horas; mientras que Arce (2004), logró un mayor rendimiento en un tiempo menor (92 horas) a nivel de laboratorio al emplear una concentración de glucosa de 20 g/L y un volumen de cultivo de 25 mL.

En la figura 41 se observa la comparación de la máxima productividad de xilitol obtenida a nivel piloto (0.087 g/L*h) y nivel de laboratorio (0.12 g/L*h) bajo las condiciones recién mencionadas. La producción de xilitol a nivel piloto proyectó una disminución del 27.5% en la productividad de xilitol en comparación con la producción a nivel de laboratorio.

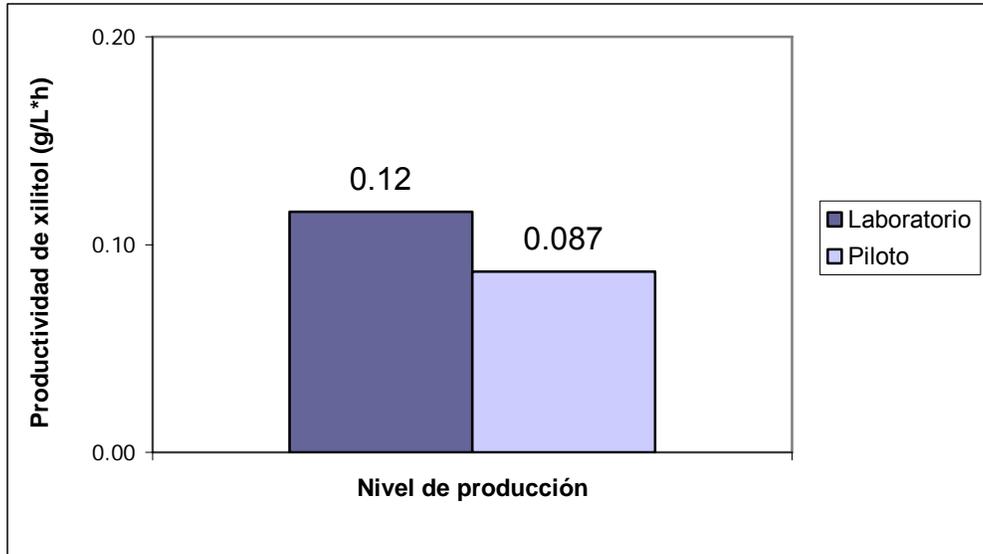


Figura 41. Comparación de la máxima productividad de xilitol obtenida en función del nivel de producción.

La principal ventaja para la producción de xilitol a nivel piloto es que permite un escalamiento del proceso en una escala 60 veces mayor ya que el volumen de trabajo pasó de 25 mL a 1500 mL; además que el bioreactor cuenta con sistema de controles de agitación, pH, oxígeno disuelto y temperatura del medio, y mayor facilidad en la toma de muestras a lo largo de la fermentación.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Curva de crecimiento

Bajo las condiciones en las que se determinó la curva de crecimiento de la levadura X en este estudio (sección 4.4.2) se puede concluir:

- Una vez que la xilosa empieza a ser consumida la concentración de etanol también disminuye e inicia la producción de xilitol.
- El xilitol es producido en la fase estacionaria, es decir después de las 22 horas de fermentación.
- Se obtuvieron resultados más satisfactorios en el rendimiento de la producción de xilitol durante la curva de crecimiento sin control del pH, siendo de 0.91 g de xilitol/ g de xilosa inicial, en comparación con 0.83 g de xilitol/ g de xilosa inicial con control del pH.
- De igual forma, la productividad de xilitol obtenida durante la curva de crecimiento sin control del pH (0.11 g/L*h) es mayor a la lograda con control de pH (0.078 g/L*h).
- El monitoreo del oxígeno disuelto (% dO₂) en el medio a lo largo de la fermentación evidenció que a las 94.5 horas, la levadura X no ha alcanzado su fase de muerte.

6.2 Evaluación de las condiciones de producción de xilitol y otros metabolitos

- El mayor rendimiento en la producción de xilitol se logró en el tiempo de fermentación de 94 horas, al emplear la velocidad de agitación de 250 rpm y sin adición de etanol al medio. Esta combinación de factores produjo un rendimiento de 0.93 g de xilitol/ g de xilosa inicial. Además, generó las mayores concentraciones de xilitol, las menores concentraciones de xilosa y etanol residual y las mayores concentraciones celulares.

- La mayor productividad de xilitol se logró al trabajar con la velocidad de agitación de 250 rpm y sin adición de etanol al medio, siendo similar en los tres tiempos de fermentación evaluados.
- La adición de etanol al medio no era necesaria pues con la cantidad de glucosa agregada al inicio se produjo el suficiente etanol para mantener la producción de xilitol hasta el final de la fermentación.
- La producción de glicerol por sí sola no da un panorama completo del metabolismo de la levadura X, por lo que se debe estudiar en conjunto con el resto de metabolitos.
- Tanto la producción de xilitol a nivel de laboratorio como a nivel piloto generaron altos rendimientos, lográndose un valor ligeramente mayor cuando la producción se realiza a nivel de laboratorio.
- La producción de xilitol a nivel piloto permitió un escalamiento del proceso en una escala 60 veces mayor en comparación con la producción a nivel de laboratorio.
- La levadura X resultó bastante eficaz en la transformación de xilosa a xilitol a nivel piloto, dado el alto rendimiento alcanzado.
- Se recomienda utilizar etanol como único cosustrato, en lugar de glucosa, para evaluar su influencia sobre la producción de xilitol.
- Se recomienda aumentar la concentración de xilosa para estudiar su efecto sobre la producción de xilitol.
- Se recomienda analizar el acetato como otro de los metabolitos generados durante la curva de crecimiento de la levadura X, para evaluar su efecto sobre la producción de xilitol.
- Se recomienda controlar el pH a lo largo de la fermentación cuando se adiciona etanol al medio.
- Se recomienda evaluar el efecto de otros niveles de aireación sobre la producción de xilitol, ya sea variando el volumen de trabajo, la velocidad de agitación, el diámetro de la paleta de agitación y/o el flujo de aire; tomando en cuenta los límites de diseño y funcionamiento del bioreactor.
- Se recomienda evaluar económicamente el mantenimiento del cultivo hasta las 94 horas; para valorar si se justifican los gastos en función del rendimiento en la producción de xilitol y no en la productividad alcanzada.

7. ANEXO

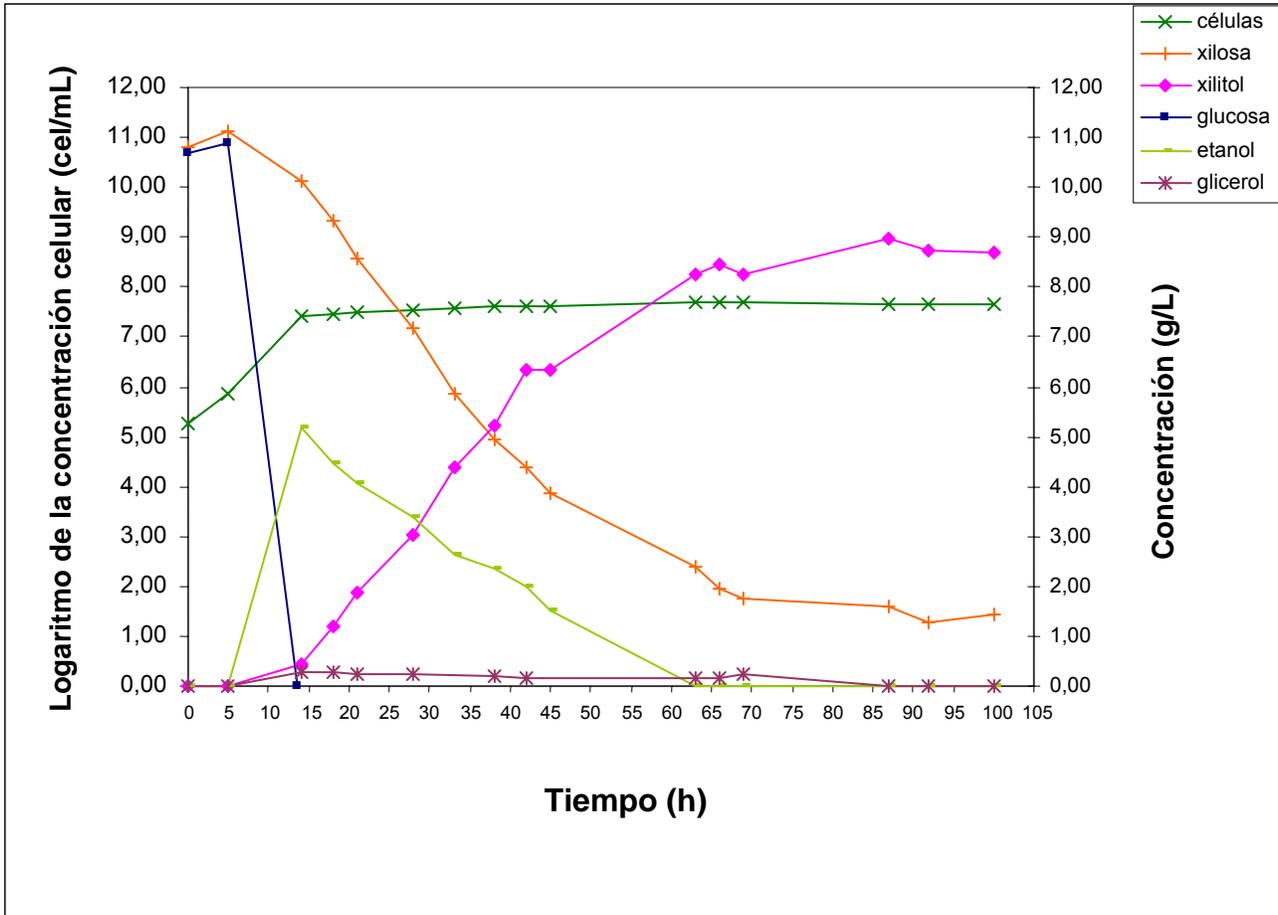


Figura 42. Cambios en la concentración de glucosa, xilosa, xilitol, glicerol, etanol y concentración celular durante la curva de crecimiento de la cepa X en un sistema de fermentación por lote (Arce, 2004).

Cuadro 5. Cambios en la concentración de glucosa, xilosa, xilitol, etanol, glicerol, concentración celular, pH y porcentaje de oxígeno disuelto en el medio (%dO₂), durante la curva de crecimiento de la levadura X en un sistema de fermentación por lote.

Tiempo (h)	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Xilitol (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Cn Celular Log (cel/mL)	pH	% dO ₂ *
0	21.24	11.13	0.00	0.00	0.35	0.00	6.56	100.0
2.5	22.32	11.62	0.00	0.66	0.34	4.98	6.47	97.6
4.5	23.31	12.24	0.00	1.09	0.36	4.98	6.44	93.7
6.5	19.89	10.61	0.00	1.20	0.00	4.98	6.38	92.0
8.5	19.66	10.89	0.00	1.30	0.38	5.89	6.29	90.8
10.5	18.68	11.25	0.00	2.76	0.38	6.19	6.13	78.4
12	15.18	10.89	0.00	2.82	0.43	5.94	5.96	55.8
23	4.87	9.85	1.52	6.92	0.65	6.87	4.90	1.1
26	4.03	9.09	2.26	6.68	0.68	6.91	4.90	0.9
29	4.51	10.37	2.63	6.44	0.59	6.87	4.93	0.8
33	4.17	7.87	3.27	6.21	0.60	6.78	4.97	0.7
46.75	3.88	6.16	5.14	4.43	0.60	6.87	5.33	0.7
50	4.47	5.24	6.81	3.97	0.59	6.95	5.47	0.7
56	3.61	4.28	7.01	3.53	1.00	6.95	5.83	0.4
59	5.60	3.60	7.65	3.09	0.62	6.97	6.03	0.4
71	0.00	2.38	9.04	1.92	0.55	7.03	6.52	0.3
77	4.27	2.30	9.60	1.49	0.51	7.08	6.51	0.2
81.5	5.49	1.69	10.10	0.93	0.54	7.10	6.51	0.2
95	2.54	1.43	10.89	0.05	0.35	7.14	6.78	0.2
100	5.67	3.01	11.19	0.85	0.00	7.16	6.84	0.2

*Datos de %dO₂ corregidos donde un 90.2% inicial corresponde al 100%

Cuadro 6. Cambios en la concentración de glucosa, xilosa, xilitol, etanol, glicerol, concentración celular, pH y porcentaje de oxígeno disuelto en el medio (%dO₂), durante la curva de crecimiento de la levadura X, fijando el pH en 6.5 por adición de NaOH 5N, en un sistema de fermentación por lote.

Tiempo (h)	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Xilitol (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Cn Celular Log (cel/mL)	pH	% dO ₂ *
0	14.55	7.98	0.00	0.14	0.00	0.00	6.79	100.0
2	16.61	9.40	0.00	0.21	0.00	3.24	6.66	89.4
4	15.80	8.94	0.00	0.11	0.00	3.24	6.62	86.8
6	15.29	9.23	0.00	0.17	0.00	3.24	6.56	85.3
8	14.95	8.64	0.00	0.00	0.36	5.67	6.47	85.9
10	13.51	8.35	0.00	0.11	0.00	6.13	6.50	81.6
11.5	11.76	8.59	0.00	0.62	0.00	5.14	6.50	67.3
22	0.29	8.66	1.07	4.73	0.54	6.91	6.50	0.9
25	0.15	8.19	1.68	4.55	0.54	6.89	6.49	0.7
28	0.15	7.60	2.15	4.28	0.55	6.95	6.50	0.7
31	0.27	6.57	2.54	3.36	0.50	6.99	6.50	0.4
33.5	0.18	6.04	2.98	3.24	0.50	7.02	6.50	0.4
46.5	0.00	5.79	4.86	2.07	0.50	6.98	6.81	0.3
49	0.00	4.17	5.04	2.12	0.48	7.06	6.96	0.3
52	0.00	3.50	5.47	2.09	0.00	6.99	7.12	0.2
55.5	0.00	2.99	5.69	2.08	0.00	7.07	7.38	0.3
58	0.00	2.70	5.70	2.08	0.00	7.06	7.51	0.3
71	0.00	4.06	7.09	0.95	0.36	7.02	7.69	0.7
74	0.00	3.96	7.32	0.76	0.00	6.87	7.65	1.1
77	0.00	3.41	6.63	0.44	0.00	6.87	7.64	1.3
80.5	0.00	3.70	6.58	0.62	0.00	6.82	7.65	1.3
94.5	0.00	4.97	6.93	0.00	0.00	6.76	7.58	1.1
100	0.00	4.54	7.80	0.00	0.00	6.89	7.81	0.3

*Datos de %dO₂ corregidos donde un 89.6% inicial corresponde al 100%

Cuadro 7. Resultados promedio obtenidos* en la comparación de tratamientos para la evaluación de la producción de xilitol y otros metabolitos utilizando la levadura X, para los tiempos de fermentación evaluados.

Tiempo (h)	Agitación (rpm)	Etanol (g/L)	Rendimiento Xilitol (g xilitol/g xilosa inicial)	Productividad Xilitol (g/L*h)	Cn. Xilitol producido (g/L)	Cn. Xilosa residual (g/L)	Cn. Etanol residual (g/L)	Cn. Glicerol producido (g/L)	Cn. Celular (Log cel/mL)	pH	% dO ₂
50	200	0	0.42	0.080	3.98	7.88	4.48	0.62	7.32	4.86	0.3
		3	0.26	0.048	2.38	7.10	5.84	0.00	7.33	5.47	0.2
	250	0	0.48	0.084	4.20	5.27	3.51	0.25	7.36	5.52	0.4
		3	0.23	0.043	2.11	7.74	7.72	0.47	7.36	6.16	0.4
70	200	0	0.60	0.082	5.73	7.23	3.03	0.63	7.38	4.79	0.3
		3	0.44	0.058	4.02	5.91	5.26	0.55	7.38	5.66	0.2
	250	0	0.70	0.089	6.17	2.91	2.57	0.23	7.43	6.32	0.4
		3	0.35	0.046	3.24	6.63	6.34	0.27	7.41	6.44	0.5
94	200	0	0.78	0.080	7.52	3.53	1.42	0.64	7.39	4.89	0.3
		3	0.60	0.059	5.56	4.63	3.47	0.54	7.43	5.90	0.3
	250	0	0.93	0.087	8.19	1.94	1.77	0.42	7.45	6.72	0.4
		3	0.47	0.047	4.35	5.89	4.47	0.27	7.44	6.68	0.3

*Para las dos réplicas llevadas a cabo para cada tratamiento. Se analizaron dos muestras por réplica.

8. BIBLIOGRAFÍA

- AFFLECK, P. 2000. Recovery of xylitol from fermentation of model hemicellulose hydrosylates using membrane technology. Thesis M.Sc. in Biological Systems Engineering. Virginia Polytechnic Institute and state University. Blacksburg, Virginia.
- ARCE, L. 2004. Evaluación de la producción de xilitol a nivel de laboratorio, por vía fermentativa a partir de xilosa comercial. Tesis Lic. Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- BELITZ, H. & GROSCH, W. 1997. Química de los Alimentos. 2ª ed. ACRIBIA. Zaragoza. 1069 p.
- BISWAS, S. & VASHIHTHA, N. 2003. Xylitol: Technology & business opportunities. India, TIFAC. INTERNET. <http://www.tifac.org.in/news/view6.htm>. Fecha de consulta: Noviembre, 2004
- BUHNER, J. & AGBLEVOR, F. 2003. Dilute acid hydrolysis and fermentation of corn fiber to xylitol. Technical University of Dresden, Alemania. INTERNET. <http://bioproducts-bioenergy.gov/pdfs/bcota/abstracts/26/z391.pdf>. Fecha de consulta: Noviembre, 2004
- COUNSELL, J. 1978. Xylitol. Applied Science Publishers LTD. London.
- CRUEGER, W. & CRUEGER, A. 1993. Biotecnología: Manual de microbiología industrial. 3ª ed. ACRIBIA. Zaragoza. 431 p.
- CUBERO, E. 2006. Análisis estadístico de resultados. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José. Comunicación personal.

- DOMÍNGUEZ, J. 1998. Xylitol production by free and immobilized *Debaryomyces hansenii*. *Biotechnology Letters* 20(1): 53-56.
- EMODI, A. 1978. Xylitol its properties and food applications. *Food Technology* 32(1): 28-32.
- FDA (Food and Drug Administration). 2005. Calorie Control Council. Estados Unidos. INTERNET. <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/05n0120/05N-0120-EC3-Attach-1.pdf>. Fecha de consulta: Diciembre, 2006
- HALLBORN, J., WALFRIDSSON, M., AIRAKSINEN, U., OJAMO, H., HAHN-HÄGERDAL, B., PENTTILÄ, M. & KERÄNEN, S. 1991. Xylitol production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology* 9: 1090-1095.
- 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(2-3): 326-333.
- HALLBORN, J. 1995. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: Expression of genes involved in pentose metabolism. Lund University/Lund Institute of Technology, Department of Applied Microbiology. Suecia.
- HOLLINGSWORTH, P. 2002. Sugar replacers expand product horizons. *Food Technology* 56(7): 24-45.
- HYVÖNEN, L., KOIVISTOINEN, P. & VOIROL, F. 1982. Food technological evaluation of xylitol. *Advances in Food Research* 28: 373-403.
- KIM, J., HAN, Y., RYU, Y. & SEO, J. 1999. Analysis and optimization of a two-substrate fermentation for xylitol production using *Candida tropicalis*. *Journal of Industrial Microbiology & Technology* 22(3): 181-186.

- KIM, J., HAN, K., KOH, Y., RYU, Y. & SEO, J. 2002. Optimization of fed-batch fermentation for xylitol production by *Candida tropicalis*. Journal of Industrial Microbiology & Technology 29(1): 16-19.
- LEE, W., RYU, Y. & SEO, J. 2000. Characterization of two-substrate fermentation process for xylitol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductasa gene. Process Biochemistry 35(10): 1199-1203.
- LEE, J., KOO, B. & KIM, S. 2003. Cloning and characterization of XYL1 gene, encoding an NADH-preferring xylose reductase from *Candida parapsilosis*, and its functional expression in *Candida tropicalis*. Applied and Environmental Microbiology 69(10): 6179-6188.
- MÄKINEN, K. 1978. Biochemical principles of the use of xylitol in medicine and nutrition with special consideration of dental aspects. Birkhäuser Verlag Basel. Suiza.
- MARTÍNEZ, L. 1996. Proyecto de Ley sobre desechos sólidos y peligrosos. Costa Rica. INTERNET. www.racsa.co.cr/asamblea/proyecto/tx_base/12631.DOC. Fecha de consulta: Noviembre, 2004
- MARTÍNEZ, E., SILVA, S., ALMEIDA E SILVA, J., SOLENZAL, A. & FELIPE, M. 2003. The influence of pH and dilution rate on continuous production of xylitol from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii*. Process Biochemistry 38(12): 1677-1683.
- MATHEWS, C., VAN HOLDE, K. & AHERN, K. 2002. Bioquímica. Pearson, España.
- MEINANDER, N., HAHN-HÄGERDAL, B., LINKO, M., LINKO, P. & OJAMO, H. 1994. Fed-batch xylitol production with recombinant XYL-1-expressing *Saccharomyces cerevisiae* using ethanol as a co-substrate. Applied Microbiology and Biotechnology 42(2-3): 334-339.

- MEINANDER, N. & HAHN-HÄGERDAL, B. 1996. Fed-batch xylitol production with two recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing XYL1 at different levels, using glucose as a co-substrate: a comparison of production parameters and strain stability. *Biotechnology & Bioengineering* 54(4): 391-399.
- MEINANDER, N. & HAHN-HÄGERDAL, B. 1997. Influence of cosubstrate concentration on xylose conversion by recombinant, XYL1-expressing *Saccharomyces cerevisiae*: a comparison of different sugars and ethanol as cosubstrates. *Applied and Environmental Microbiology* 63(5): 1959-1964.
- 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(2): 331-337.
- MUSSATTO, S. & ROBERTO, I. 2004. Optimal experimental condition for hemicellulosic hydrolysate treatment with activated charcoal for xylitol production. *Biotechnology Progress* 20(1): 134-139.
- NÁHLÍK, J., PALATOVÁ, M., GÍRIO, F. & ROSEIRO, C. 2003. Model identification and physiological control of xylitol production using *Debaryomyces hansenii*. *Process Biochemistry* 38(12): 1695-1705.
- NIGAM, P. & SING, D. 1995. Processes for fermentative production of xylitol - a sugar substitute. *Process Biochemistry* 30(2): 117-124.
- OURA, E. 1977. Reaction products of yeast fermentations. *Process Biochemistry* 12:19-21.
- PARAJÓ, J., DOMINGUEZ, H. & DOMÍNGUEZ, J. 1997. Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. *Enzyme and Microbial Technology* 21(1): 18-24.

- PEPPER, T. & OLINGER, P. 1988. Xylitol in sugar-free confections. *Food Technology* 42(10): 98-106.
- POSTMA, E., VERDUYN, C., SCHEFFERS, A. & VAN DIJKEN, J. 1988. Enzymatic analysis of the crabtree in glucose limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 55(2): 468-477.
- RIVAS, B., TORRE, P., DOMÍNGUEZ, J. M., CONVERTI, A. & PARAJÓ, J. 2006. Purification of xylitol obtained by fermentation of corncob hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(12): 4430-4435.
- RUSSEL, I. 2003. Understanding Yeast Fundamentals. In Jacques, K., Lyons & Kelsall, D., eds. *The Alcohol Textbook*. Nottingham University Press, Nottingham. p. 85-119.
- SILVA, S., ROBERTO, I., FELIPE, M. & MANCILHA, I. 1996. Batch fermentation of xylose for xylitol production in stirred tank bioreactor. *Process Biochemistry* 31(6):549-553.
- SILVA, S., VITOLO, M., MANCILHA, I., ROBERTO, I. & FELIPE, M. 1993/94. Xilitol: Um adoçante alternativo para a indústria de alimentos. *Alimentos e Nutrição* 5: 109-117.
- SILVA, S. & ROBERTO, I. 1999. Statistical screening method for selection of important variables on xylitol biosynthesis from rice straw hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *Biotechnology Techniques* 13: 743-747.
- SINGH, A. & MISHRA, P. 1995. Microbial Pentose Utilization. *Current Applications in Biotechnology*. Vol.33. ELSEVIER SCIENCE B.V. Amsterdam. 401 p.
- SKOOG, K. & HAHN-HÄGERDAL, B. 1990. Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Applied and Environmental Microbiology* 56(11): 3389-3394.

THESTRUP, H. & HAHN-HÄGERDAL, B. 1995. Xylitol formation and reduction equivalent generation during anaerobic xylose conversion with glucose as cosubstrate in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing the XYL1 gene. *Applied and Environmental Microbiology* 61(5): 2043-2045.

WINKELHAUSEN, E., PITTMAN, P., KUZMANOVA, S. & JEFFRIES, W. 1996. Xylitol formation by *Candida boidinii* in oxygen limited chemostat culture. *Biotechnology Letters* 18(7): 753-758.