

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE
XILITOL A PARTIR DE
HIDROLIZADOS DE RAQUIS DE
PALMA CON LEVADURAS DEL
GÉNERO *Candida sp.***

Josefa Katherine Manjarrés Pinzón

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Química
Medellín, Colombia
2019

PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL A PARTIR DE HIDROLIZADOS DE RAQUIS DE PALMA CON LEVADURAS DEL GÉNERO *Candida sp.*

Josefa Katherine Manjarrés Pinzón

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título

Doctor en Biotecnología

Director:

Mario Arias Zabala, Ph. D.

Codirector:

Guillermo Correa Londoño, Ph. D.

Línea de Investigación:

Procesos Fermentativos

Grupo de Investigación:

Biotecnología Industrial

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Química
Medellín, Colombia
2019

Dedicatoria

Primero y, antes que nada, dar gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón, darme la tranquilidad en cada momento, por ubicarme en el lugar correcto con la gente precisa y en el tiempo indicado durante este estudio.

A mi hija Julieta, regalo que llegó justo en la fase final de mi doctorado y vino a darle el verdadero sentido a mi existencia.

A mi esposo por ser un gran compañero y animarme a culminar este proceso.

A mi padre que es mi inspiración, mi madre mí mejor amiga y toda mi familia que siempre han estado en todo momento apoyándome así sea desde la distancia.

Agradecimientos

Agradezco al profesor Mario Arias por su apoyo en todo momento en la dirección de mi tesis.

Al profesor Guillermo Correa por su orientación en la parte estadística,

A la profesora Nadenka Melo por enseñarme sobre levaduras y *Candida sp.*

Al profesor Eduardo Rodríguez por sus aportes durante esta investigación y constante apoyo emocional.

A Colciencias, por la beca brindada para la realización de mis estudios.

A los laboratorios de Control de Calidad de Alimentos y de Bioconversiones por prestarme un espacio para desarrollar la parte experimental.

A todos mis compañeros, en especial a Juan Pablo Arias y Dary Luz Mendoza por su amistad.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar los parámetros óptimos de operación durante la fermentación por lote sumergido de hidrolizados de raquis de palma para la producción de xilitol con diferentes levaduras del género *Candida sp.* En la optimización del hidrolizado de raquis de palma se obtuvo la máxima concentración de xilosa y la mínima producción de inhibidores en tratamientos con un tiempo de reacción de 30 min a 121°C, una concentración de ácido sulfúrico del 2%, una relación sólido-líquido de 1:8 y un tamaño de partícula de 4 cm. A escala matraz, las condiciones de fermentación que tuvieron la mayor producción de xilitol con *Candida guilliermondii* en hidrolizados de raquis de palma suplementado fueron pH de 5.5, concentración inicial de xilosa de 17 g L⁻¹, un inóculo de 3 g L⁻¹ y nivel de aireación con un volumen de 40 mL en matraces de 100 mL. No obstante, se decidió cambiar de cepa a *Candida tropicalis* en las experimentaciones sucesivas porque la *C. guilliermondii* utilizada no contaba con una certificación de producción de xilitol y su capacidad metabólica se pudo afectar lo que pudo deberse a la pérdida de material genético que codifica para proteínas importantes en la ruta metabólica de la xilosa a xilitol y el tipo de pase con el que se adquirió esta cepa (#4). En la evaluación de los pretratamientos con detoxificación con carbón activado y sin detoxificar, se seleccionó este último en la producción de xilitol con *C. tropicalis* a partir de hidrolizado de raquis de palma porque las concentraciones de inhibidores son mínimas y no afectan la cepa para la toma de la xilosa para la producción de xilitol, obteniéndose un rendimiento de producto (0.74 g g⁻¹) y un consumo de la mayor cantidad de xilosa durante el proceso de fermentación. Por otro lado, al aplicar una optimización al proceso de producción de xilitol con *C. tropicalis* a partir de hidrolizados de raquis en matraz de 100 mL se obtuvo la siguiente combinación de las condiciones de operación: pH de 6.0, biomasa de 5.42 g L⁻¹, volumen útil de 26 mL y concentración de xilosa inicial de 20 g L⁻¹. Estas condiciones fueron el punto de partida para realizar el proceso de producción de xilitol en un biorreactor de tanque agitado a

escala de banco con *C. tropicalis*. El aumento gradual de xilosa reductasa (XR) incide directamente en una mayor cantidad de xilitol producido en un biorreactor de 7 L demostrando que la producción de xilitol podría no ser favorecida por altas concentraciones de XR, sino por el comportamiento de dicha enzima durante toda la fermentación, la cual debe tener una tendencia en aumento sin fluctuaciones en el tiempo. Las mejores condiciones de operación fueron para 30% de oxígeno disuelto y una velocidad de agitación de 50 rpm, con una toma de xilosa del 95.5 % y una producción máxima de xilitol de 5.46 g L⁻¹. Durante el proceso de fermentación, la máxima actividad XR (0.646 U mg⁻¹ proteína) fue obtenida después de 144 h a las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Esto demuestra que el proceso fermentativo comienza a ser efectivo después del cuarto día posterior a la inoculación del biorreactor, y que condiciones limitadas de oxígeno y bajas velocidades de agitación favorecen la producción de xilitol y el consumo adecuado de xilosa. Adicionalmente, al aplicar modelos no estructurados para el crecimiento celular y producción de xilitol, tanto en medio sintético como en hidrolizado de raquis de palma a escala matraz utilizando *C. tropicalis*, se concluyó que el modelo de Tessier predice mejor los resultados en medio sintético y el modelo de Contois tiene mejor ajuste en hidrolizado de raquis sin detoxificar. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que este tipo de procesos son complejos y dependen de diversas variables, por lo que se recomienda a futuro utilizar modelos biológicamente estructurados para una mejor descripción del proceso.

Palabras clave: *Candida sp*, xilitol, xilosa, raquis de palma, fermentación, modelos no estructurados.

Abstract

The aim of this work was to determine the optimal operation parameters during the batch fermentation by hydrolysate of Oil Palm Empty Fruit Bunch (OPEFB) for the xylitol production with different yeasts of the genus *Candida sp.* In the optimization of the hydrolysate of OPEFB, the maximum xylose concentration and the minimum production of inhibitors were obtained at 121°C, for 30 min, with a 1:8 solid:liquid ratio, 2% acid concentration and particle size of around 4 cm. At the Erlenmeyer flasks scale, the fermentation conditions that had the highest xylitol production by *Candida guilliermondii* in supplemented hydrolysates of OPEFB were pH of 5.5, initial xylose concentration of 17 g L⁻¹, inoculum of 3 g L⁻¹ and aeration level with a 40 mL volume in 100 mL flasks. However, it was decided to change the strain to *Candida tropicalis* in the successive experiments because the *C. guilliermondii* used did not have a certification of xylitol production and its metabolic capacity could be affected, which could be due to the loss of genetic material that codes for important proteins in the metabolic pathway from xylose to xylitol and the type of pass with which this strain was acquired (# 4). In the evaluation of pretreatment with detoxification with activated charcoal and without detoxification, the latter was selected in the xylitol production by *C. tropicalis* in hydrolysates of OPEFB because the concentration of inhibitors is minimal and does not affect the strain for the intake of the xylose for the xylitol production, a product yield (0.74 g g⁻¹) is obtained and the greater amount of xylose is consumed during the fermentation process. On the other hand, when applying an optimization to the xylitol production process by *C. tropicalis* from hydrolysates of OPEFB in Erlenmeyer flask, the following combination of operating conditions was obtained: pH of 6.0, biomass of 5.42 g L⁻¹, volume of 26 mL and initial xylose concentration of 20 g L⁻¹. These conditions were the starting point to carry out the production process of xylitol in a bioreactor by *C. tropicalis*. The gradual increase of xylose reductase (XR) directly affects a greater amount of xylitol produced in a 7 L

bioreactor, demonstrating that the xylitol production could not be favored by high concentrations of XR, but by the behavior of this enzyme during all the fermentation, which should have an increasing tendency without fluctuations in time. The best operating conditions were for 30% dissolved oxygen and a stirring speed of 50 rpm, with a xylose intake of 95.5% and a maximum xylitol production of 5.46 g L⁻¹. During the fermentation process, the maximum XR activity (0.646 U mg⁻¹ protein) was obtained after 144 h at the same conditions mentioned above. This shows that the fermentative process begins to be effective after the fourth day after inoculation of the bioreactor, and that limited oxygen conditions and low agitation speeds favor the xylitol production and the suitable consumption of xylose. Additionally, when applying unstructured models for cell growth and xylitol production both in synthetic medium and hydrolysates of OPEFB in Erlenmeyer flask using *C. tropicalis*, it was concluded that the Tessier model predicts better the results in synthetic medium and Contois model has better adjustment in non-detoxified hydrolysates of OPEFB. However, it is necessary to bear in mind that this type of process is complex and depends on several variables. In addition, the applicability of biological concepts in models remains limited.

Keywords: *Candida sp*, xylitol, xylose, oil palm empty fruit bunch, fermentation, no structured models.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Abstract.....	XI
Contenido	XIII
Lista de figuras.....	XVI
Lista de tablas	XVIII
Introducción.....	1
Objetivos.....	1
1. Capítulo 1.....	3
1.1. Resumen.....	3
1.2. Introducción.....	4
1.3. Materiales y métodos	7
1.3.1. Materia Prima	7
1.3.2. Hidrólisis ácida diluida de raquis.....	7
1.3.3. Métodos analíticos.....	9
1.4. Diseño experimental.....	8
1.5. Resultados y discusión.....	9
1.5.1. Composición del raquis.....	9
1.5.2. Hidrólisis ácida diluida del raquis	10
1.5.3. Cambios morfológicos del raquis	16
1.6. Conclusiones.....	19
Referencias	19
2. Capítulo 2.....	24
2.1. Resumen.....	24
2.1. Introducción.....	25
2.2. Materiales y métodos	26
2.2.1. Materiales	26
2.2.2. Hidrólisis ácida del raquis de palma.....	27
2.2.3. Crecimiento de la levadura en diferentes medios.....	27
2.2.4. Fermentación a diferentes condiciones.....	27

2.2.5. Nivel de aireación	28
2.2.6. Diseño Experimental	28
2.3. Resultados y discusión	29
2.3.1. Curvas de crecimiento en diferentes medios	29
2.3.2. Fermentación a escala de matraz.....	31
2.3.3. Nivel de aireación.....	32
2.4. Conclusiones	35
Referencias	35
3. Capítulo 3	39
3.1. Resumen	39
3.2. Introducción	40
3.3. Materiales y métodos.....	42
3.3.1. Preparación y tratamiento del hidrolizado de raquis de palma	42
3.3.2. Detoxificación	43
3.3.3. Preparación del preinóculo	43
3.3.4. Condiciones de fermentación	43
3.3.5. Curvas de crecimiento y producción de xilitol	44
3.3.6. Cuantificación de azúcares e inhibidores.....	45
3.3.7. Análisis estadístico.....	45
3.4. Resultados y discusión	45
3.4.1. Evaluación de condiciones de detoxificación con carbón activado y overliming.....	45
3.4.2. Evaluación de condiciones con y sin detoxificación	48
3.4.3. Efecto de la composición del medio sobre la producción de biomasa y xilitol	53
3.5. Conclusiones	56
Referencias	56
4. Capítulo 4	59
4.1. Resumen	59
4.2. Introducción	60
4.3. Materiales y métodos.....	61
4.3.1. Materiales.....	61
4.3.2. Hidrólisis ácida del raquis de palma	61
4.3.3. Microorganismo y preparación del preinóculo.....	62
4.3.4. Fermentación en matraz agitado y optimización	62
4.3.5. Métodos analíticos	63
4.4. Resultados y discusión	63
4.4.1. Estudio de optimización.....	63
4.4.2. Validación del modelo de optimización	67
4.5. Conclusiones	68
Referencias	69
5. Capítulo	71
5.1. Resumen	71
5.2. Introducción	72
5.3. Materiales y métodos.....	73
5.3.1. Materiales.....	73
5.3.2. Hidrólisis ácida del raquis de palma	73
5.3.3. Microorganismo y preparación del preinóculo.....	74
5.3.4. Proceso de fermentación.....	74
5.3.5. Extractos enzimáticos.....	75

5.3.6. Métodos analíticos.....	75
5.3.7. Diseño experimental.....	76
5.4. Resultados y discusión.....	77
5.4.1. Fermentación de la xilosa y producción de xilitol en diferentes condiciones de oxígeno y agitación.....	77
5.4.2. Efecto del oxígeno disuelto y la agitación sobre la actividad xilosa reductasa a escala de biorreactor.....	81
5.5. Conclusiones.....	84
Referencias.....	85
6. Capítulo 6.....	89
6.1. Resumen.....	89
6.2. Introducción.....	90
6.3. Materiales y métodos.....	92
6.3.1. Microorganismo y medio de cultivo.....	92
6.3.2. Preinóculo y condiciones de fermentación.....	92
6.3.3. Métodos analíticos.....	93
6.3.4. Modelos de fermentación.....	93
6.3.5. Modelo cinético no estructurado.....	94
6.4. Resultados y discusión.....	94
6.4.1. Cinética de crecimiento celular.....	94
6.4.2. Cinética de consumo de xilosa.....	96
6.4.3. Cinética de producción de xilitol.....	97
6.4.4. Comparación de los modelos.....	98
6.5. Conclusiones.....	103
Referencias.....	104
7. Conclusiones y recomendaciones.....	107
7.1. Conclusiones.....	107
7.2. Recomendaciones.....	108
A. Anexo: Prueba de bondad de ajuste en los modelos para producción de xilitol.....	110
B. Anexo: Soluciones durante la optimización de la producción de xilitol.....	111

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Producción de xilosa en función de la concentración de ácido (%) y tiempo de contacto (<i>Relación solido-liquido 1:8, tamaño partícula 4 cm</i>).....	15
Figura 1-2: Producción de glucosa (A), ácido acético (B) y HMF (C) en función de la concentración de ácido (%) y el tiempo de contacto (min). (<i>Relación solido-liquido 1:8, tamaño partícula 4 cm</i>)	16
Figura 1-3: Imágenes SEM del raquis tratado previamente con 2% de ácido sulfúrico + tamaño de partícula de 3 cm (A y B); raquis pretratado con 6% de ácido sulfúrico + 3 cm de tamaño de partícula (C y D) y raquis pretratado con 4% de ácido sulfúrico + 3 cm de tamaño de partícula (E y F). Imágenes del raquis no tratado (G y H) con aumentos de 150X, 500x, 1500x y 2500x.....	18
Figura 2-1: Curvas de crecimiento de <i>Candida guilliermondii</i> en medios YPG, HR y HRS, a 30°C y 108rpm.....	30
Figura 3-1: Crecimiento de <i>Candida tropicalis</i> con hidrolizados por DCA y DOV.	47
Figura 3-2: Producción de xilitol por <i>Candida tropicalis</i> con hidrolizados detoxificados por DCA y DOV.....	47
Figura 3-3: Rendimiento producto/sustrato (Yp/s) en la producción de xilitol por <i>Candida tropicalis</i> con hidrolizado detoxificado por DCA (A) y sin detoxificar (B).	49
Figura 3-4: Xilosa residual en la producción de xilitol por <i>C. tropicalis</i> con hidrolizado detoxificado por DCA (A) y sin detoxificar (B).....	50

Figura 3-5: Producción de xilitol por <i>C. tropicalis</i> con hidrolizado detoxificado por DCA (A) y sin detoxificar (B)	53
Figura 4-1: Superficie de respuesta para la producción de xilitol como función del pH y la biomasa inicial.....	65
Figura 4-2: Cinética de consumo de xilosa y producción de xilitol en hidrolizados de raquis de palma por <i>Candida Tropicalis</i> a escala de matraz.....	68
Figura 5-1: Concentración de xilosa durante la fermentación de hidrolizado de raquis de palma usando <i>C. tropicalis</i>	78
Figura 5-2: Producción de xilitol durante la fermentación de hidrolizado de raquis de palma usando <i>C. tropicalis</i>	78
Figura 5-3: Biomasa formada durante la fermentación del hidrolizado de raquis de palma usando <i>Cándida tropicalis</i> (<i>Biorreactor</i> , variación oxígeno disuelto)	79
Figura 5-4: Productividad volumétrica obtenida durante la fermentación de hidrolizados de raquis de palma usando <i>Candida tropicalis</i> a escala de biorreactor.....	80
Figura 5-5: Rendimiento del xilitol obtenida durante la fermentación de hidrolizados de raquis de palma usando <i>Candida tropicalis</i> a escala de bioreactor.....	81
Figura 5-6: Actividad enzimática xilosa reductasa (XR) durante la fermentación de hidrolizado de raquis de palma usando <i>C. tropicalis</i> a escala de biorreactor de 7 L	84
Figura 6-1: Concentración de biomasa durante la fermentación en medio YPX (a) y en hidrolizado de raquis sin detoxificar (b)	95
Figura 6-2: Concentración de xilosa durante la fermentación en medio YPX (a) y en hidrolizado de raquis sin detoxificar (b).....	97
Figura 6-3: Concentración de xilitol durante la fermentación en medio YPX (a) y en hidrolizado de raquis sin detoxificar (b).....	99

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: El diseño de Box-Behnken (BBD) aplicado a la hidrólisis ácida diluida de raquis de palma y las correspondientes respuestas experimentales utilizadas para el modelado RSM	10
Tabla 1-2: Coeficientes de la ecuación de regresión y coeficiente de correlación (R ²) de los modelos de superficie de respuesta para la producción de xilosa, glucosa, ácido acético y HMF a partir de la hidrólisis ácida diluida de raquis.....	13
Tabla 2-1: Parámetros de las cinéticas de crecimiento de <i>Candida guilliermondii</i> en diferentes medios de cultivo	30
Tabla 2-2: Fermentación en matraz por 96h, con diferentes concentraciones de inóculo, sustrato y pH.....	32
Tabla 2-3: Nivel de aireación con hidrolizado suplementado (HRS), medio mínimo de xilosa (MMX) y cepa nativa de <i>Candida guilliermondii</i>	33
Tabla 3-1: Concentraciones de inhibidores y azúcares en hidrolizados pretratados con carbón activado (DCA) a distintos valores de pH	46
Tabla 3-2: Parámetros fermentativos utilizando medio HR.	55
Tabla 4-1: Diseño Box-Behnken (BBD) aplicado en producción de xilitol a escala de matraz en hidrolizados de raquis de palma y que corresponden a los experimentos usados en el RSM.....	64

Tabla 6-1: Valores estimados de los parámetros de crecimiento celular, consumo de xilosa y producción de xilitol durante la fermentación con <i>Candida tropicalis</i> en diferentes medios de cultivo aplicando modelos no estructurados.	101
Tabla 6-2: Parámetros estimados y desviaciones de los modelos aplicados en la fermentación con <i>Candida tropicalis</i> con diferentes medios de cultivo	102

Introducción

Colombia es el primer productor de palma de aceite en América Latina y cuarto productor mundial. La producción de aceite de palma en el 2017 alcanzó 1'627.552 toneladas. El cultivo tiene presencia en 21 departamentos y 152 municipios de la geografía nacional, congrega el esfuerzo y el trabajo decidido de más de 6.000 productores, de los cuales el 80 % corresponde a pequeños productores, empresarios palmeros de menos de 50 ha. Su producción se encuentra distribuidas en 5 zonas: norte (Atlántico, Bolívar, Cesar y Magdalena), suroccidental (Caquetá y Nariño), oriental (Casanare, Meta y Vichada) y central (Antioquia, Cundinamarca, Norte de Santander y Santander), donde las zonas con mayor producción son la central y oriental. Durante el proceso de extracción de aceite se obtienen residuos sólidos en menor proporción tales como fibras, cáscaras y en mayor proporción los frutos vacíos de palma o "raquis". En promedio, se producen entre 190 y 250 kg de aceite por tonelada de fruto fresco de palma y entre 260 y 480 kg de residuos sólidos.

El 40% de estos residuos se quema directamente para realizar cogeneración energética o el simple calentamiento. El 60% restante se utiliza principalmente para la fertilización y el abono de los campos de palma. Se estima que se producen entre 120 y 260 kg de frutos vacíos de palma o raquis por cada tonelada de fruto fresco de palma. De los racimos de fruta fresca alrededor de 20 a 24% son racimos vacíos o raquis, 11 a 14% son fibras, 5 a 7% es cuesco o cáscara del fruto y 65 a 85% son efluentes líquidos. La incineración o quema del raquis genera un problema ambiental bastante preocupante por la emisión de gases de efecto invernadero.

A pesar de emplear el raquis como fertilizante, se necesitan encontrar diferentes alternativas para aprovechar este subproducto y darle valor agregado, teniendo en cuenta el aumento proyectado del cultivo de palma en nuestro país. Por consiguiente,

esta biomasa se podría convertir en una materia prima fuente de azúcares fermentables para su conversión a productos de mayor valor agregado. La conversión de los materiales lignocelulósicos a azúcares fermentables se dificulta por la presencia de lignina porque este compuesto restringe el acceso enzimático y microbiológico a la celulosa y hemicelulosa. Por esta razón, se requiere la aplicación de pretratamientos fisicoquímicos y/o biológicos para mejorar su hidrólisis enzimática.

La hemicelulosa se constituye principalmente de xilano y este a su vez está constituido por unidades de xilosa que pueden hidrolizarse, ya sea química o biológicamente, a azúcares simples para la producción de una gran variedad de productos químicos, destacándose el xilitol, el cual es un poliol de cinco carbonos que se utiliza actualmente como un edulcorante artificial por tener solo un tercio del total de calorías que contienen otros azúcares como la sacarosa. Además, este poliol se utiliza ampliamente en la industria farmacéutica, chicles, dulces, nutracéuticos, bebidas, pastas dentales y productos cosméticos.

Los métodos tradicionales para la conversión de xilosa a xilitol requieren altas presiones y temperaturas, es un proceso que tiene un alto costo de purificación y ambientalmente perjudicial por el uso de agentes químicos. Mientras que, esta misma conversión mediante rutas biotecnológicas utilizando microorganismos constituye una alternativa más económica y amigable con el medio ambiente.

Levaduras, como *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis*, toman la xilosa como fuente de carbono y la convierten a xilitol por medio de la enzima xilosa reductasa. La bioconversión de xilosa a xilitol es un proceso regulado por diferentes factores, tales como la concentración inicial de xilosa, biomasa, pH, tasa de aireación y la presencia de ciertos compuestos en el medio de cultivo como la glucosa y los inhibidores. El estudio de estas variables es fundamental para optimizar el proceso de fermentación con el fin de obtener la mayor conversión de la xilosa bajo diferentes condiciones de proceso y obtener la mayor producción de xilitol. Actualmente no existen trabajos enfatizados en el conocimiento de dichas variables a nivel de biorreactor de tanque agitado, específicamente el control del oxígeno disuelto y su influencia sobre la actividad enzimática como la xilosa reductasa en hidrolizado de raquis de palma de aceite.

Este documento se ha dividido en 6 capítulos siguiendo los objetivos de esta investigación. En el Capítulo 1 se evaluó el efecto de diferentes condiciones de proceso como concentración de ácido sulfúrico, tiempo de contacto, relación sólido-líquido y tamaño de partícula, en la recuperación de xilosa y la formación de subproductos a partir del raquis de palma de aceite con hidrólisis ácida diluida. La máxima concentración de xilosa (32.59 g L^{-1}) se obtuvo a $121 \text{ }^\circ\text{C}$, por 30 min, con una relación sólido-líquido de 1:8, una concentración de ácido de 2% y un tamaño de partícula de 4 cm. Estos mismos parámetros fueron las condiciones optimizadas del proceso.

En el Capítulo 2, se determinó el efecto de diferentes medios de cultivo y de condiciones de fermentación sobre la producción de xilitol, a partir de raquis de palma de aceite, utilizando *C. guilliermondii*. El hidrolizado ácido de raquis de palma suplementado con 4 g L^{-1} extracto de levadura, $3 \text{ g (NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ L}^{-1}$, $0.5 \text{ g MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O L}^{-1}$ y $0.1 \text{ g CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O L}^{-1}$ mostró ser el mejor medio para el crecimiento de la levadura en cultivo sumergido. Las condiciones de fermentación más apropiadas se obtuvieron con hidrolizado de raquis suplementado a pH de 5.5, concentración inicial de xilosa de 17 g L^{-1} y un inóculo de 3 g L^{-1} . El nivel de aireación mostró ser un factor importante en el proceso de fermentación; un volumen de 40 mL de medio en un matraz de 100 mL produjo la mayor concentración de xilitol de 6.7 g L^{-1} ($p < 0.05$). Sin embargo, al realizar fermentaciones sucesivas con esta cepa, su capacidad metabólica para la producción de xilitol se veía afectada drásticamente quizás por el tipo de pase (#4) en el que se encontraba; además, no se contaba con una certificación de la cepa para la producción de xilitol. Por estas razones, en las experimentaciones siguientes se decidió cambiar la cepa a *Candida tropicalis*.

En el Capítulo 3, se evaluó la producción biotecnológica de xilitol usando *C. tropicalis* a partir de hidrolizado de racimos de fruta vacíos de palma de aceite (raquis) detoxificado por el método de carbón activado y overliming; se comparó la producción de xilitol, la xilosa residual y el rendimiento producto/sustrato del mejor pretratamiento con detoxificación frente a un hidrolizado sin detoxificar y se evaluó la producción de biomasa y xilitol en diferentes medios de cultivo como medio sintético de extracto de levadura, peptona, xilosa (YPX), medio-xilosa mínima (MMX) y medio de hidrolizados de raquis sin detoxificar. El uso de carbón activado redujo un 42% la concentración de glucosa, 70% la de ácido acético y 3% la de xilosa. Las mejores condiciones obtenidas para una mayor producción de xilitol (3.5 g L^{-1}) fueron 30 min, pH 2 y una concentración de carbón

activado de 2.5%. En la comparación del pretratamiento sin y con detoxificación con carbón activado, se escogió el método sin detoxificar porque se produjo el mayor rendimiento de producto (0.74 g g^{-1}) y se consumió la mayor cantidad de xilosa durante el proceso de fermentación, además de la economía que representaría a escala industrial. Con respecto a la comparación de diferentes medios de cultivo, el mejor medio sintético para la producción de biomasa fue YPX con 2.52 g L^{-1} a 30 h de fermentación, y el rendimiento de xilitol en medio de hidrolizado de raquis sin detoxificar fue de 0.41 g g^{-1} .

En el Capítulo 4 se optimizaron diferentes condiciones de fermentación a través de la metodología de superficie de respuesta (RSM) en la producción de xilitol con *C. tropicalis* utilizando hidrolizado de raquis de palma no detoxificado. Los parámetros de fermentación optimizados fueron: pH de 6.0, biomasa de 5.42 g L^{-1} , volumen de 26 mL y xilosa inicial de 20 g L^{-1} . A estas condiciones de proceso se obtuvo una predicción de xilitol de 4.3 g L^{-1} y un valor de xilosa residual de 12.6 g L^{-1} . Asimismo, estas condiciones son el punto de partida para realizar el proceso de escalamiento de la producción de xilitol con *C. tropicalis* a escala de fermentador de banco.

En el Capítulo 5 se evaluó el efecto de la velocidad de agitación y el oxígeno disuelto a escala de biorreactor de tanque agitado de 7 L sobre la producción de la enzima xilosa reductasa (XR) mediante *C. tropicalis* durante la bioconversión de la xilosa en hidrolizados de raquis de palma de aceite sin detoxificar. El mayor consumo de xilosa (95.5%) y la máxima producción de xilitol (5.46 g L^{-1}) se presentó bajo condiciones de 30% de oxígeno disuelto y 50 rpm. La máxima actividad XR ($0.646 \text{ U mg}^{-1} \text{ proteína}$) fue obtenida después de 144 h de fermentación a las mismas condiciones mencionadas anteriormente de oxígeno disuelto y velocidad de agitación. En general, el presente trabajo demuestra que la disponibilidad de oxígeno influye en la actividad xilosa reductasa y la producción de xilitol a escala de biorreactor de banco de tanque agitado, utilizando hidrolizados de raquis de palma y *C. tropicalis* con un rendimiento de xilitol ($Y_{P/S}$) de 0.27 g g^{-1} y una productividad volumétrica (Q_P) $0.33 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

En el Capítulo 6 se aplicaron modelos no estructurados para el crecimiento celular, el consumo de xilosa y la producción de xilitol con el fin de predecir la cinética de fermentación con *C. tropicalis* en medio sintético YPX (Extracto de levadura, peptona y xilosa) y en hidrolizado de raquis sin detoxificar a escala de matraz de 100 mL con 40 mL

de medio. Los parámetros cinéticos fueron estimados para los modelos de crecimiento de Monod, Contois y Tessier. Los resultados demostraron que la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{\max}) y el rendimiento celular ($Y_{X/S}$) experimentales se acercaron más a los resultados del modelo de Tessier en medio sintético y al modelo de Contois en hidrolizado de raquis sin detoxificar. Además, los valores de desempeño de las ecuaciones para predecir la fermentación fueron muy similares entre todos los modelos.

Con este estudio, se pretende aprovechar la fracción hemicelulósica del raquis de palma utilizando microorganismos cuyas rutas metabólicas conlleven a la producción de xilitol, metabolito de gran aplicación en la industria farmacéutica y de alimentos. Esta investigación busca generar alternativas para solucionar problemas ambientales actuales que sufre el sector palmicultor del país por medio de la generación de valor agregado de un subproducto del sector que es el raquis de palma de aceite. Además, se pretende establecer unas condiciones adecuadas del proceso fermentativo para la obtención de xilitol con el fin de establecer bases apropiadas para el aprovechamiento biotecnológico del material hemicelulósico del raquis de palma.

Objetivos

1. Objetivo General

Determinar los parámetros óptimos de operación durante la fermentación por lote sumergido de hidrolizados de raquis de palma para la producción de xilitol con diferentes levaduras del género *Candida* sp.

2. Objetivos Específicos

- Establecer las condiciones de concentración de ácido, tiempo de contacto, tamaño de partícula y relación sólido-líquido que optimicen la liberación de xilosa mediante la hidrólisis ácida diluida de raquis de palma de aceite.
- Optimizar las condiciones de proceso de fermentación a escala de matraz agitado para la producción de xilitol.
- Evaluar el efecto de la velocidad de agitación y el oxígeno disuelto a escala de biorreactor sobre la producción de la enzima xilosa reductasa involucrada en el proceso de bioconversión de la xilosa por *Candida* sp.
- Proponer un modelo no estructurado que describa el crecimiento celular y la producción de xilitol por *Candida* sp.

1. Capítulo 1

Recuperación de xilosa de la hidrólisis ácida diluida de racimos de frutas vacías de palma de aceite (*Elaeis guineensis*).

1.1. Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes condiciones de proceso, como la concentración de ácido sulfúrico, el tiempo de contacto, la relación sólido-líquido y el tamaño de partícula, en la recuperación de xilosa y la formación de subproductos del racimo de frutas vacías de palma aceitera (raquis) empleando hidrólisis ácida diluida. Se analizaron xilosa, glucosa, hidroximetilfurfural (HMF) y ácido acético por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se utilizó un diseño Box-Behnken para encontrar la combinación de factores que maximizó la formación de xilosa en el proceso de optimización de hidrolizado. La máxima concentración de xilosa (32.59 g L^{-1}) se obtuvo a $121 \text{ }^\circ\text{C}$, por 30 min, con una relación de 1:8 sólido-líquido, 2% de concentración de ácido y un tamaño de partícula de 4 cm. Con las mismas condiciones, las concentraciones de inhibidores, como HMF, glucosa y ácido acético, fueron 0.023, 1.033 y 11.078 g L^{-1} , respectivamente. Las condiciones de proceso optimizadas fueron las mismas que se describieron previamente.

Palabras claves: Aceite de palma, raquis, xilosa, hidrólisis ácida diluida

1.2. Introducción

La palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) es el cultivo para producir aceite comestible de mayor rendimiento en el mundo. Se cultiva en 42 países, con 11 millones de ha en todo el mundo. Colombia es el mayor productor de aceite de palma en América Latina y el cuarto productor a nivel mundial (Fedepalma 2017). Los racimos de frutas vacías de palma de aceite (raquis) constituyen entre el 21% y 24% del total del peso de la fruta cosechada. La fibra de raquis es uno de los recursos significativos más prometedores de residuos de biomasa y se produce de la extracción de aceite de palma de los racimos con fruta fresca. Esta biomasa es una estructura de celulosa rígida combinada con hemicelulosa amorfa y lignina entrecruzada, y usualmente se quema en incineradores para los molinos del aceite de palma, lo cual crea problemas de polución ambiental en las áreas vecinas (S. Kim and Kim 2013). La biomasa de raquis contiene 42.7% de celulosa, 17.1% de hemicelulosa y 13.2% de lignina (Hassan et al. 2013).

Además, el raquis contiene 24% de xilano, un polímero de azúcar compuesto de xilosa, el cual se puede utilizar como sustrato para la producción de diferentes compuestos mediante procesos químicos y bioquímicos (Rahman et al. 2007). El xilano es el polisacárido más abundante en la hemicelulosa y es más susceptible a la hidrólisis por tratamientos con ácidos suaves debido a su estructura amorfa, comparado con la celulosa, la cual necesita unas condiciones de tratamiento severas debido a su naturaleza cristalina (Shatalov and Pereira 2012). A pesar de que la xilosa es el azúcar principal obtenido de la hemicelulosa, otros subproductos, tales como la glucosa, arabinosa, manosa, compuestos fenólicos, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural, ácido fórmico y ácido levulínico, también se producen en bajas cantidades durante el proceso de hidrólisis (Arruda et al. 2011; Camargo et al. 2015; Carvalheiro et al. 2005; Dominguez et al. 1997; Rahman et al. 2007; Silvio S. Silva et al. 1998)

El ácido acético y el furfural se consideran inhibidores potenciales al metabolismo de la levadura, causando un cambio morfológico celular o muerte definitiva del organismo. Adicionalmente, alta concentración de glucosa puede reprimir la actividad de la xilosa reductasa, la cual se involucra en la conversión de xilosa a xilitol (Mardawati et al. 2015).

Por lo tanto, la concentración de estos subproductos debería mantenerse a un nivel bajo para ejecutar la reacción de hidrólisis en condiciones menos severas. El pretratamiento de la lignocelulosa para obtener azúcares fermentables es un paso esencial para la conversión de dichas fuentes de carbono mediante fermentación microbiana. Una variedad de métodos de pretratamiento se ha utilizado tales como: procesos mecánicos, químicos y biológicos, los cuales se han utilizado para cambiar la composición química y estructural de la lignocelulosa y mejorar los rendimientos de azúcares liberados (M. L. Carvalho et al. 2013; Duangwang and Sangwichien 2013; Liu and Wang 2016).

Entre estos métodos, el pretratamiento de hidrólisis ácida se puede efectuar con ácido concentrado o diluido, pero el uso de ácidos concentrados es menos deseable porque se forman compuestos inhibidores en mayor proporción. Por otra parte, los métodos de pretratamiento con ácido concentrado generan más problemas por corrosión de los equipos y la dificultad para la recuperación del ácido (Rocha et al. 2014). Se ha recomendado emplear una concentración de ácido de alrededor de 1% (peso/volumen) para los rendimientos óptimos de xilosa (Zhanga et al. 2012). La hidrólisis ácida diluida es probablemente el método más comúnmente aplicado y más frecuentemente investigado entre los métodos de pretratamiento químico que se utilizan. Los objetivos principales de la etapa de pretratamiento de hidrólisis ácida son solubilizar la fracción de hemicelulosa de la biomasa e incrementar la accesibilidad de la celulosa a las enzimas (Rocha et al. 2014; Zhanga et al. 2012).

El proceso de hidrólisis ácida diluida usualmente emplea ácido sulfúrico y ácido clorhídrico en concentraciones de 1 a 10% y una temperatura moderada (en un rango de 100 a 150°C) y produce una fracción acuosa que contiene principalmente azúcares hemicelulósicos (Lenihan et al. 2010). Estos azúcares consisten en monosacáridos (xilosa, glucosa y arabinosa) y xilo-oligosacáridos (Alfaro et al. 2009; Yáñez, Garrote, and Díaz 2009), los cuales pueden fermentarse para obtener varios productos como el xilitol (Ferrer et al., 2013). El xilitol, un alcohol de azúcar de cinco carbonos de origen natural, tiene aplicaciones en la industria farmacéutica, alimenticia y odontológica debido a su alto poder edulcorante similar a la sacarosa, pero con menos calorías. Sin embargo, los procesos comerciales actuales de producción de xilitol requieren condiciones de alta presión (por encima de 50 atm), así como un catalizador tóxico como el níquel,

generando un costo elevado y un efecto negativo en el medio ambiente (Hong et al. 2016).

Se ha propuesto la alternativa de producción biotecnológica de xilitol a partir de hidrolizados hemicelulósicos y subproductos industriales, ya que el proceso es relativamente fácil y el costo de producción es más barato comparado con los métodos químicos. Los rendimientos de xilitol corresponden a solo el 50 a 60% del xilano presente en la materia prima. Entre los microorganismos que pueden asimilar xilosa y son los mejores productores de xilitol son las levaduras pertenecientes al género *Candida sp.* (Miura et al. 2015).

En general, para producir compuestos de valor agregado como etanol, xilitol u otros metabolitos, las células deben enfrentarse a diferentes condiciones en procesos los industriales como alta concentración de productos inhibitorios, problemas osmóticos, altas temperaturas de proceso y condiciones de crecimiento que no están bien controladas (Tomás-Pejó et al. 2010). Para la hidrólisis de los raquis de palma se han estudiado diferentes condiciones con el fin de obtener la mayor cantidad de xilosa. (Rahman, Choudhury, and Ahmad 2006) encontraron como condiciones óptimas de hidrólisis a 120°C, usando el material con un tamaño de partícula menor a 1 mm, empleando ácido sulfúrico al 6% durante 15 min. Además Rahman et al. (2007) muestran que es posible obtener xilosa del raquis a 115°C, 60 min y ácido sulfúrico al 4%, empleando tamaños de partícula menores a 1 mm y una relación sólido-líquido de 1:8. (Llano, Gómez, and Santamaría 2009), señalan que la mayor cantidad de xilosa obtenida mediante tratamientos de hidrólisis ácida a los raquis de palma africana se realiza a 122°C durante 30 min con ácido sulfúrico al 2%, tamaño de partícula de 1.4 cm y una carga de sólidos del 25 %. Vélez Uribe (2012) efectuó hidrólisis ácida diluida del raquis de palma de aceite para obtener xilitol con una solución de ácido sulfúrico al 2%, una relación sólido-líquido de 1:4 a 121°C durante 30 min.

Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la concentración de ácido sulfúrico (2, 4 y 6% (p/v)), tiempo de contacto (20, 30 y 40 min), relación sólido-líquido (1:8, 1:10 y 1:12) y tamaño de partícula (0.5, 3 y 4 cm) en la liberación de xilosa y la formación de subproductos (glucosa, ácido acético e hidroximetilfurfural (HMF) a partir de la hidrólisis ácida diluida de raquis de palma de aceite. Se empleó un diseño de Box-

Behnken para encontrar la combinación de factores que maximizaran la liberación de xilosa en el hidrolizado y para evaluar la influencia de estos tratamientos en la morfología y microestructura de raquis y futuro uso del hidrolizado rico en xilosa para la producción de xilitol.

1.3. Materiales y métodos

1.3.1. Materia Prima

El raquis (20 kg) se recolectaron en agosto de 2015 de la empresa Palmares del Oriente S.A.S., una planta de beneficio de palma de aceite localizada en Villanueva, Casanare, Colombia. El raquis fue desinfectado, secado en estufa a 60°C por 24 h y molido por medio de un molino de cuchillas. El raquis molido se clasificó utilizando un Ro-Tap (Model B, W.S. Tyler Inc., Gastonia, NC, USA), resultando en la separación de diferentes tamaños de partículas, entre 0.05 y 4 cm, se utilizaron tamices de 2000 a 250 mm que corresponden a las mallas 10 y 60, respectivamente. El raquis molido y clasificado se empaco en bolsas de polietileno y se almacenó a 30°C y 60% de humedad relativa. Los contenidos de humedad, ceniza, celulosa, hemicelulosa y lignina del raquis seco se determinaron de acuerdo a los protocolos del National Renewable Energy Laboratory, NREL/TP 510-42621, NREL/TP 510-42622 y NREL/TP 510-42618, respectivamente (Sluiter et al. 2005, 2008).

1.3.2. Hidrólisis ácida diluida de raquis

La hidrólisis ácida diluida del raquis de palma de aceite se llevó a cabo en Erlenmeyer de 125 ml a 121 °C por 20, 30 y 40 min, con una relación de sólido-líquido de 1:8, 1:10 y 1:12, una solución acuosa de H₂SO₄ de 2, 4 y 6% (p/v) y un tamaño de partícula de 0.05, 3 and 4 cm. Después del proceso de hidrólisis, los Erlenmeyer se sumergieron rápidamente en un baño de hielo para detener la reacción. Los sólidos se separaron de la

solución acuosa a través de filtración. El hidrolizado se analizó para determinar xilosa, glucosa, ácido acético y HMF (Roberto, Mussatto, and Rodrigues 2003).

1.4. Diseño experimental

La metodología de superficie de respuesta (RSM) se utilizó para optimizar el proceso de hidrólisis. Los aspectos teóricos básicos, los supuestos fundamentales y las implicaciones experimentales de la RSM se encuentran en la literatura (Meyers, Montgomery, and Anderson-Cook 2009). Se utilizó un diseño basado en Box-Behnken con 30 corridas y seis repeticiones del punto central. Las variables independientes fueron concentración de ácido sulfúrico (2, 4 y 6% (p/v)), tiempo de contacto (20, 30 y 40 min), relación sólido-líquido (1:8; 1:10 y 1:12), y tamaño de partícula (0.05, 3, y 4 cm). Se tomaron como variables dependientes la concentración de xilosa, glucosa, ácido acético y HMF; obtenidos durante la hidrólisis ácida diluida de raquis de palma. Por cada una de las variables dependientes, se ajustó una ecuación de un modelo completo de segundo orden (Ecuación 1).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i (X_i) + \sum_{i=1}^4 \beta_{4+i} (X_i^2) + \sum_{i=1}^4 \sum_{i'>i}^4 \beta_{6+i+i'} (X_i X_{i'}), \quad i = 1,2,3,4$$

(1)

Donde representa el valor esperado de la variable de respuesta (concentraciones de xilosa, glucosa, ácido acético y HMF), representan los coeficientes estimados del modelo, y X1, X2, X3 y X4 son las variables independientes (concentración de ácido, tiempo de contacto, relación sólido-líquido y tamaño de partícula). El análisis de regresión se realizó usando el software R (Lenth 2009).

1.4.1. Métodos analíticos

Concentración de azúcares e inhibidores: La xilosa, glucosa y HMF en el hidrolizado ácido fueron analizados mediante HPLC (Shimadzu Prominence 20A, Kyoto, Japon), utilizando una columna Aminex HPX- 87H (Biorad) y un detector infrarrojo. Como fase móvil se empleó H_2SO_4 acuoso (0.005 M) con una velocidad de flujo de 0.6 mL min^{-1} . La temperatura del horno se mantuvo a 65°C . El volumen de inyección fue de $20 \mu\text{L}$, con un método isocrático (Piñeros-Castro et al. 2011). Además, el ácido acético se determinó utilizando el mismo HPLC y columna, pero con un detector UV y a temperatura ambiente. La longitud de onda de detección de este ácido se estableció a 203 nm . D(+)-xilosa (142080.1208, Pancreac, Química SAU, España), D(+)-glucosa anhidra (141341.1211, Pancreac, USA), 5-hidroximetil-2-furaldehído (CAS 67.47.0, Sigma-Aldrich, USA) y ácido acético glacial (CAS 64.19.7, Scharlab S.L., Spain) se usaron como estándares internos (EI). La cuantificación se realizó midiendo la relación entre el área del pico de la muestra y la de los EI. Las soluciones primarias estándar de xilosa, glucosa, ácido acético, y HMF se prepararon en H_2SO_4 acuoso a una concentración de 0.005 M.

Los cambios morfológicos del raquis durante las hidrólisis se analizaron con microscopía electrónica de barrido (SEM): Se evaluaron la morfología y los cambios en la estructura física del raquis no tratado y tratado, con hidrólisis ácida diluida en ácido sulfúrico a concentraciones de 2, 4 y 6 % por 30 min a 121°C con un SEM (Jeol JSM 5910LV XL, Jeol Ltd., Tokio, Japón), operando a 15 kV y 29 Pa. Las muestras se secaron a 60°C por 24 h y se cubrieron con 20 nm de oro y paladio (Hassan et al. 2013).

1.5. Resultados y discusión

1.5.1. Composición del raquis

Los contenidos de celulosa y hemicelulosa del raquis fueron $45.36 \pm 0.5\%$ y $28.83 \pm 0.5\%$, respectivamente, lo cual hace que el raquis de palma de aceite sea una materia prima adecuada para la producción de azúcares fermentables. Otros compuestos, tal como lignina insoluble ($21.87 \pm 0.9\%$), lignina soluble ($4.9 \pm 0.2\%$), cenizas ($1.90 \pm 0.4\%$), extractos

en agua ($3.80 \pm 1.1\%$), extractos en etanol ($10.01 \pm 1.0\%$) y humedad ($6.46 \pm 0.1\%$), fueron similares a los reportados en la literatura (Ferrer et al. 2013; Hamzah, Idris, and Shuan 2011; Palamae et al. 2014). Sin embargo, las diferencias vistas en la composición del raquis en comparación con otros estudios se podrían deber al grado de madurez de los racimos de fruta fresca, las regiones geográficas y las condiciones del suelo (Hazir, Shariff, and Amiruddin 2012).

1.5.2. Hidrólisis ácida diluida del raquis

Azúcares, como xilosa y glucosa, fueron liberados durante la hidrólisis ácida diluida, de acuerdo con las condiciones experimentales como se muestra en la Tabla 1-1. La máxima concentración de xilosa (32.59 g L^{-1}) fue liberada cuando la reacción se llevó a cabo a 121°C por 30 min manteniendo una concentración ácida a 4%, una relación sólido-líquido de 1:8 y un tamaño de partícula de 4 cm. Bajo las mismas condiciones, las concentraciones de inhibidores, tal como HMF, glucosa y ácido acético, fueron de 0.023, 1.033 y 11.078 g L^{-1} , respectivamente. La hidrólisis a altas temperaturas en condiciones ácidas conduce a la formación y liberación de ácido acético. La máxima concentración de ácido acético (11.078 g L^{-1}) se observó a estas condiciones. Por otro lado, la mayor liberación de glucosa (1.80 g L^{-1}) y la máxima concentración de HMF (0.038 g L^{-1}) fueron obtenidas a 121°C por 30 min, manteniendo una concentración de ácido en 4%, una relación de sólido-líquido de 1:8 y un tamaño de partícula de 0.05 cm.

Tabla 1-1: El diseño de Box-Behnken (BBD) aplicado a la hidrólisis ácida diluida de raquis de palma y las correspondientes respuestas experimentales utilizadas para el modelado RSM

CORRIDA	VALORES CODIFICADOS*				RESPUESTAS**			
	X1	X2	X3	X4	Y1	Y2	Y3	Y4
1	0	0	1	1	32.59	1.03	11.08	0.023
2	0	1	-1	0.5	19.83	0.55	6.18	0.011
3	-1	0	0	1	27.81	0.67	9.79	0.014
4	-1	0	1	0.5	30.16	0.97	9.68	0.020

5	1	0	0	1	23.78	0.97	9.80	0.026
6	1	1	0	0.5	24.88	1.04	10.36	0.023
7	0	0	0	0.5	26.43	1.03	8.68	0.031
8	0	0	0	0.5	27.38	1.03	8.27	0.031
9	1	-1	0	0.5	24.45	0.95	6.73	0.013
10	0	1	1	0.5	27.98	0.75	9.23	0.013
11	1	0	0	-1	23.32	1.67	8.23	0.035
12	-1	0	-1	0.5	22.65	0.53	7.68	0.024
13	-1	-1	0	0.5	24.17	0.53	6.89	0.004
14	1	0	1	0.5	29.09	1.47	10.48	0.033
15	1	0	-1	0.5	26.26	1.36	9.94	0.028
16	0	-1	0	-1	19.81	0.79	6.10	0.013
17	0	-1	-1	0.5	20.03	0.55	5.92	0.008
18	0	0	0	0.5	27.95	1.03	7.92	0.019
19	0	0	0	0.5	24.81	1.28	8.17	0.025
20	-1	1	0	0.5	25.75	0.51	8.47	0.003
21	0	0	1	-1	31.60	1.80	9.09	0.038
22	0	0	-1	1	22.76	0.69	7.86	0.021
23	0	0	-1	-1	22.67	0.91	7.01	0.015
24	0	-1	0	1	21.81	0.43	7.10	0.006
25	0	-1	1	0.5	29.40	0.79	8.60	0.015
26	-1	0	0	-1	22.03	1.19	7.16	0.022
27	0	0	0	0.5	25.27	0.90	8.10	0.015
28	0	1	0	1	23.25	0.53	6.81	0.010
29	0	0	0	0.5	25.86	0.93	8.78	0.023
30	0	1	0	-1	20.84	0.98	6.65	0.020

*X1: concentración de ácido, X2: tiempo de contacto, X3: relación sólido-líquido y X4: tamaño de partícula.

**Y1: xilosa (g.L⁻¹), Y2: glucosa (g.L⁻¹), Y3: ácido acético (g.L⁻¹) y Y4: hidroximetilfurfural (g.L⁻¹)

El raquis se ha utilizado para producir xilosa empleando hidrólisis ácida diluida, con las siguientes condiciones óptimas: relación sólido-líquido 1:10 y concentración de ácido sulfúrico entre 0.25 a 0.5% (p/v). A medida que la relación sólido-líquido se incrementó, la recuperación de xilosa fue máxima a temperaturas entre 140 a 160°C (Zhanga et al. 2012). Rahman et al. (2007) reportaron que la máxima concentración de xilosa (30.81 g L⁻¹) se observó cuando la reacción se realizó a 115°C por 60 min con una concentración ácida de 4% y un tamaño de partícula menor a 1 mm. Esta concentración de xilosa fue

similar a los datos de este estudio, pero con diferente tiempo de contacto (30 min) y tamaño de partícula (3 cm). Cabe resaltar que rendimientos de xilosa similares se obtuvieron con un tamaño de partícula de 3 cm, el cual es mucho más alto que el utilizado en la literatura (menos de 1 mm). Asimismo, cuando el tamaño de partícula se redujo a más de 1 mm, el rendimiento de xilosa disminuyó y la mayor producción de xilosa se obtuvo con un tamaño de partícula de 2 mm (Zhanga et al. 2012). En este estudio, una alta concentración de xilosa se produjo en el hidrolizado de raquis, con tamaños de partículas grandes y una baja concentración de glucosa. Un tamaño de partícula grande e hidrólisis ácida diluida probablemente no fueron capaces de reducir la cristalinidad de la celulosa, y la concentración de glucosa en el medio fue menor que con tamaños más pequeños de la fibra (Goh et al. 2016).

Adicionalmente, el HMF, como un compuesto inhibidor producido exclusivamente con ácido acético mediante la deshidratación de las hexosas, dificulta el crecimiento de microorganismos en la fermentación. Algunos estudios han demostrado que los hidrolizados lignocelulósicos que contienen más de 1 g L⁻¹ de furfural o HMF tienen un efecto inhibitorio significativo sobre la fermentación de xilosa utilizando *Candida tropicalis* (Huang et al. 2011). Bajo este criterio, la formación de HMF durante la hidrólisis ácida diluida de raquis podría ignorarse porque tenía concentraciones relativamente bajas, según los datos máximos de este estudio (0.038 g L⁻¹). Chiesa y Gnansounou (2014) informaron una concentración de ácido acético (1.53 g L⁻¹) cuando la hidrólisis se llevó a cabo a 161.5°C, 9.44 min y 1.51% de concentración con ácido sulfúrico. Sin embargo, la severidad de este compuesto no fue particularmente evidente. Este ácido es probablemente de menor importancia con respecto a la posible inhibición metabólica de los microorganismos. De hecho, se ha encontrado que concentraciones hasta 10 g L⁻¹ no afectan el proceso de fermentación (Mussatto and Roberto 2004). Teniendo en cuenta estos resultados, los procedimientos de detoxificación deberían evitarse en las condiciones de este estudio. La estimación del rendimiento de xilosa sobre las variables independientes X1, X2, X3 y X4 en términos de las superficies de respuesta se muestra en la Figura 1-1. La condición óptima para la liberación de xilosa del raquis se estableció con un modelo polinomial de segundo orden (Tabla 1-2), el cual se ajustó a los datos experimentales y los coeficientes de regresión se calcularon con análisis de regresión múltiple ($p < 0.05$).

El modelo mostró la relación de los diferentes parámetros en la recuperación de xilosa del raquis, donde el tamaño de partícula de las muestras (4 cm) fue más alto que el reportado en estudios similares con este material (Duangwang and Sangwichien 2013; Hassan et al. 2013). La máxima concentración de xilosa de 32.59 g L⁻¹ se puede obtener al realizar un experimento de hidrólisis con un tiempo de reacción de 30 min, una concentración de ácido del 2%, una relación sólido-líquido de 1:8 y un tamaño de partícula de 4 cm, a una temperatura de reacción de 121°C (Figura 1-1).

Tabla 1-2: Coeficientes de la ecuación de regresión y coeficiente de correlación (R2) de los modelos de superficie de respuesta para la producción de xilosa, glucosa, ácido acético y HMF a partir de la hidrólisis ácida diluida de raquis

Variables e interacciones*	Coeficientes de regresión estimados			
	Xilosa	Glucosa	Ácido Acético	HMF
β_0	-8.385	-5.224	4.886	-0.134
X_1	3.857	0.170 [†]	-1.099 [†]	-0.006 [†]
X_2	1.886	0.227	0.640	0.008
X_3	-301.881 [†]	26.198 [†]	-165.953 [†]	0.203 [†]
X_4	3.235	0.491 [†]	-0.039 [†]	0.018 [†]
X_1X_1	0.007	0.015	0.197 [†]	0.000
X_1X_2	-0.014	0.001	0.002	0.000
X_1X_3	-28.052	-1.922	-8.789	0.050
X_1X_4	-0.222	-0.003	-0.033	-0.000
X_2X_2	-0.027 [†]	-0.003 [†]	-0.012 [†]	-0.000 [†]
X_2X_3	-1.45919	-0.045	0.452	0.006
X_2X_4	-0.003	-0.001	0.000	-0.000

X_3X_3	3138.79	14.156	1109.69	1.488
X_3X_4	-3.580	-4.156 [†]	3.975	-0.144 [†]
X_4X_4	-0.337	-0.028	0.020	-0.000
R^2 (%)	85.5	93.8	84.9	88.7

*X1: concentración de ácido; X2: tiempo de contacto; X3 : relación sólido:líquido; X4 :tamaños de partícula, β_0 es el intercepto del modelo cuadrático

†Significante a $P < 0.05$

El análisis de regresión mostró que la producción de xilosa, ácido acético, glucosa y HMF se vio influenciada significativamente por el efecto lineal de la relación sólido-líquido, negativamente para los primeros dos compuestos y positivamente para los últimos dos compuestos, respectivamente, y por el efecto negativo cuadrático del tiempo de contacto (Tabla 1-2). Además, la glucosa, el ácido acético y el HMF se afectaron linealmente por las variaciones en la concentración del ácido y el tamaño de partícula. La producción de glucosa y HMF se vio afectada negativamente por la interacción entre la relación sólido-líquido y el tamaño de partícula. En el caso de los coeficientes de correlación de la ecuación polinomial, los valores de R^2 fueron superiores al 85%, lo que indicó una buena concordancia entre los datos experimentales y el modelo. Así, la respuesta podría ser suficientemente explicada por el modelo.

La Figura 1-2 muestra los gráficos de superficie de respuesta 3D construidos sobre la base de la Tabla 1-2. Con respecto al proceso de hidrólisis de raquis, se produjeron glucosa, ácido acético y HMF, pero la baja concentración de estos compuestos no afectaría la posible producción de metabolitos por fermentación con microorganismos. Las gráficas de superficie de respuesta 3D representan un modelo cuadrático, que explica el comportamiento de los inhibidores, como la glucosa, el ácido acético y el HMF, con coeficientes de determinación (R^2) cercanos a 0.93, 0.85 y 0.88, respectivamente. La producción de xilosa, teniendo en cuenta variables como el tamaño de partícula, la relación sólido-líquido, la concentración de ácido sulfúrico y el tiempo de contacto durante el proceso de hidrólisis, se muestra en la Figura 1-1.

Los efectos de la relación sólido-líquido y el tiempo de contacto fueron los factores más importantes para la xilosa liberada. Por otra parte, la máxima concentración de xilosa se alcanzó con tiempos de contacto cercanos a 30 min y concentraciones de ácido sulfúrico al 2% según el modelo, donde R^2 fue de 0.85, lo que explica el 85% de la variabilidad en la respuesta de xilosa. Estos valores son similares a otros estudios, donde se evaluó la hidrólisis ácida de la fibra de raquis para la producción de xilosa utilizando RSM y un R^2 de aproximadamente 0.83 (Rahman et al. 2007).

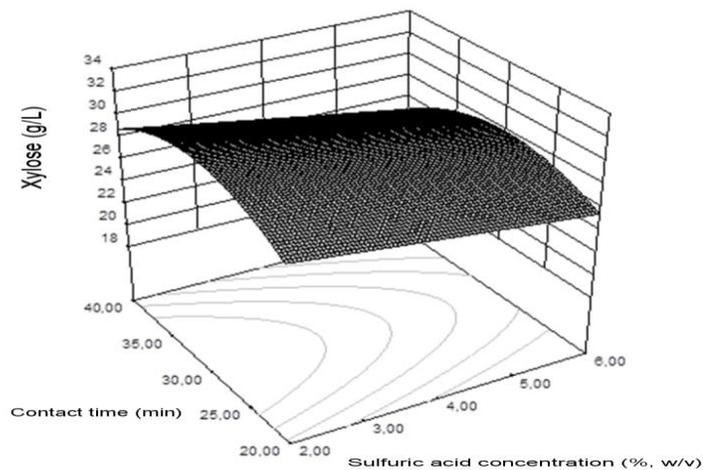


Figura 1-1: Producción de xilosa en función de la concentración de ácido (%) y tiempo de contacto (*Relación sólido-líquido 1:8, tamaño partícula 4 cm*)

Al aplicar el método de la función de deseabilidad, se obtuvieron 29 soluciones para los criterios óptimos, con un valor de deseabilidad en el rango de 0.8 a 0.9 (resultados no mostrados). Los criterios para esta optimización fueron la máxima concentración de xilosa, la mínima concentración de glucosa, HMF y ácido acético en el rango de prueba. Todas las condiciones de las funciones de deseabilidad fueron cercanas entre sí, por ejemplo, la concentración de ácido sulfúrico varió entre 2 a 2.2%, el tiempo de contacto estuvo en el rango de 30 a 37.5 min, la relación sólido-líquido fue de 1:8, y el tamaño de partícula fue de alrededor de 4 cm. En estas circunstancias, se seleccionó la solución que tenía los valores más altos de concentración de xilosa. Por lo tanto, las condiciones de proceso óptimas con un valor de deseabilidad de 0.9 fueron una relación sólido-líquido de 1: 8, una concentración de ácido del 2% y un tamaño de partícula de 4 cm, a 121 °C

durante 30 min. En este punto, las concentraciones de xilosa, glucosa, HMF y ácido acético se calcularon en 32.597, 0.769, 0.012 y 11.065 g L⁻¹, respectivamente.

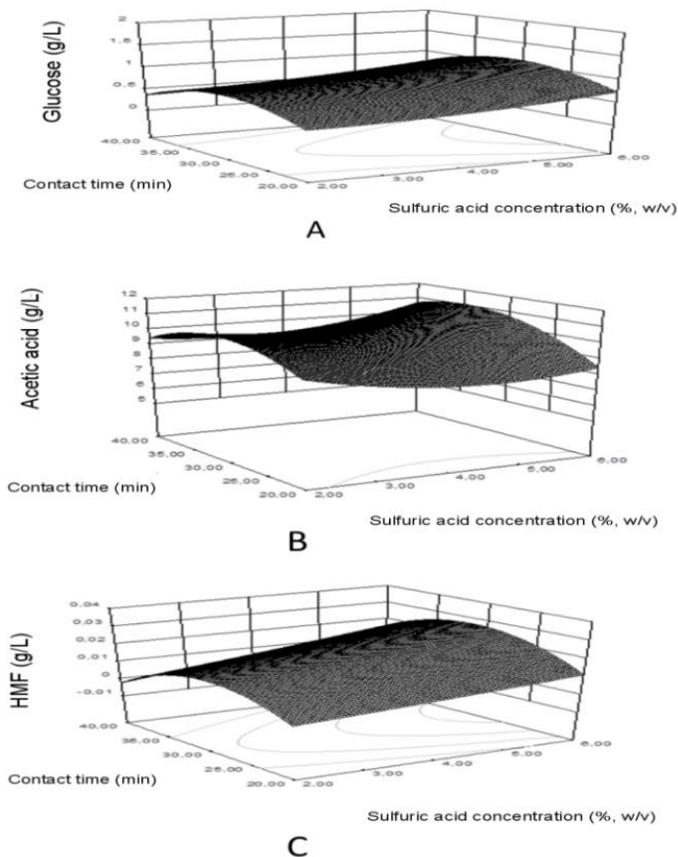


Figura 1-2: Producción de glucosa (A), ácido acético (B) y HMF (C) en función de la concentración de ácido (%) y el tiempo de contacto (min). (*Relación solido-liquido 1:8, tamaño partícula 4 cm*)

1.5.3. Cambios morfológicos del raquis

Las micrografías de las superficies de raquis examinadas bajo SEM se muestran en la Figura 1-3. Las imágenes G y H mostraron la presencia de cuerpos de sílice, formados por minerales del suelo que se mueven hacia las cavidades sedimentarias entre y dentro de las paredes celulares durante el crecimiento de la planta. Estas estructuras se han encontrado en gran número en raquis (Hassan et al. 2013). Los cráteres circulares están

completamente llenos con un cuerpo sólido de sílice transparente que es dióxido de silicio (SiO_2) (Ilvessalo-Pfäffli 1995).

Un componente, como la lignina, es una barrera física para cualquier biomasa de lignocelulosa. La presencia de cuerpos de sílice en la superficie del raquis es una resistencia adicional y aumenta la capa protectora de la fibra, que obstruye la penetración de sustancias químicas en la matriz de hemicelulosa y celulosa (Yunus et al. 2010). La hidrólisis ácida diluida pudo penetrar la lignina sin otros tratamientos previos y fue capaz de eliminar los cuerpos de sílice. La presencia de cavidades sedimentarias vacías reveló perforaciones, que se muestran en las imágenes E y F, cuando las fibras se trataron con ácido sulfúrico al 4%. Sin embargo, se logró el mismo efecto con concentraciones de ácido de 2 y 6%, donde se eliminaron los cuerpos de sílice, se observó una ruptura de las fibras de raquis y se dañaron muchas de las superficies de las fibras. La hidrólisis ácida con ácido sulfúrico al 2% y un tamaño de partícula de 4 cm se seleccionaron como la mejor condición de optimización para la producción de xilosa a partir de raquis (imágenes A, B, C y D). Este tratamiento tenía fibras con una superficie homogénea y sin cuerpos de sílice.

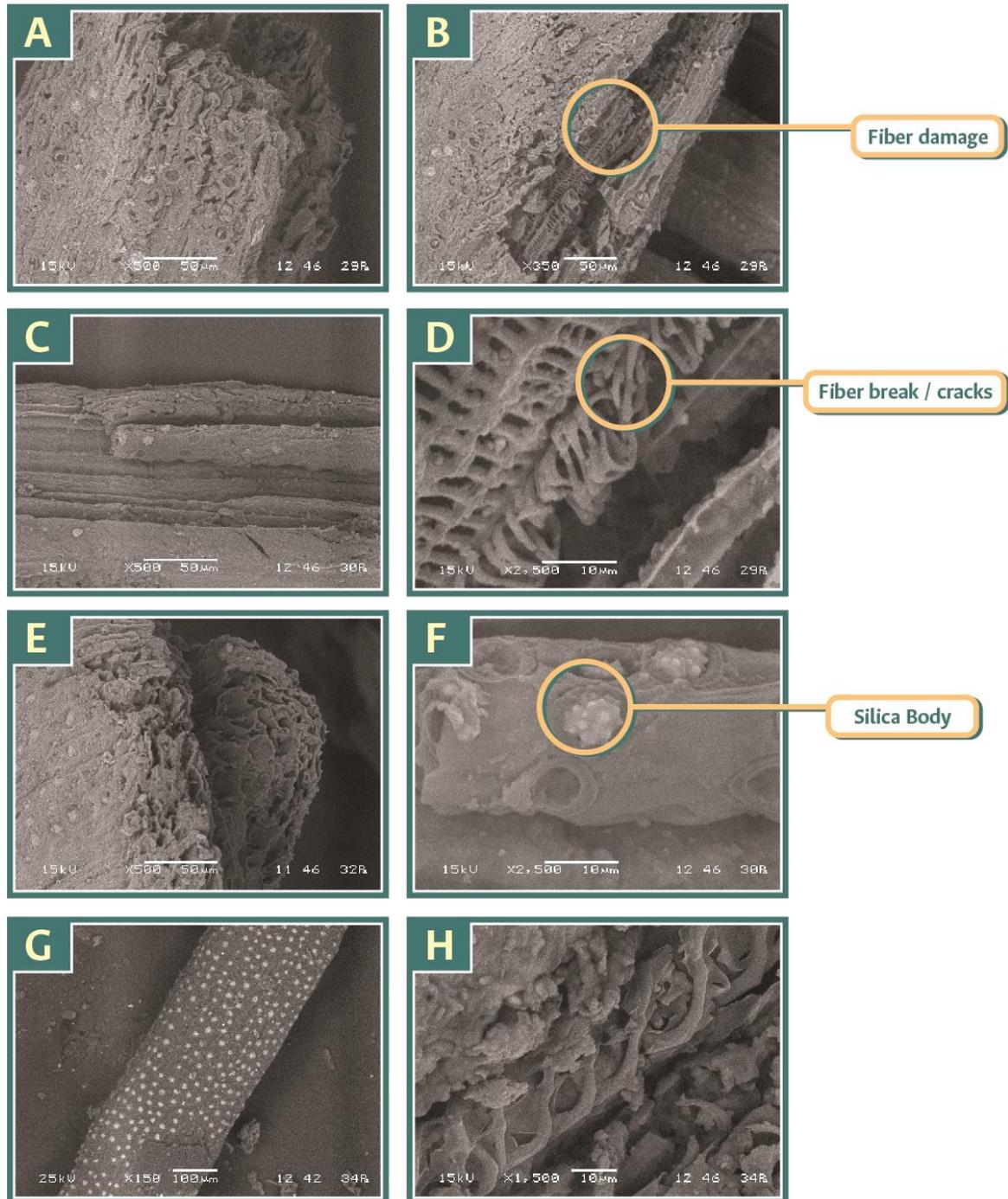


Figura 1-3: Imágenes SEM del raquis tratado previamente con 2% de ácido sulfúrico + tamaño de partícula de 3 cm (A y B); raquis pretratado con 6% de ácido sulfúrico + 3 cm de tamaño de partícula (C y D) y raquis pretratado con 4% de ácido sulfúrico + 3 cm de

tamaño de partícula (E y F). Imágenes del raquis no tratado (G y H) con aumentos de 150X, 500x, 1500x y 2500x.

1.6. Conclusiones

La hidrólisis de las fibras de raquis catalizadas por ácido sulfúrico diluido se optimizó utilizando un diseño Box-Behnken. La combinación de las condiciones de operación a 121°C, durante 30 min, con una relación de sólido-líquido 1:8, concentración de ácido del 2% y tamaño de partícula de 4 cm fue efectiva en términos de concentración máxima de xilosa (32.597 g L⁻¹) y mínima de glucosa (0.769 g L⁻¹), según el modelo de predicción. En estas condiciones optimizadas, las concentraciones de HMF y ácido acético fueron 0.012 y 11.065 g L⁻¹, respectivamente. Sin embargo, cuando la hidrólisis tiene lugar a temperaturas más altas y mayores concentraciones de ácido, la presencia de inhibidores aumenta lo que puede afectar los microorganismos durante el proceso de fermentación de los azúcares liberados.

Referencias

- Alfaro, A. et al. 2009. "Integral Valorization of Two Legumes by Autohydrolysis and Organosolv Delignification." *Bioresource Technology* 100(1): 440–45.
- Arruda, Priscila Vaz de, Rita de Cássia Lacerda Brambilla Rodrigues, Débora Danielle Virgínio da Silva, and Maria das Graças de Almeida Felipe. 2011. "Evaluation of Hexose and Pentose in Pre-Cultivation of *Candida Guilliermondii* on the Key Enzymes for Xylitol Production in Sugarcane Hemicellulosic Hydrolysate." *Biodegradation* 22(4): 815–22.
- Camargo, Danielle, Luciane Sene, Daniela Inês Loreto Saraiva Variz, and Maria das Graças de Almeida Felipe. 2015. "Xylitol Bioproduction in Hemicellulosic Hydrolysate Obtained from Sorghum Forage Biomass." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 175(8): 3628–42.
- Carvalho, F. et al. 2005. "Evaluation of the Detoxification of Brewery's Spent Grain Hydrolysate for Xylitol Production by *Debaryomyces Hansenii* CCMI 941." *Process Biochemistry* 40(3–4): 1215–23.
- Carvalho, M. L. et al. 2013. "Kinetic Study of the Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse." *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 30(3): 437–47.

-
- Chiesa, S., and E. Gnansounou. 2014. "Use of Empty Fruit Bunches from the Oil Palm for Bioethanol Production: A Thorough Comparison between Dilute Acid and Dilute Alkali Pretreatment." *Bioresource Technology* 159: 355–64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.122>.
- Dominguez, Jose M., Ningjun Cao, C. S. Gong, and G. T. Tsao. 1997. "Dilute Acid Hemicellulose Hydrolysates from Corn Cobs for Xylitol Production by Yeast." *Bioresource Technology* 61(1): 85–90.
- Duangwang, S., and C. Sangwichien. 2013. "Optimization Studies on Acid Hydrolysis of Pretreated Oil Palm Empty Fruit Bunch for Production of Xylose by Application of Response Surface Methodology." *Advanced Materials Research* 699: 77–82.
- Fedepalma. 2017. "Boletín El Palmicultor." *Núm. 550 Diciembre* (552). <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmicultor/issue/view/1353>.
- Ferrer, Ana, Ana Requejo, Alejandro Rodríguez, and Luis Jiménez. 2013. "Influence of Temperature, Time, Liquid/Solid Ratio and Sulfuric Acid Concentration on the Hydrolysis of Palm Empty Fruit Bunches." *Bioresource Technology* 129: 506–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.081>.
- Goh, Kar Yin et al. 2016. "Individualization of Microfibrillated Celluloses from Oil Palm Empty Fruit Bunch: Comparative Studies between Acid Hydrolysis and Ammonium Persulfate Oxidation." *Cellulose* 23(1): 379–90.
- Hamzah, Fazlena, Ani Idris, and Tan Khai Shuan. 2011. "Preliminary Study on Enzymatic Hydrolysis of Treated Oil Palm (Elaeis) Empty Fruit Bunches Fibre (EFB) by Using Combination of Cellulase and β 1-4 Glucosidase." *Biomass and Bioenergy* 35(3): 1055–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.11.020>.
- Hassan, Osman et al. 2013. "Optimization of Pretreatments for the Hydrolysis of Oil Palm Empty Fruit Bunch Fiber (EFBF) Using Enzyme Mixtures." *Biomass and Bioenergy* 56(0): 137–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.04.021>.
- Hazir, Mohd Hafiz Mohd, Abdul Rashid Mohamed Shariff, and Mohd Din Amiruddin. 2012. "Determination of Oil Palm Fresh Fruit Bunch Ripeness-Based on Flavonoids and Anthocyanin Content." *Industrial Crops and Products* 36(1): 466–75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.10.020>.
- Hong, Eunsoo et al. 2016. "Optimization of Dilute Sulfuric Acid Pretreatment of Corn Stover for Enhanced Xylose Recovery and Xylitol Production." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 21(5): 612–19.
- Huang, Chiung Fang, Yi Feng Jiang, Gia Luen Guo, and Wen Song Hwang. 2011. "Development of a Yeast Strain for Xylitol Production without Hydrolysate Detoxification as Part of the Integration of Co-Product Generation within the Lignocellulosic Ethanol Process." *Bioresource Technology* 102(3): 3322–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.111>.
- Ilvessalo-Pfäffli, Marja-Sisko. 1995. *Fiber Atlas: Identification of Papermaking Fibers*. Springer Berlin Heidelberg.

- Kim, Seonghun, and Chul Ho Kim. 2013. "Bioethanol Production Using the Sequential Acid/Alkali-Pretreated Empty Palm Fruit Bunch Fiber." *Renewable Energy* 54: 150–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2012.08.032>.
- Lenihan, P. et al. 2010. "Dilute Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass." *Chemical Engineering Journal* 156(2): 395–403.
- Lenth, R. 2009. "Response-Surface Methods in R, Using RSM." *Journal of Statistical Software* 32(7): 1–17. <https://sci-hub.se/ftp://cran.wu-wien.ac.at/pub/R/web/packages/rsm/vignettes/rsm.pdf> (September 23, 2019).
- Liu, Shanshan, and Qiang Wang. 2016. "Response Surface Optimization of Enzymatic Hydrolysis Process of Wet Oxidation Pretreated Wood Pulp Waste." *Cellulose Chemistry and Technology* 50(7–8): 803–9.
- Llano, J.R., N.A. Gómez, and M. Santamaría. 2009. "Recuperación de Xilosa a Partir de Material Lignocelulósico Procedente de La Extracción de Aceite de Palma." In *IV Simposio Sobre Biofábricas*.
- Mardawati, Efri et al. 2015. "Microbial Production of Xylitol from Oil Palm Empty Fruit Bunches Hydrolysate: The Effect of Glucose Concentration." *Journal of the Japan Institute of Energy* 94(8): 769–74.
- Meyers, Raymon H., Douglas C. Montgomery, and Christine M. Anderson-Cook. 2009. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. Wiley.
- Miura, Masahiro et al. 2015. "Bioconversion of Birch Wood Hemicellulose Hydrolyzate to Xylitol." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 176(3): 947–55.
- Mussatto, S, and I Roberto. 2004. "Alternatives for Detoxification of Diluted-Acid Lignocellulosic Hydrolyzates for Use in Fermentative Processes: A Review." *Bioresource Technology* 93(1): 1–10.
- Palamae, Suriya, Wilawan Palachum, Yusuf Chisti, and Wanna Choorit. 2014. "Retention of Hemicellulose during Delignification of Oil Palm Empty Fruit Bunch (EFB) Fiber with Peracetic Acid and Alkaline Peroxide." *Biomass and Bioenergy* 66: 240–48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.03.045>.
- Piñeros-Castro, Yineth et al. 2011. "Producción de Azúcares Fermentables Por Hidrólisis Enzimática de Cascarilla de Arroz Pretratada Mediante Explosión Con Vapor. (Spanish)." *Revista Ion* 24(2): 23–28.
- Rahman, S. H.A., J. P. Choudhury, and A. L. Ahmad. 2006. "Production of Xylose from Oil Palm Empty Fruit Bunch Fiber Using Sulfuric Acid." *Biochemical Engineering Journal* 30(1): 97–103.
- Rahman, S. H.A., J. P. Choudhury, A. L. Ahmad, and A. H. Kamaruddin. 2007. "Optimization Studies on Acid Hydrolysis of Oil Palm Empty Fruit Bunch Fiber for Production of Xylose." *Bioresource Technology* 98(3): 554–59.
- Roberto, Inês C., Solange I. Mussatto, and Rita C.L.B. Rodrigues. 2003. "Dilute-Acid Hydrolysis for Optimization of Xylose Recovery from Rice Straw in a Semi-Pilot

Reactor.” *Industrial Crops and Products* 17(3): 171–76.

Rocha, Maria Valderez Ponte et al. 2014. “Evaluation of Dilute Acid Pretreatment on Cashew Apple Bagasse for Ethanol and Xylitol Production.” *Chemical Engineering Journal* 243: 234–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2013.12.099>.

Shatalov, Anatoly A, and Helena Pereira. 2012. “Xylose Production from Giant Reed (*Arundo Donax* L .): Modeling and Optimization of Dilute Acid Hydrolysis.” *Carbohydrate Polymers* 87(1): 210–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.041>.

Silva, Silvio S., Maria G.A. Felipe, João B.A. Silva, and Arnaldo M.R. Prata. 1998. “Acid Hydrolysis of Eucalyptus Grandis Chips for Microbial Production of Xylitol.” *Process Biochemistry* 33(1): 63–67.

Sluiter, A. et al. 2005. “Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass.” *A national laboratory of the U.S. Department of Energy - Office of Energy Efficiency & Renewable Energy*.

———. 2008. “Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples.” *A national laboratory of the U.S. Department of Energy - Office of Energy Efficiency & Renewable Energy XXV(1): 233–53*.

Tomás-Pejó, E., M. Ballesteros, J. M. Oliva, and L. Olsson. 2010. “Adaptation of the Xylose Fermenting Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* F12 for Improving Ethanol Production in Different Fed-Batch SSF Processes.” *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 37(11): 1211–20.

Vélez Uribe, L. T. 2012. “Producción Biotecnológica de Xilitol a Partir de Residuos Lignocelulósicos Procedentes de La Extracción de Aceite de Palma.” Universidad Nacional de Colombia.

Yáñez, Remedios, Gil Garrote, and Manuel Jesús Díaz. 2009. “Valorisation of a Leguminous Specie, *Sesbania Grandiflora*, by Means of Hydrothermal Fractionation.” *Bioresource Technology* 100(24): 6514–23.

Yunus, Robiah, Shanti Faridah Salleh, Nurhafizah Abdullah, and Dyg Radiah Awg Biak. 2010. “Effect of Ultrasonic Pre-Treatment on Low Temperature Acid Hydrolysis of Oil Palm Empty Fruit Bunch.” *Bioresource Technology* 101(24): 9792–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.074>.

Zhanga, Dongxu, Yee Ling Onga, Zhi Lib, and Jin Chuan Wu. 2012. “Optimization of Dilute Acid-Catalyzed Hydrolysis of Oil Palm Empty Fruit Bunch for High Yield Production of Xylose.” *Chemical Engineering Journal* 181–182: 636–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2011.12.030>.

2. Capítulo 2

Producción de xilitol por *Candida guilliermondii* a partir de hidrolizados de residuos de palma de aceite.

2.1. Resumen

La hidrólisis ácida diluida del residuo lignocelulósico raquis de palma de aceite produce azúcares fermentables como la xilosa, principal fuente de carbono para la producción de xilitol por *Candida guilliermondii*. En este estudio se evaluó el efecto de diferentes medios de cultivo y condiciones de fermentación sobre la producción de xilitol a partir de raquis de palma de aceite utilizando *Candida guilliermondii*. El hidrolizado ácido de raquis de palma suplementado con 4 g L⁻¹ extracto de levadura, 3 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.5 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O y 0.1 g L⁻¹ CaCl₂·2H₂O, mostró ser el mejor medio para el crecimiento de la levadura en cultivo sumergido debido a que presentó los mayores valores estadísticamente significativos (p<0.05) de la velocidad específica máxima de crecimiento de 0.11 h⁻¹ y producción de biomasa de 4.5 g L⁻¹. Las condiciones de fermentación más apropiadas se obtuvieron con hidrolizado de raquis suplementado a pH de 5.5, concentración inicial de xilosa de 17g L⁻¹ y un inóculo de 3 g L⁻¹. El nivel de aireación mostró ser un factor importante en el proceso de fermentación con esta cepa, con un volumen de 40 mL de medio en un matraz de 100 mL; esta relación de volúmenes produjo la mayor concentración de xilitol (p<0.05) de 6.7 g L⁻¹.

Palabras clave: *Candida guilliermondii*, fermentación líquida, nivel de aireación, xilitol.

2.1. Introducción

La utilización de residuos agroindustriales es un campo importante a nivel biotecnológico debido a su potencial como materias primas para la producción de energía y productos de valor agregado (Albuquerque et al. 2015). Además, su uso en estos procesos contribuye a una reducción de la contaminación ambiental resultante de su inadecuada disposición (Silva and Roberto 2001b). El proceso de beneficio del fruto de palma de aceite en Colombia es uno de los más importantes generadores de biomasa por hectárea cultivada en comparación con otros cultivos oleaginosos y bioenergéticos.

Los principales residuos generados son: racimos vacíos (raquis), fibra, cuesco o cáscara del fruto y efluentes líquidos, principalmente. De los racimos de fruta fresca alrededor de 20 a 23% son racimos vacíos o raquis, 11 a 14% son fibras, 5 a 7% es cuesco o cáscara del fruto y 65 a 85% son efluentes líquidos (García, Cárdenas, and Yáñez 2010). La producción nacional de racimos de fruta fresca para el 2017 fue de 3.8 ton de aceite, lo cual representa millones de racimos vacíos o raquis de palma (Fedepalma 2017). Los racimos vacíos están conformados por celulosa (23,7%-65%), hemicelulosa (20.58 %-33.52 %), lignina (14.1%-30.4%) y cenizas (1.3-13%) (Cheng et al. 2009). El polisacárido más abundante de la hemicelulosa es el xilano, el cual puede ascender a 95% del total de los polisacáridos no celulósicos de la biomasa. El porcentaje de xilano en los raquis de palma varía entre 20-27% (Shatalov and Pereira 2012). Estos residuos, por su composición, constituyen un sustrato potencial para obtener azúcares fermentables, tales como glucosa y xilosa, que pueden ser convertidos biotecnológicamente en productos de valor económico (Albuquerque et al. 2015).

Algunas especies de levaduras se encuentran entre los mejores productores de xilitol, fermentando la xilosa mediante la enzima xilosa-reductasa (XR) dependiente de la Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH+), produciendo xilitol (Arruda et al. 2011). Entre las levaduras más destacadas en este proceso se encuentran *Candida*

guilliermondii (Acosta et al. 2005; Arruda et al. 2011; Camargo et al. 2015); *Candida tropicalis* (Ling et al. 2011) y *Pichia guilliermondii* (Zou et al. 2010).

El xilitol, un alcohol pentahidroxiado de la xilosa, puede ser producido química o bioquímicamente a partir de xilosa (Acosta et al. 2005; Arruda et al. 2011). Este poliol es usado como edulcorante en la industria de alimentos, así como en productos para la higiene bucal, farmacéuticos y cosméticos. Tiene propiedades anticariogénicas y puede usarse por personas diabéticas, ya que su metabolismo es independiente de la insulina; además, es un compuesto benéfico para personas obesas porque contribuye a la baja formación de grasa en el tejido adiposo (Arruda et al. 2011; Camargo et al. 2015).

Diferentes estudios enfocados en la producción de xilitol vía fermentación han evaluado diversas condiciones a fin de aumentar su rendimiento como la aireación (Soleimani and Tabil 2014), pH (Cheng et al. 2009), concentración de sustrato (Camargo et al. 2015; Hassan et al. 2013), tiempo y sistemas de fermentación (M. L. Carvalho et al. 2013). También se han evaluado las condiciones de hidrólisis (Camargo et al. 2015; Shatalov and Pereira 2012), adaptación de la levadura y métodos de detoxificación (Kamal et al. 2011). El objetivo de este estudio fue evaluar diferentes medios de cultivo y diversas condiciones de fermentación en la producción de xilitol por *Candida guilliermondii* a partir de hidrolizados ácidos de raquis de palma de aceite a escala de matraz agitado.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Materiales

Los racimos vacíos de frutos o raquis de palma fueron suministrados por la planta de beneficio Palmares del Oriente S.A.S. Los racimos se lavaron, secaron y molieron en una máquina pica-pasto (Molino #1, JM. ESTRADA.S.A, La Estrella, Colombia), hasta un tamaño de partícula de 3 a 5 cm.

2.2.2. Hidrólisis ácida del raquis de palma

La hidrólisis ácida de los raquis se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 mL con una relación 1:8 sólido-líquido, tomando 40 g del raquis y 320 mL de ácido sulfúrico diluido al 2%. Los matraces fueron esterilizados por 30 min a 121°C y posteriormente sumergidos en un baño de hielo para detener la hidrólisis. Finalmente, se filtró todo el contenido del hidrolizado y se ajustó el pH a 5.0, 5.5 y 6.0 con NaOH al 98%, para los diferentes tratamientos. El hidrolizado presentó una concentración de xilosa, glucosa, hidroximetilfurfural (HMF) y ácido acético de 32.597, 0.769, 0.012 y 11.065 g L⁻¹, respectivamente

2.2.3. Crecimiento de la levadura en diferentes medios

El crecimiento de *Candida guilliermondii* ATCC® 6260™ se determinó en los siguientes medios a 30°C y 108 rpm: a) medio líquido de 2% (p v⁻¹) de glucosa, 2% (p v⁻¹) de peptona y 2% (p v⁻¹) de extracto de levadura y agua destilada (YPG), b) hidrolizado de raquis de palma (HR) y c) hidrolizado de raquis de palma suplementado (HRS) con 4 g L⁻¹ extracto de levadura, 3 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.5 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O y 0.1 g L⁻¹ CaCl₂·2H₂O. La biomasa se determinó por peso seco. En el método de peso seco se tomaron 10 mL de muestra, se centrifugó a 3900 rpm durante 20 min a 25°C, se lavó dos veces con agua destilada y se secó en cajas petri a 60°C por 72 h, para luego registrar el peso seco (Niño Camacho and Torres Sáenz 2010). De las curvas de crecimiento se obtuvieron los siguientes parámetros: Tiempo de fase exponencial y tiempo de duplicación (h), velocidad específica máxima de crecimiento, μ_{\max} (h⁻¹), concentración de biomasa (g L⁻¹). Para conocer el potencial de la cepa utilizada para metabolizar la xilosa y su capacidad de producción de xilitol se empleó un medio mínimo de xilosa (MMX), con este azúcar como única fuente de carbono. La composición de dicho medio fue p v⁻¹ en %: xilosa 1.5%, (NH₄)₂SO₄ 0.5%, KH₂PO₄ 0.5%, y el resto agua estéril.

2.2.4. Fermentación a diferentes condiciones

Se seleccionó el mejor medio de cultivo empleado, con base en el menor tiempo de duplicación de la biomasa. Las condiciones de fermentación evaluadas fueron: pH (5.0 y 5.5), concentración de inóculo (3 y 5g L⁻¹) y concentración de xilosa (17 y 37g L⁻¹). La fermentación, se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 100mL, tomando 47mL de medio de cultivo, se incubó en un agitador, a 200 rpm y 30°C, por 96 h. Los parámetros evaluados fueron: concentración de xilitol, rendimiento de producto con respecto al sustrato ($Y_{P/S}$) y velocidad volumétrica de formación de producto (Q_P). Las concentraciones de xilosa y de xilitol fueron determinadas por HPLC (Shimadzu Prominence 20A, Kyoto, Japan), con una columna Aminex HPX-87H (Biorad) y un detector RI (Piñeros-Castro et al. 2011).

2.2.5. Nivel de aireación

Se estudiaron diferentes condiciones de aireación a escala de matraz Erlenmeyer de 100 mL con variaciones en el volumen de medio efectivo utilizado de 40, 60, 80 y 90 mL (Villalba-Cadavid et al. 2009). El nivel de aireación se determinó utilizando el medio de cultivo previamente seleccionado y un medio mínimo de xilosa (MMX), los cuales fueron inoculados con 5g L⁻¹ de la levadura a 200 rpm y 30°C, con un pH y una concentración inicial de xilosa específicos. Se realizaron al menos dos repeticiones de cada tratamiento.

2.2.6. Diseño Experimental

En las pruebas de crecimiento de la levadura y el nivel de aireación se empleó un diseño de una sola vía, tomando como factores el tipo de medio y el volumen efectivo, respectivamente. Además, en las pruebas de fermentación se aplicó un diseño factorial 2^k completamente aleatorizado, con los siguientes factores: pH, concentración de inóculo y concentración de xilosa. Los datos experimentales se sometieron a ANOVA, con un nivel de significancia del 5% y se utilizó diferencia mínima significativa (LSD) para comparar los tratamientos con diferencias significativas. El análisis estadístico se realizó mediante Statgraphics plus 5.1. Los resultados se presentan como el promedio ± desviación estándar.

2.3. Resultados y discusión

2.3.1. Curvas de crecimiento en diferentes medios

Las curvas de crecimiento de *C. guilliermondii* en los medios YPG, HR y HRS, se observan en la Figura 2-1. En la Tabla 2-1 se reportan los valores de la velocidad específica máxima de crecimiento, el tiempo de duplicación y el tiempo de la fase exponencial. El tratamiento que se seleccionó para el montaje de las fermentaciones en matraz agitado fue HRS, debido a que presentó el mayor valor de la velocidad específica máxima de crecimiento (0.12 h^{-1}), correspondiente a un tiempo de duplicación de 5.77 h y la mayor concentración final de biomasa (5.5 g L^{-1}).

Los compuestos usados para suplementar el hidrolizado excluyen cualquier limitación del crecimiento de la levadura, debido a una deficiencia nutricional. Adicionalmente, en la curva de crecimiento con YPG se observó una fase de adaptación prolongada de 20 h, dado que la cepa se mantuvo por debajo de su temperatura óptima (30°C). El comportamiento de la levadura en HR no muestra una disminución de la concentración de biomasa en las primeras horas de la fermentación, a pesar de la presencia de compuestos tóxicos, como por ejemplo hidroximetilfurfural (0.012 g L^{-1}), determinado en ensayos preliminares. Este compuesto es conocido como inhibidor en el crecimiento de la levadura; sin embargo, la concentración obtenida en este estudio no fue lo suficientemente alta para afectar metabólicamente la levadura (Carvalho et al. 2005).

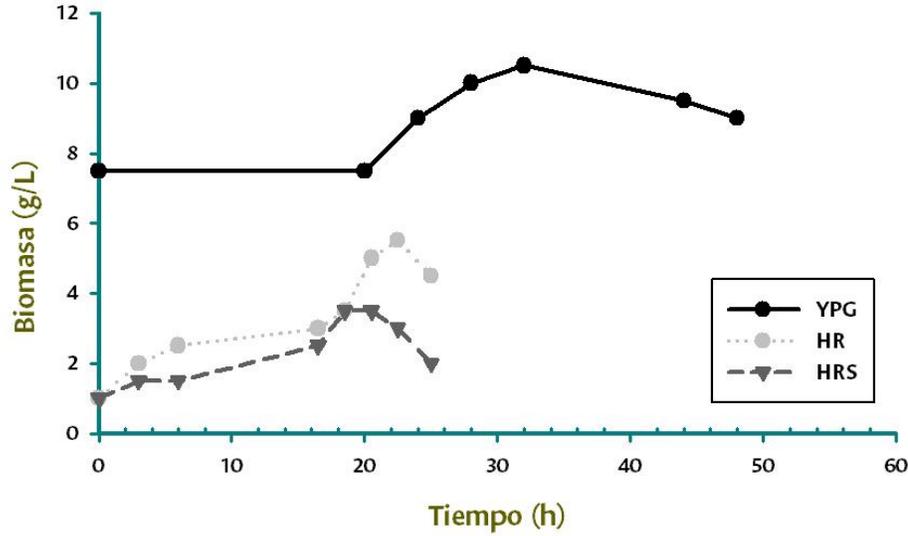


Figura 2-1: Curvas de crecimiento de *Candida guilliermondii* en medios YPG, HR y HRS, a 30°C y 108rpm.

Tabla 2-1: Parámetros de las cinéticas de crecimiento de *Candida guilliermondii* en diferentes medios de cultivo

Medio de cultivo	Tiempo fase exponencial (h)	Velocidad específica máxima de crecimiento (h^{-1})	Tiempo de duplicación (h)
YPG	8	0.03	23.10
HR	12.5	0.06	11.55
HRS	4	0.12	5.77

YPG: medio líquido de glucosa, peptona y extracto de levadura; HR: hidrolizado de raquis de palma; HRS: hidrolizado de raquis de palma suplementado.

La *Candida guilliermondii* FTI 20037 se ha sido utilizada en hidrolizado de bagazo de caña de azúcar reportando una fase de adaptación de 10 h, una fase exponencial aproximadamente de 12 h y una producción máxima de biomasa de 6 g L^{-1} (Hernández-Pérez et al. 2019), estos resultados son similares a los encontrados en esta investigación con el raquis de palma (HR) con una producción de biomasa de 5.5 g L^{-1} . Otros estudios utilizando la misma cepa en hidrolizados de cascarilla de cebada reportan una

producción máxima de biomasa de 7 g L^{-1} y una fase exponencial de 24 h donde es significativo el crecimiento celular (Moraes et al. 2018). El comportamiento cinético de la cepa muestra su gran capacidad de crecer en hidrolizados ricos en medios con xilosa y otras sustancias, lo cual ayuda a la fermentación de esta pentosa.

Hidrolizados de cascarilla de arroz han sido utilizados para analizar el crecimiento de *C. guilliermondii* teniendo una fase de crecimiento exponencial de 20 h y una producción máxima de biomasa en este tiempo de 6 g L^{-1} (Mussatto and Roberto 2004), dichos resultados coinciden en cuanto a la producción de biomasa obtenida este trabajo pero con fase exponencial más prolongada. En general, *C. guilliermondii* es una cepa que se ha conocido por tener una fase exponencial mayor a 10 h en diferentes hidrolizados de materiales lignocelulósicos; sin embargo, dicho comportamiento varía en cada uno de los hidrolizados que se empleen para su crecimiento, es por esto que no se pueden hacer comparaciones válidas teniendo en cuenta que cada experimentación tiene diferentes condiciones de fermentación, cantidad inicial de sustrato, cantidad inicial de inóculo, presencia de sustancias inhibitorias o sustancias que favorezcan dicho crecimiento.

2.3.2. Fermentación a escala de matraz

En la Tabla 2-2 se observan los resultados del rendimiento del xilitol con respecto a la xilosa, $Y_{P/S}$, la productividad de xilitol, Q_P y la concentración final de xilitol luego de 96 h de fermentación para las diferentes condiciones del proceso. El tratamiento que mostró la mayor producción de xilitol (2.025 g L^{-1}) corresponde a un pH de 5.5, concentración inicial de xilosa de 17 g L^{-1} y un inóculo de 3 g L^{-1} . A esas mismas condiciones, $Y_{P/S}$ y Q_P fueron de 0.094 g g^{-1} y $0.021 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Otros estudios sobre fermentación con hidrolizados de residuos agroindustriales utilizando *C. guilliermondii* para la producción de xilitol, reportan rendimientos de 0.7 g de xilitol g^{-1} de sustrato, bajo condiciones semi-aeróbicas a partir de 150 g L^{-1} inicial de xilosa (L. Mohamad et al. 2016). Arruda et al. (2011) hallaron que la máxima producción de xilitol fue de 50.5 g L^{-1} a escala matraz (125 mL), con un $Y_{P/S}$ de 0.81 g g^{-1} y Q_P de $0.60 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ después de 96 h de fermentación, a un pH 5.5 y 30°C , utilizando *C. guilliermondii* en bagazo de caña. También se ha reportado una producción de xilitol de 52 g L^{-1} con un factor de rendimiento de 0.65 g g^{-1} ,

usando *C. guilliermondii* e hidrolizado de cascarilla de arroz como sustrato (Silva and Roberto 2001a). Una posible causa del bajo rendimiento de xilitol en este estudio podría ser la baja concentración de xilosa inicial, de aproximadamente 17-37 g L⁻¹. Una mayor concentración de sustrato aumenta la concentración final de producto en el hidrolizado de raquis (Silva, Mussatto, and Roberto 2006).

Tabla 2-2: Fermentación en matraz por 96h, con diferentes concentraciones de inóculo,

Condiciones de fermentación evaluadas			Xilitol (g L ⁻¹)	Y _{P/S} (g g ⁻¹)	Q _P (g L ⁻¹ h ⁻¹)
pH	Xilosa inicial (g L ⁻¹)	Inóculo (g L ⁻¹)			
5.5	17	3	2.025±0.03 ^d	0.094	0.021
	17	5	1.426±0.02 ^c	0.076	0.018
	37	3	1.317±0.00 ^c	0.058	0.014
	37	5	1.141±0.02 ^c	0.046	0.012
5	17	3	0.700±0.01 ^a	0.089	0.007
	17	5	0.701±0.02 ^a	0.071	0.007
	37	3	0.683±0.08 ^a	0.040	0.007
	37	5	0.799±0.07 ^b	0.033	0.008

sustrato y pH

*Las diferencias de letras en la misma columna indican una diferencia significativa (p<0.05), de acuerdo a la prueba LSD.

2.3.3. Nivel de aireación

La disponibilidad de oxígeno es un factor importante en la producción biotecnológica de xilitol a partir de D-xilosa. En condiciones limitadas de oxígeno la fosforilación oxidativa no puede volver a oxidar todo el dinucleótido de Nicotinamida y Adenina (NADH) generado, lo cual conduce a una acumulación de xilitol a nivel intracelular (Albuquerque et al. 2014). Además, la presencia de alta cantidad de oxígeno favorece la conversión de xilosa a biomasa, mientras que una baja cantidad de oxígeno aumenta el rendimiento de xilitol (Aguiar et al. 2002; W. Carvalho et al. 2005). En condiciones anaeróbicas, las levaduras son incapaces de metabolizar la D-xilosa. A un bajo nivel de oxígeno, el sistema de transporte de electrones no puede oxidar el NADH por completo, lo que

aumenta las concentraciones de NADH y permite la excreción de xilitol. A un alto nivel de oxígeno, la oxidación favorece la oxidación del xilitol a xilulosa (L. Mohamad et al. 2016). La producción de xilitol por medio de un nivel de aireación bajo, a un pH de 5.5 y una concentración inicial de xilosa de 17 g L^{-1} en este estudio, se observa en la Tabla 2-3. Los medios de cultivo estudiados fueron HRS y MMX. El mejor resultado se obtuvo con HRS a 40 mL de medio, en matraces de 100 mL, con una producción de 6.7 g L^{-1} xilitol. Esto indica que el nivel de aireación a un volumen de 40 mL, en un matraz de 100 mL y en cultivo HRS, es apropiada para la producción de xilitol, tomando en cuenta los valores reportados de los demás tratamientos (Tabla 2-3); sin embargo, son valores bajos comparados con los de otros estudios (Arruda et al. 2011; Silva and Roberto 2001a).

Tabla 2-3: Nivel de aireación con hidrolizado suplementado (HRS), medio mínimo de xilosa (MMX) y cepa nativa de *Candida guilliermondii*

Volumen efectivo (mL)	Medio	
	HRS	MMX
	Xilitol (g L^{-1})	Xilitol (g L^{-1})
40	$6,745 \pm 0,30^c$	$0,323 \pm 0,03^b$
60	$0,143 \pm 0,01^a$	$0,037 \pm 0,01^a$
80	$0,317 \pm 0,01^b$	$0,035 \pm 0,00^a$
90	$0,367 \pm 0,02^b$	$0,046 \pm 0,01^a$

*Las diferencias de letras en la misma columna indican una diferencia significativa ($p < 0,05$), de acuerdo a la prueba LSD.

Es necesario tener en cuenta que estos estudios emplean mayor cantidad de sustrato, lo que implica la adición de xilosa, procedimiento que no fue necesario para obtener xilitol a partir de hidrolizado de raquis de palma dada la alta concentración de xilosa obtenida en estos hidrolizados. La microaerobiosis para la producción de xilitol es importante, debido a que la acumulación de xilitol en la levadura está directamente asociada al desequilibrio redox, limitando las coenzimas, para mayor generación de producto (L. Mohamad et al. 2016). Previamente, se ha reportado que el volumen de medio ideal es de 40% para el crecimiento de biomasa y 88%, para la producción de xilitol en microaerobiosis, bajo condiciones controladas de O_2 , inóculo y pH, entre otros (Aguar et al. 2002). Sin

embargo, Nollet et al. (1993) reportaron un $Y_{P/S}$ en la producción de xilitol de 0.69 g g^{-1} , con *C. guilliermondii* bajo condiciones de aerobiosis, con una concentración inicial de 300 g L^{-1} xilosa. Dicha condición de oxígeno disponible presentó una alta densidad celular, garantizando óptima generación de xilitol.

Walther et al. (2001) simularon diferentes condiciones de aireación según los niveles de volumen de medio en matraces Erlenmeyer de 250 mL. El volumen medio a 26, 40 y 54% con respecto al volumen del matraz Erlenmeyer se estableció para la aireación aeróbica, semiaeróbica y microaeróbica, respectivamente. El volumen medio utilizado en la fermentación fue del 40%, lo que podría considerarse una aireación con tendencia microaeróbica. Los valores óptimos de concentración de oxígeno para la producción de xilitol generalmente corresponden a condiciones microaeróbicas (Aguiar et al. 2002; Salgado et al. 2012). Sin embargo, las cepas crecen vigorosamente al comienzo de la fermentación a altas concentraciones iniciales de xilosa y alta aireación. Esto conduce a altas densidades celulares y bajos niveles de oxígeno en las últimas etapas de la fermentación y resulta en altas tasas de producción de xilitol. A concentraciones de xilosa iniciales más bajas, las densidades celulares son bajas y el nivel de oxígeno disuelto permanece alto; por lo tanto, se acumula menos xilitol (Walther, Hensirisak, and Agblevor 2001). Además, las concentraciones inicialmente extremadamente altas de xilosa son perjudiciales para los rendimientos de xilitol debido al estrés osmótico que podría inducirse en el microorganismo por la cantidad excesiva de azúcar en el medio.

Por lo tanto, una manipulación cuidadosa de ambos, la aireación y la concentración inicial de xilosa, podrían conducir a altos rendimientos de xilitol. Tanto en la productividad como en el rendimiento del xilitol, la aireación parece ser un factor muy importante (Nollet et al. 1993). Si el medio de fermentación contiene glucosa, se obtienen mayores rendimientos y productividades en condiciones aeróbicas; mientras que en ausencia de glucosa o con bajas concentraciones iniciales de ésta, las condiciones microaeróbicas mejoran los rendimientos. Este comportamiento puede atribuirse a una mayor demanda de oxígeno por las altas densidades celulares logradas en presencia de glucosa (Walther, Hensirisak, and Agblevor 2001).

2.4. Conclusiones

En general, el crecimiento de la levadura *C. guilliermondii* en hidrolizados de raquis de palma suplementado (HRS) presentó los mayores valores de velocidad específica máxima de crecimiento (0.12 h^{-1}), correspondiente a un tiempo de duplicación de 5.77 h y una producción de biomasa de 5.5 g L^{-1} . Las condiciones de fermentación con cultivo HRS que tuvieron la mayor producción de xilitol fueron pH de 5.5, concentración inicial de xilosa de 17 g L^{-1} y un inóculo de 3 g L^{-1} . Además, al aplicar un nivel de aireación con un volumen de 40 mL, en matraces de 100 mL, a las condiciones de fermentación anteriormente mencionadas, aumenta la concentración de xilitol a 6.7 g L^{-1} , lo que representa un parámetro de gran importancia para aumentar la producción de xilitol utilizando esta cepa. No obstante, al realizar fermentaciones sucesivas con esta cepa se veía afectada drásticamente su capacidad metabólica para la producción de xilitol quizás por el tipo de pase (#4) en el que se encontraba, adicionalmente, no se contó con una certificación de producción de xilitol para esta misma cepa. Por consiguiente, en las experimentaciones sucesivas se decidió emplear *Candida tropicalis*, la cual contaba con las certificaciones requeridas para la producción de xilitol.

Referencias

- Acosta, Ernesto et al. 2005. "Producción de Xilitol En Fermentador de 15 Litros." *ICIDCA : Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* 39(3): 45–51.
- Aguar, Wilson B. et al. 2002. "Growth Model and Prediction of Oxygen Transfer Rate for Xylitol Production from D-Xylose by *C. Guilliermondii*." *Biochemical Engineering Journal* 12(1): 49–59.
- Albuquerque, Tiago Lima et al. 2015. "Xylitol Production from Cashew Apple Bagasse by *Kluyveromyces Marxianus* CCA510." *Catalysis Today* 255: 33–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2014.10.054>.
- Arruda, Priscila Vaz de, Rita de Cássia Lacerda Brambilla Rodrigues, Débora Danielle Virgínio da Silva, and Maria das Gracias de Almeida Felipe. 2011. "Evaluation of Hexose and Pentose in Pre-Cultivation of *Candida Guilliermondii* on the Key Enzymes for Xylitol Production in Sugarcane Hemicellulosic Hydrolysate." *Biodegradation* 22(4): 815–22.

-
- Camargo, Danielle, Luciane Sene, Daniela Inês Loreto Saraiva Variz, and Maria das Graças de Almeida Felipe. 2015. "Xylitol Bioproduction in Hemicellulosic Hydrolysate Obtained from Sorghum Forage Biomass." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 175(8): 3628–42.
- Carvalho, F. et al. 2005. "Evaluation of the Detoxification of Brewery's Spent Grain Hydrolysate for Xylitol Production by *Debaryomyces Hansenii* CCMI 941." *Process Biochemistry* 40(3–4): 1215–23.
- Carvalho, M. L. et al. 2013. "Kinetic Study of the Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse." *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 30(3): 437–47.
- Carvalho, W. et al. 2005. "Xylitol Production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate: Metabolic Behaviour of *Candida Guilliermondii* Cells Entrapped in Ca-Alginate." *Biochemical Engineering Journal* 25(1): 25–31.
- Cheng, Ke Ke et al. 2009. "Optimization of PH and Acetic Acid Concentration for Bioconversion of Hemicellulose from Corncobs to Xylitol by *Candida Tropicalis*." *Biochemical Engineering Journal* 43(2): 203–7.
- Fedepalma. 2017. "Boletín El Palmicultor." Núm. 550 Diciembre (552). <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmicultor/issue/view/1353>.
- García, Jesús Alberto, Mónica Cárdenas, and Edgar Eduardo Yáñez. 2010. "Generación y Uso de Biomasa En Plantas de Beneficio de Palma de Aceite En Colombia." *Revista Palmas* 31(2): 41–48. <http://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/1477>.
- Hassan, Osman et al. 2013. "Optimization of Pretreatments for the Hydrolysis of Oil Palm Empty Fruit Bunch Fiber (EFBF) Using Enzyme Mixtures." *Biomass and Bioenergy* 56(0): 137–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.04.021>.
- Hernández-Pérez, Andrés Felipe et al. 2019. "Xylitol Bioproduction: State-of-the-Art, Industrial Paradigm Shift, and Opportunities for Integrated Biorefineries." *Critical Reviews in Biotechnology* 39(7): 924–43. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1640658>.
- Kamal, Siti M. Mustapa, Nurul L. Mohamad, Abdul G. Liew Abdullah, and Norhafizal Abdullah. 2011. "Detoxification of Sago Trunk Hydrolysate Using Activated Charcoal for Xylitol Production." *Procedia Food Science* 1: 908–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.137>.
- Ling, Hongzhi, Keke Cheng, Jingping Ge, and Wenxiang Ping. 2011. "Statistical

- Optimization of Xylitol Production from Corn cob Hemicellulose Hydrolysate by *Candida Tropicalis* HDY-02.” *New Biotechnology* 28(6): 673–78.
- Mohamad, Lina et al. 2016. “Dynamic Mathematical Modelling of Reaction Kinetics for Xylitol Fermentation Using *Candida Tropicalis*.” *Biochemical Engineering Journal* 111: 10–17.
- Moraes, Elisângela de Jesus Cândido et al. 2018. “Xylitol-Sweetener Production from Barley Straw: Optimization of Acid Hydrolysis Condition with the Energy Consumption Simulation.” *Waste and Biomass Valorization* 0(0): 0. <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-018-0501-9>.
- Mussatto, Solange I, and Inês C. Roberto. 2004. “Alternatives for Detoxification of Diluted-Acid Lignocellulosic Hydrolyzates for Use in Fermentative Processes: A Review.” *Bioresource Technology* 93(1): 1–10.
- Niño Camacho, L, and R Torres Sáenz. 2010. “Implementación de Diferentes Técnicas Analíticas Para La Determinación de Biomasa Bacteriana de Cepas *Pseudomonas Putida* Biodegradadoras de Fenol.” *Revista ION* 23: 41–46.
- Nolleau, V., L. Preziosi-Belloy, J. P. Delgenes, and J. M. Navarro. 1993. “Xylitol Production from Xylose by Two Yeast Strains: Sugar Tolerance.” *Current Microbiology* 27(4): 191–97.
- Piñeros-Castro, Yineth et al. 2011. “Producción de Azúcares Fermentables Por Hidrólisis Enzimática de Cascarilla de Arroz Pretratada Mediante Explosión Con Vapor. (Spanish).” *Revista Ion* 24(2): 23–28.
- Salgado, José Manuel, Noelia Rodríguez, Sandra Cortés, and José Manuel Domínguez. 2012. “Coupling Two Sizes of CSTR-Type Bioreactors for Sequential Lactic Acid and Xylitol Production from Hemicellulosic Hydrolysates of Vineshoot Trimmings.” *New Biotechnology* 29(3): 421–27.
- Shatalov, Anatoly A, and Helena Pereira. 2012. “Xylose Production from Giant Reed (*Arundo Donax* L.): Modeling and Optimization of Dilute Acid Hydrolysis.” *Carbohydrate Polymers* 87(1): 210–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.041>.
- Silva, Solange Mussatto, and Ines Roberto. 2006. “Study of Xylitol Production by *Candida Guilliermondii* on a Bench Bioreactor.” *Journal of Food Engineering* 75(1): 115–19.
- Silva, and I Roberto. 2001a. “Improvement of Xylitol Production by *Candida Guilliermondii* FTI 20037 Previously Adapted to Rice Straw Hemicellulosic Hydrolysate.” *Letters in Applied Microbiology* 32(4): 248–52.

- Silva, and Ines Roberto. 2001b. "Optimization of Xylitol Production by *Candida Guilliermondii* FTI 20037 Using Response Surface Methodology." *Process Biochemistry* 36(11): 1119–24.
- Soleimani, Majid, and Lope Tabil. 2014. "Evaluation of Biocomposite-Based Supports for Immobilized-Cell Xylitol Production Compared with a Free-Cell System." *Biochemical Engineering Journal* 82: 166–73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.11.011>.
- Villalba-Cadauid, Marcela, Tatiana Vélez-Urbe, Mario Arias-Zabala, and Guillermo Arrázola-Paternina. 2009. "Producción de Xilitol a Partir de Cascarilla de Arroz Utilizando *Candida Guilliermondii*." *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 62(1): 4897–4905.
- Walther, T, P Hensirisak, and F. A Agblevor. 2001. "The Influence of Aeration and Hemicellulosic Sugars on Xylitol Production by *Candida Tropicalis*." *Bioresource Technology* 76(3): 213–20.
- Zou, Yun zhi et al. 2010. "Favorable Effect of Very Low Initial $K_L a$ Value on Xylitol Production from Xylose by a Self-Isolated Strain of *Pichia Guilliermondii*." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109(2): 149–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.07.013>.

3. Capítulo 3

Producción de xilitol a partir de hidrolizados de raquis de palma detoxificados y sin detoxificar utilizando *Candida tropicalis*

3.1. Resumen

La hemicelulosa, el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, es empleada para la generación de productos con valor agregado como xilitol, un edulcorante ampliamente utilizado en la industria alimentaria. La utilización de material lignocelulósico como el raquis de palma de aceite es una alternativa para la producción de este azúcar alcohol. Durante la hidrólisis se rompen los polímeros presentes en la fracción hemicelulósica hasta obtener xilosa, azúcar que es convertida a xilitol por vía fermentativa. Sin embargo, algunos compuestos inhibidores son liberados mediante la hidrólisis afectando el metabolismo de los microorganismos productores.

Los objetivos de este estudio fueron (1) evaluar la producción biotecnológica de xilitol usando *Candida tropicalis* a partir de hidrolizado de racimos de fruta vacíos de palma de aceite (raquis) detoxificado por el método de carbón activado y overliming, (2) comparar la producción de xilitol, la xilosa residual y el rendimiento producto/sustrato del mejor pretratamiento con detoxificación frente a un hidrolizado sin detoxificar y (3) evaluar la

producción de biomasa y xilitol en diferentes medios de cultivo como medio sintético de extracto de levadura, peptona, xilosa (YPX), medio-xilosa mínima (MMX) y medio de hidrolizados de raquis sin detoxificar. El uso de carbón activado redujo un 42% la concentración de glucosa, 70% la de ácido acético y 3% la de xilosa. Las mejores condiciones obtenidas con el método de carbón activado para una mayor producción de xilitol (3.5 g L^{-1}) fueron 30 min, pH 2 y una concentración de carbón activado de 2.5%. En la comparación del pretratamiento sin y con detoxificación con carbón activado, se escogió el método sin detoxificar porque se produce el mayor rendimiento de producto (0.74 g g^{-1}) y se consume la mayor cantidad de xilosa durante el proceso de fermentación. Con respecto a la comparación de diferentes medios de cultivo, el mejor medio sintético para la producción de biomasa fue YPX con 2.52 g L^{-1} a 30 h de fermentación, y el rendimiento de xilitol en medio de hidrolizado de raquis sin detoxificar fue de 0.41 g g^{-1} .

Palabras clave: Hidrólisis ácida, *Candida tropicalis*, fermentación, hidrolizado, racimos vacíos de palma de aceite, xilitol

3.2. Introducción

El xilitol es un azúcar alcohol con un poder edulcorante similar a la sacarosa y valor calórico inferior (2.4 cal g^{-1}). Actualmente es utilizado en la industria farmacéutica y alimentaria. Su uso en alimentos es básicamente como edulcorante alternativo con alta estabilidad química y biológica, lo que lo hace atractivo como conservante de alimentos, además de no reaccionar con los aminoácidos responsables de los efectos de pardeamiento, conservando el valor nutricional de las proteínas (Parajó, Domínguez, and Domínguez 1998)(Parajó, Domínguez, and Domínguez 1998). El xilitol es ideal para personas diabéticas dado que no es dependiente de insulina. Es usado solo o en combinación con otros edulcorantes para aumentar el dulzor en gomas de mascar, dulces y chocolates; además se utiliza para simular un efecto refrescante debido a su alto calor endotérmico de solución (34.8 cal g^{-1}) y para proporcionar textura y productos más flexibles con un sabor similar a la sacarosa (Mussatto and Roberto 2008). Otras

aplicaciones como antioxidante, humectante, crioprotector y reductor del punto de congelación han sido reportadas. El beneficio adicional del xilitol es su propiedad anticariogénica, ejerciendo control en el crecimiento de *Lactobacillus* y *Streptococcus mutans* en saliva (Mpabanga et al. 2012).

El xilitol puede obtenerse vía fermentación utilizando residuos lignocelulósicos derivados de la agroindustria, previo un proceso de hidrólisis para liberar los azúcares fermentables. El raquis de palma es uno de los principales residuos que genera la industria procesadora de aceite de palma en Colombia, siendo rico en lignina (13.2%), celulosa (42.7%) y hemicelulosa (17.1%) (Hassan et al. 2013). El principal inconveniente de la hidrólisis ácida diluida es la formación de compuestos inhibidores que afectan el proceso de fermentación (Tahezadeh and Karimi 2007). Algunos inhibidores para la producción de xilitol son: ácido acético, 5-hidroximetilfurfural, furfural y compuestos fenólicos.

Se han estudiado varios métodos de detoxificación para reducir las concentraciones de dichos compuestos. Los métodos más comunes son overliming, adaptación biológica y la adsorción con carbón activado (Shamsudin et al. 2012). La efectividad de los métodos depende de los tipos de hidrolizado, la hemicelulosa y de las especies de microorganismos empleados debido a que los diferentes tipos de hidrolizado tienen diferentes grados de toxicidad y cada microorganismo posee diferentes grados de tolerancia a los inhibidores (Kamal et al. 2011). En algunos estudios se ha observado que el rendimiento de xilitol en hidrolizados detoxificados es bajo debido a que se eliminan, fuera de los compuestos inhibidores, otras sustancias como minerales, que pueden servir como factores de crecimiento de microorganismos como las levaduras (Carvalho et al. 2005).

La adsorción con carbón activado se usa ampliamente para eliminar compuestos del hidrolizado. La efectividad de este tratamiento depende de varias variables utilizadas para el proceso de adsorción como: pH, temperatura, tiempo de contacto y concentración de carbón. Sin embargo, la concentración de carbón y el tiempo de contacto influyen fuertemente en la eliminación del compuesto (Mussatto and Roberto 2004). Además, otro de los procesos más utilizados para el acondicionamiento del hidrolizado es el tratamiento con cal (óxido de calcio), denominado comúnmente “overliming”, y es un

método muy rentable para detoxificar hidrolizados de madera blanda. El proceso de overliming comienza añadiendo cal para ajustar el pH del licor de hidrolizado a un valor entre 9-11. El licor suele ser calentado a una temperatura en el rango de 50-60°C. Una vez el pH y la temperatura están en los valores objetivos, la solución se mantiene a esas condiciones por 30 min y se filtra para eliminar el precipitado de yeso (sulfato de calcio) formado por calcio divalente de la cal combinando con sulfato en el hidrolizado. Finalmente, el proceso se completa ajustando el pH del hidrolizado a un valor apropiado para la fermentación (Mohagheghi, Ruth, and Schell 2006).

El objetivo de este estudio fue evaluar la detoxificación de hidrolizado de raquis de palma con carbón activado y overliming sobre la concentración de inhibidores, el crecimiento celular y la producción de xilitol por *C. tropicalis*. Adicionalmente, se verificaron los resultados del mejor método de detoxificación con respecto a un método sin detoxificar. Posteriormente, se evaluó la producción de xilitol utilizando hidrolizado de raquis sin detoxificar y se comparó con diferentes medios de cultivo sintéticos.

3.3. Materiales y métodos

Esta investigación se realizó en los laboratorios de Bioconversiones y Control del Calidad de Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

3.3.1. Preparación y tratamiento del hidrolizado de raquis de palma

El raquis de palma (EFB) de la empresa Palmares de Oriente fue desinfectado, secado y molido. El hidrolizado se obtuvo con ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 2%, con una relación sólido-líquido de 1:8 y temperatura de 121°C durante 30 min; al cabo de este tiempo se detuvo la hidrólisis con baño de hielo, se filtró con bomba de vacío y se ajustó el pH a 4.

3.3.2. Detoxificación

Para la selección de las mejores condiciones de detoxificación usando carbón activado se utilizó un diseño factorial de 2×3 , con factores tiempo de contacto (30 y 60 min), pH (5.1 y 2.0) y concentración de carbón activado (1% y 2,5% p v⁻¹). La agitación fue de 150 rpm y la temperatura de 30°C. Los hidrolizados se centrifugaron a 7000 rpm y el sobrenadante se utilizó para las determinaciones de azúcares e inhibidores.

En la detoxificación por el método de overliming se adicionó NaOH al hidrolizado hasta elevar el pH a 10 y se dejó reposando durante 60 min. Posteriormente, se centrifugó a 7500 rpm y se ajustó el pH a 4. Para evaluar el mejor método de detoxificación, se realizaron fermentaciones con *C. tropicalis*, utilizando hidrolizado detoxificado con carbón activado (DCA) y overliming (DOV) a fin de evaluar el comportamiento cinético de la levadura y producción de xilitol con cada uno de estos métodos.

3.3.3. Preparación del preinóculo

La levadura *C. tropicalis* se reactivó en caldo BHI y posteriormente se sembró en agar Sabouraud a 30°C durante 120 h. Se tomaron colonias aisladas del cultivo *C. tropicalis* y se suspendieron en 20 mL de hidrolizado de raquis a pH 4, 108 rpm y 30°C durante 44 h.

Por otro lado, para la experimentación de la producción de xilitol comparando hidrolizado de raquis sin detoxificar y diferentes medios de cultivo, *C. tropicalis* se mantuvo a 4 °C en placas de agar dextrosa Sabouraud y se subcultivó a 30°C antes de cada experimento. Se evaluó la cepa, transfiriendo una colonia a un matraz Erlenmeyer de 100 mL, donde contenía 40 mL de medio YPG (levadura, peptona y glucosa).

3.3.4. Condiciones de fermentación

Para verificar las mejores condiciones del hidrolizado detoxificado se realizaron fermentaciones en matraces Erlenmeyer con 20 mL de hidrolizado detoxificado con

carbón activado y overliming. El pH fue ajustado a 4. Se adicionaron 500 μL de preinóculo de *C. tropicalis* y se incubaron en un agitador rotatorio a 108 rpm y 30°C, con tapón de algodón durante 120 h. Se tomaron muestras a las 0, 2, 5, 8, 23, 24, 26, 31, 48, 72, 96 y 120 h. Todos los ensayos se hicieron por duplicado.

En cuanto a la comparación del proceso sin y con detoxificación, se realizaron fermentaciones como se describió anteriormente usando un diseño basados en un central compuesto ortogonal con 6 repeticiones del punto central y aplicando la metodología de superficie de respuesta variando la cantidad de xilosa inicial de 20 a 40 g L⁻¹, el volumen de 20 a 40 mL y la biomasa de 3 a 7 g L⁻¹.

Con respecto a la experimentación de la producción de xilitol comparando hidrolizado de raquis sin detoxificar y diferentes medios de cultivo sintéticos, las fermentaciones a escala matraz se realizaron en medio YPX, medio mínimo de xilosa (MXM: xilosa 1.5%; (NH₄)₂SO₄ 0.5%; KH₂PO₄ 0.5% y agua estéril) e hidrolizados de raquis sin proceso de detoxificación, cada uno suplementado con una concentración inicial de xilosa de 20 g L⁻¹. Las fermentaciones se realizaron en matraces Erlenmeyer de 100 mL que contenían 40 mL de medio con un pH inicial de 5.6. Los matraces Erlenmeyer se agitaron a 119 rpm y se incubaron a 30°C durante 72 h. Se tomaron muestras periódicamente hasta alcanzar la fase estacionaria.

3.3.5. Curvas de crecimiento y producción de xilitol

El crecimiento celular durante la fermentación de los hidrolizados detoxificados tanto con carbón activado como con overliming se determinó con el método de peso seco obtenido a partir de células cultivadas en medio hidrolizado, durante cada uno de los tiempos, hasta un tiempo total de 120 h. Se determinó la concentración celular espectrofotométricamente por densidad óptica (OD) a 620 nm (Genesys 20, Thermo Scientific). La biomasa se dejó secando en estufa hasta peso constante. El xilitol se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) durante estos mismos tiempos de toma de muestras (Manjarres-Pinzón et al. 2016).

3.3.6. Cuantificación de azúcares e inhibidores

Las concentraciones de xilosa, glucosa, ácido acético y HMF fueron determinadas por HPLC con una columna Biorad HPX-87H, fase móvil H_2SO_4 (0.005 M), velocidad de flujo 0.6 mL min^{-1} , temperatura 65°C y volumen de inyección $20 \mu\text{L}$ (Piñeros-Castro et al. 2011). Las muestras se prepararon por duplicado y se filtraron a través de un filtro de jeringa de membrana de nylon de 25 mm (tamaño de poro $0.45 \mu\text{m}$) antes del análisis.

3.3.7. Análisis estadístico

Análisis factorial de una sola vía se empleó para evaluar los dos métodos de detoxificación (carbón activado y overliming) y para comparar la producción de xilitol utilizando hidrolizado de raquis sin detoxificar con respecto a diferentes medios de cultivo. La metodología de superficie de respuesta (RSM) se utilizó para comparar el mejor método de detoxificación con respecto al hidrolizado de raquis sin detoxificar. Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico Statgraphics, Plus 5.1.

3.4. Resultados y discusión

3.4.1. Evaluación de condiciones de detoxificación con carbón activado y overliming

La Tabla 3-1 muestra las concentraciones de xilosa, ácido acético y glucosa con diferentes concentraciones de carbón activado. El pH, tiempo de contacto y concentración de carbón activado influyen sobre la concentración de xilosa, ácido acético y glucosa. No se detectó HMF con los valores evaluados de carbón activado. La concentración de xilosa se afecta por el pH y por la concentración de carbón activado. Las concentraciones de ácido acético y glucosa se ven afectadas por la concentración de carbón activado.

La xilosa solo fue retenida en un 3% respecto al hidrolizado sin detoxificar (15.95 g L^{-1}) con 2.5 % de carbón activado y pH de 2, siendo el tiempo indiferente para lograr la mayor reducción de inhibidores. En la literatura se reportan resultados similares con el método de carbón activado (Kamal et al. 2011). Los hidrolizados tratados por overliming (DOV) mostraron concentraciones de inhibidores superiores al DCA. El ácido acético fue de $8.30 \pm 0.18 \text{ g L}^{-1}$, glucosa de $0.23 \pm 0.003 \text{ g L}^{-1}$ y HMF de $0.05 \pm 0.003 \text{ g L}^{-1}$.

Tabla 3-1: Concentraciones de inhibidores y azúcares en hidrolizados pretratados con carbón activado (DCA) a distintos valores de pH

pH	Concentr. (% p v ⁻¹)	Tiempo (min)	Xilosa (g L ⁻¹)	Ác. acético (g L ⁻¹)	Glucosa (g L ⁻¹)
2	1	30	18.02± 0.55 ^a	6.02 ± 0.43 ^a	0.19 ± 0.01 ^a
2	1	60	18.74± 0.77 ^a	6.36 ± 0.46 ^a	0.20 ± 0.01 ^a
5.1	1	30	16.08± 1.09 ^b	7.23 ± 0.32 ^a	0.17 ± 0.01 ^a
5.1	1	60	14.96± 0.12 ^{bc}	6.54 ± 0.12 ^a	0.15 ± 0.001 ^a
2	2.5	30	15.5± 0.08 ^c	5.17 ± 0.58 ^b	0.14 ± 0.001 ^b
2	2.5	60	15.23± 2.28 ^c	5.00 ± 0.96 ^b	0.14 ± 0.14 ^b
5.1	2.5	30	13.07± 0.55 ^d	4.95 ± 0.17 ^b	0.12 ± 0.008 ^b
5.1	2.5	60	13.06± 0.03 ^d	5.72 ± 0.05 ^b	0.13 ± 0.005 ^b

Nota. No se obtuvieron valores mayores a cero del inhibidor HMF con DCA .

Las Figuras 3-1 y 3-2 muestran las curvas de crecimiento y de producción de xilitol de *C. tropicalis* con hidrolizados DCA y DOV. Tanto el crecimiento como la producción de xilitol se ven afectadas por el overliming. Entre los métodos de detoxificación evaluados resultó mejor el DCA, disminuyendo los inhibidores como ácido acético en 70%, glucosa 42%, HMF 100%, respecto al hidrolizado sin detoxificar.

La producción máxima de xilitol por DCA fue de 3.60 g L^{-1} , mientras que por overliming fue de 2.90 g L^{-1} . En ambos tratamientos de detoxificación se presentó una pérdida de xilosa de 3%, lo que reduce la eficiencia de la fermentación. Un problema adicional asociado con la detoxificación es la necesidad de instalaciones adicionales y los sistemas de proceso para eliminar los subproductos, lo cual aumenta significativamente la inversión de capital necesaria para la planta de producción de xilitol (Huang et al. 2011).

Por lo tanto, la selección de un microorganismo natural que fermente la xilosa con una alta tolerancia a los inhibidores y que sea capaz de fermentar un hidrolizado rico en xilosa para dar xilitol sin detoxificación sería lo más adecuado. Para el estudio posterior de la producción de xilitol con y sin detoxificación previa del hidrolizado se escogió el método DCA porque se obtuvo la mayor producción de xilitol

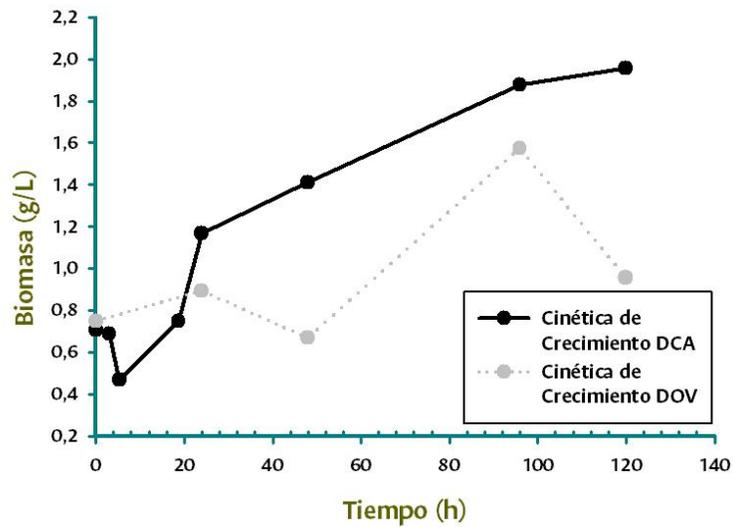


Figura 3-1: Crecimiento de *Candida tropicalis* con hidrolizados por DCA y DOV.

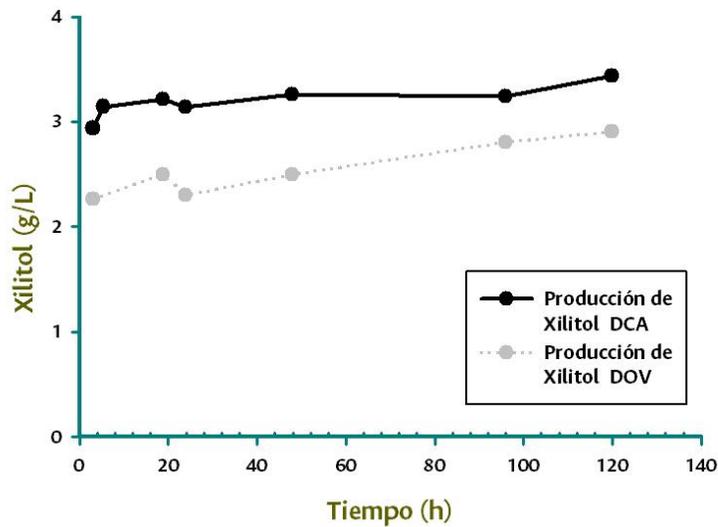


Figura 3-2: Producción de xilitol por *Candida tropicalis* con hidrolizados detoxificados por DCA y DOV.

3.4.2. Evaluación de condiciones con y sin detoxificación

El rendimiento producto/sustrato ($Y_{P/S}$) para la producción de xilitol por *C. tropicalis* con hidrolizados detoxificados por DCA y sin detoxificar se muestra en la Figura 3-3. Los resultados de $Y_{P/S}$ en el tratamiento sin detoxificar fueron mayores con valores cercanos a 0.74 g g^{-1} cuando aumenta el contenido de xilosa inicial y el volumen. Estos valores de $Y_{P/S}$ son semejantes a los obtenidos en estudios de producción de xilitol con *C. tropicalis* a partir de hidrolizado de cascarilla de arroz sin detoxificar (Huang et al. 2011).

El comportamiento de la xilosa residual con los diferentes factores principales en la producción de xilitol por *C. tropicalis* con hidrolizado detoxificado por DCA y sin detoxificar se observa en la Figura 3-4. A medida que aumenta la concentración inicial de xilosa, aumenta la xilosa residual después de la fermentación, y sucede en ambos tratamientos con y sin detoxificación, generando los mayores valores en el método sin detoxificar. En cuanto al efecto del volumen, la xilosa residual aumenta cuando se emplea mayor volumen en las muestras detoxificadas, mientras que en los tratamientos sin detoxificar no hay efecto significativo.

En el caso de la biomasa, hay menor contenido de xilosa residual en las muestras sin detoxificar cuando hay mayor cantidad de biomasa. Para minimizar la cantidad de xilosa residual y mejorar las condiciones de fermentación se aplicó un proceso de optimización a los datos experimentales confirmando que al utilizar menor contenido inicial de xilosa (13.18 g L^{-1}) en ambos casos contribuiría a disminuir esta variable. El valor de xilosa residual para el método con DCA fue de 8.72 g L^{-1} , mientras que para el hidrolizado de raquis sin detoxificar fue de 4.84 g L^{-1} . Esto quiere decir que el consumo de xilosa con el tratamiento DCA fue de 4.46 g L^{-1} , lo que genera un porcentaje de utilización de xilosa de 33.83%. En cambio, en el método sin detoxificar se consume un 8.3 g L^{-1} de xilosa, lo que arroja un porcentaje de utilización de xilosa de 62.97%.

Además, se necesita mayor volumen (25 mL) y biomasa (8.36 g L^{-1}) en el tratamiento sin detoxificar para minimizar los valores de xilosa residual. En un estudio de producción de

xilitol con *C. tropicalis* empleando hidrolizado de hemicelulosa de tuzas de maíz sin detoxificación se reportó que la mayor productividad ($0.34 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), rendimiento (0.61 g g^{-1}) y un adecuado porcentaje de consumo de xilosa (95.2%) fue para un pH de 6 (Ping et al. 2013).

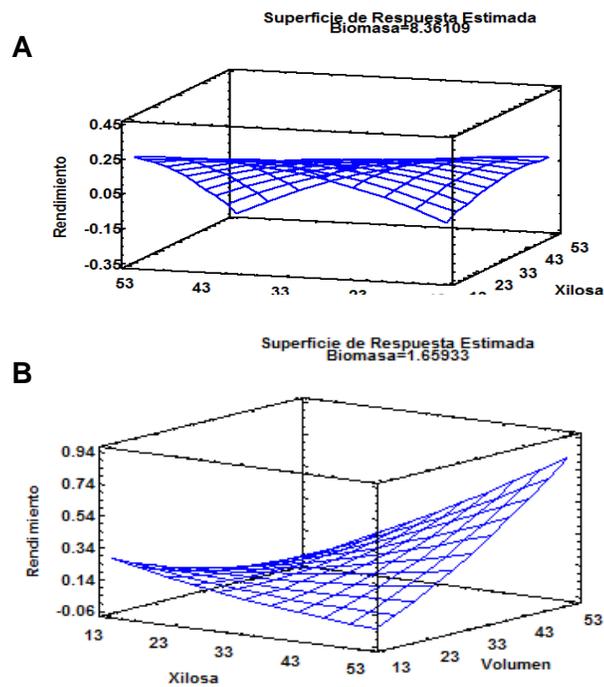


Figura 3-3: Rendimiento producto/sustrato (Y_p/s) en la producción de xilitol por *Candida tropicalis* con hidrolizado detoxificado por DCA (A) y sin detoxificar (B).

La producción de xilitol por *C. tropicalis* con hidrolizado de raquis detoxificado por DCA y sin detoxificar, teniendo en cuenta los efectos principales de los factores xilosa inicial, volumen y biomasa, se aprecian en la Figura 3-5. En el método detoxificado, a mayor volumen empleado se observa menor producción de xilitol. Las otras variables no contribuyen significativamente al modelo estadístico ajustado a los datos. Mientras que, en el tratamiento sin detoxificar, la xilosa inicial es la que presenta un efecto significativo, teniendo mayores producciones de xilitol a menor contenido inicial de xilosa. Al efectuar

el proceso de optimización, en el método con detoxificación por DCA se obtuvo un valor óptimo de 4.71 g L⁻¹ de xilitol utilizando el mayor contenido de xilosa inicial (46 g L⁻¹), el menor volumen (13.2 mL) y biomasa (1.63 g L⁻¹), mientras que en el método sin detoxificar se tuvo como resultado un valor óptimo de 2.2 g L⁻¹ de xilitol empleando el menor contenido de xilosa inicial (13.2 g L⁻¹), el menor volumen (13.2 mL) y una concentración de biomasa alta (7.6 g L⁻¹).

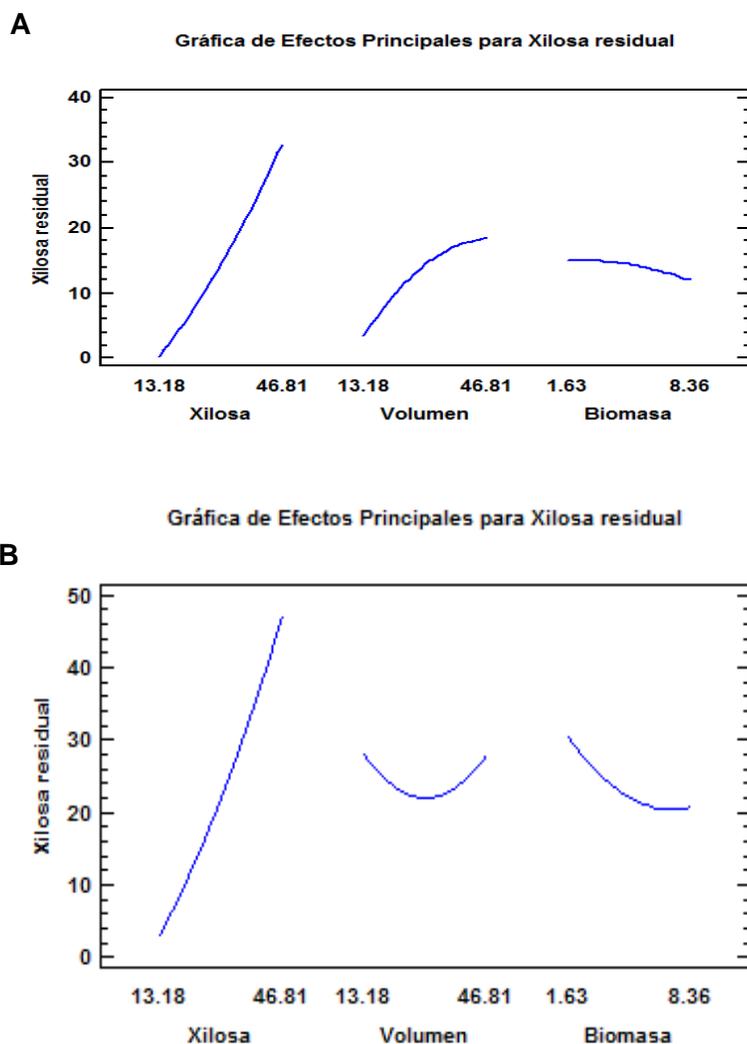


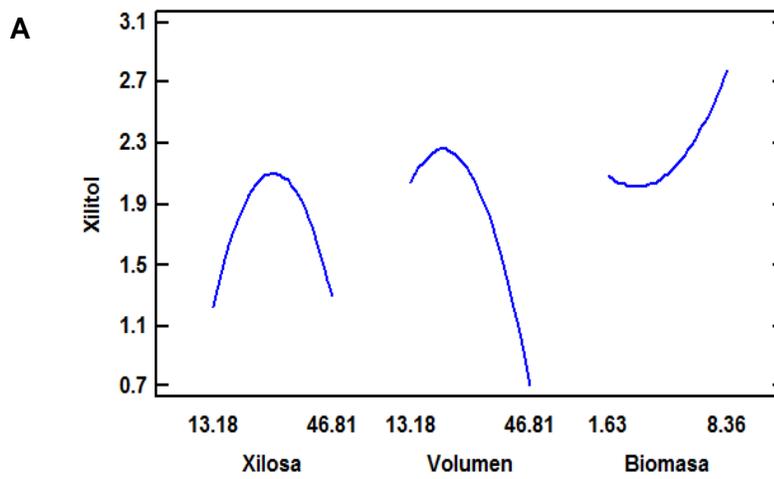
Figura 3-4: Xilosa residual en la producción de xilitol por *C. tropicalis* con hidrolizado detoxificado por DCA (A) y sin detoxificar (B)

Para seleccionar el método más adecuado para la producción de xilitol es necesario tener en cuenta todos los resultados discutidos anteriormente, como $Y_{P/S}$, xilosa residual y producción de xilitol. Es importante resaltar que en el proceso de producción de xilitol no solo se busca obtener la mayor cantidad de este metabolito, sino utilizar la mayor fracción hemicelulósica hidrolizada de raquis de palma. En el tratamiento de detoxificación con DCA se debería agregar xilosa o aplicar procesos de concentración de xilosa para generar mayor producción de xilitol. En cambio, en el tratamiento con hidrolizado de raquis sin detoxificar no se requiere el paso anterior, se produce el mayor rendimiento de producto (0.74 g g^{-1}) y se consume la mayor cantidad de xilosa (porcentaje de utilización de xilosa de 62.97%) durante el proceso de fermentación partiendo de bajas concentraciones de xilosa. Por estas razones, se seleccionó el método sin detoxificar para la producción de xilitol con *C. tropicalis* a partir de hidrolizado de raquis de palma.

La producción de xilitol con *Debaryomyces hansenii* sobre hidrolizado de raquis de palma sin detoxificar tuvo un $Y_{P/S}$ de 0.41 g g^{-1} , mostrando que el método de tratamiento previo aplicado, auto-hidrólisis a 127.9 °C en 60 min y una hidrólisis enzimática, no dio como resultado compuestos inhibidores de la fermentación (Harahap and Kresnowati 2018). Asimismo, se evaluó la producción de xilitol utilizando la misma levadura anterior sobre hidrolizados de bagazo de sorgo sin y con detoxificación con carbón activado reportando concentraciones de xilitol similares en ambos medios y valores de $Y_{P/S}$ de 1.16 y 1.18 g g^{-1} para el tratamiento en medio sin y con detoxificación, respectivamente (Ledezma-Orozco et al. 2018).

El $Y_{P/S}$ con *C. tropicalis* inmovilizadas en perlas de alginato de calcio liofilizadas para la producción de xilitol a partir de hidrolizado de tusa de maíz sin ninguna detoxificación y esterilización de los medios fue de 0.79 g g^{-1} (Yewale et al. 2017). El rendimiento de xilitol con *C. tropicalis* en medios no detoxificados de cascarilla de arroz fue de 0.71 g g^{-1} (Huang et al. 2011). Estos resultados de $Y_{P/S}$ fueron muy similares a los datos obtenidos en nuestro estudio.

Gráfica de Efectos Principales para Xilitol



Gráfica de Efectos Principales para Xilitol

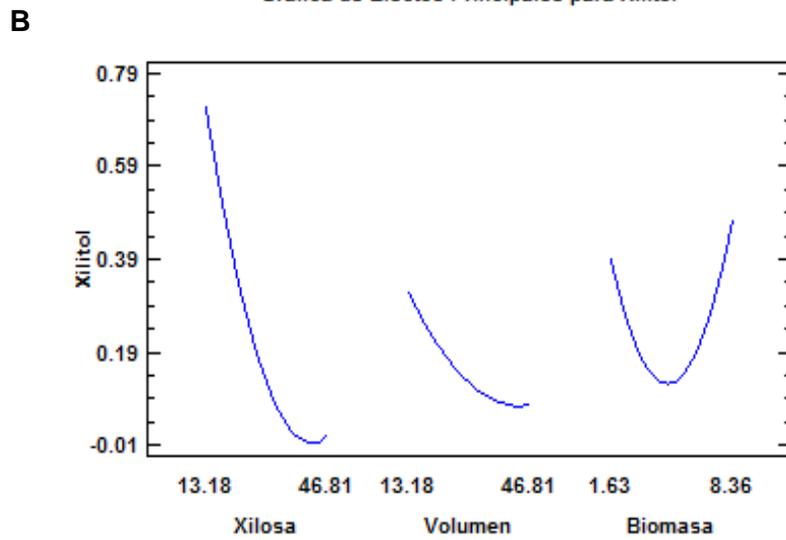


Figura 3-5: Producción de xilitol por *C. tropicalis* con hidrolizado detoxificado por DCA (A) y sin detoxificar (B)

3.4.3. Efecto de la composición del medio sobre la producción de biomasa y xilitol

La biomasa y las fases de crecimiento durante la fermentación se pueden observar en la Figura 3-6. El medio YPX favoreció el comportamiento cinético con la mayor concentración de biomasa de 2.52 g L^{-1} a las 30 h. La fase de crecimiento exponencial en los medios YPX fue de 17 h, mientras que en el medio MMX fue de 48 h. Por lo tanto, el YPX se convirtió en un medio atractivo para la producción adecuada de biomasa. Estos resultados mostraron la importancia del extracto de levadura en los medios de cultivo y su efecto en la producción de biomasa (Dasgupta et al. 2017). Algunos estudios han demostrado que el nitrógeno es necesario no solo para la producción de biomasa sino también para la producción de xilitol; específicamente, el extracto de levadura tiene un efecto significativo en la producción de este metabolito (Ling et al. 2011)

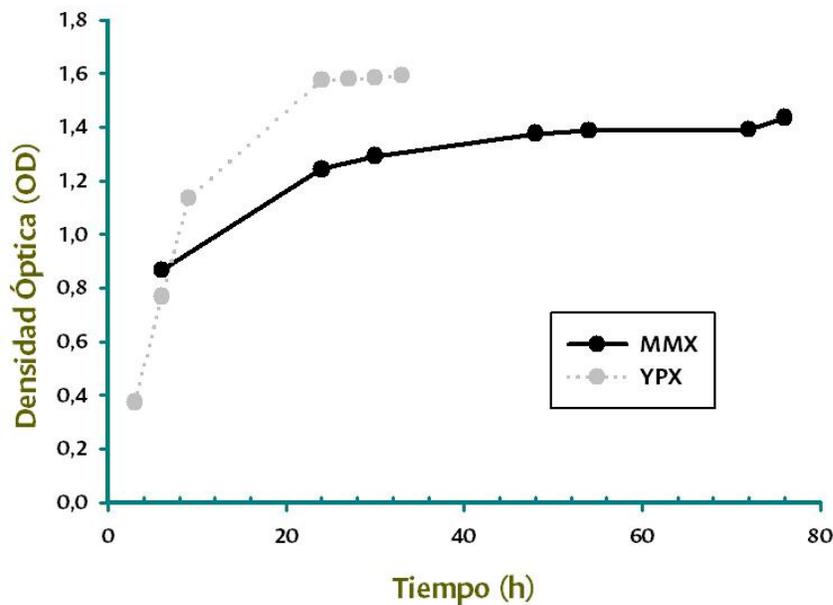


Figura 3-6: Comportamiento cinético de *Candida tropicalis* en medio sintético YPX y MMX.

La fermentación de xilosa para la producción de xilitol utilizando *C. tropicalis* en medios de HR no detoxificados se ilustra en la Figura 3-7. Durante las primeras 34 h, la captación de xilosa fue principalmente para la producción de biomasa; después de este tiempo se observó un aumento significativo en la producción de xilitol desde 1.67 g L⁻¹ hasta 5.5 g L⁻¹ en 14 h, alcanzando una máxima concentración de 7.15 g L⁻¹ a las 72 h de fermentación. Durante la hidrólisis ácida de raquis se liberan compuestos tóxicos como hidroximetilfurfural, ácido acético y glucosa (Manjarres-Pinzon et al. 2017). Los inhibidores pueden afectar levemente la actividad metabólica de la levadura durante la fermentación del hidrolizado (Lenihan et al. 2010). Aunque algunos estudios muestran que la producción de biomasa y xilitol podrían ser mayores con un proceso de detoxificación (Mussatto and Roberto 2004), los resultados obtenidos con *C. tropicalis* demostraron que se presenta un mayor rendimiento y menor xilosa residual después del proceso de fermentación con hidrolizados de raquis sin detoxificar.

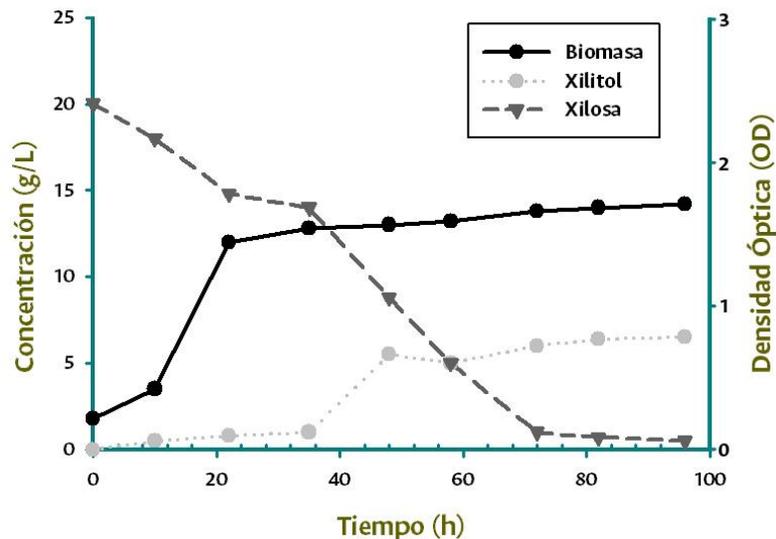


Figura 3-7: Comportamiento cinético de *Candida tropicalis* durante la producción de xilitol a partir de medio hidrolizado no detoxificado (HR) ($t = 96$ h)

La producción de xilitol utilizando *C. tropicalis* en medio HR se observó desde la mitad de la fase de crecimiento exponencial, en contraste con otras cepas productoras de xilitol que producen este metabolito al final de la fase exponencial o incluso más en la fase estacionaria de crecimiento (Lorliam et al. 2017; Mardawati et al. 2015). Esta

característica podría reducir el tiempo de fermentación y los costos en la producción de xilitol. Parámetros fermentativos como: productividad volumétrica de xilitol (Q_P), coeficiente de rendimiento de la masa celular ($Y_{X/S}$) y coeficiente de rendimiento del xilitol con respecto a la masa celular ($Y_{P/X}$), se calcularon mediante regresión lineal de los valores alcanzados en la fermentación (Tabla 3-2).

Tabla 3-2: Parámetros fermentativos utilizando medio HR.

Parámetros	HR
S_0 (g L ⁻¹)	20
S_f (g L ⁻¹)	2.68
Tiempo de fermentación(h)	72
Xilosa consumida (%)	86.6
P_f (g L ⁻¹)	7.15
X_f (g L ⁻¹)	3.4
Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0.10
$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	0.41
μ_{max} (h ⁻¹)	0.45

S_0 : concentración inicial de xilosa, P_f : concentración máxima de xilitol, X_f : concentración máxima de células, Q_P : productividad volumétrica del xilitol, $Y_{P/S}$: coeficiente de rendimiento de xilitol con respecto a la xilosa.

Algunos estudios han reportado la fermentación de xilosa y la producción de xilitol utilizando hidrolizado de raquis y *C. tropicalis* y *Debaryomyces hansenii* ITB CC R85 (Kresnowati et al. 2016; L. Mohamad et al. 2016; N. Mohamad, Mustapa-Kamal, and Liew 2009). Los parámetros cinéticos de estos estudios mostraron un bajo rendimiento durante la fermentación. Los valores de $Y_{P/S}$ (g/g) (0.098-0.24) de estos estudios fueron más bajos que los obtenidos por nuestra investigación (0.41). Sin embargo, es difícil comparar nuestros parámetros cinéticos con los de otros autores porque las condiciones de fermentación fueron diferentes. En este estudio, *C. tropicalis* pudo usar xilosa del raquis con una conversión del 86%, mientras que en el trabajo de Kresnowati et al. (2016) reportaron 58.4% de conversión de xilosa con *Debaryomyces hansenii* ITB CC R85.

Este estudio puede considerarse un punto de partida para futuras optimizaciones en términos de condiciones de cultivo, medio, pH, temperatura, así como en etapas posteriores de ampliación de la producción biotecnológica de xilitol utilizando hidrolizado de raquis y *C. tropicalis*.

3.5. Conclusiones

Al comparar los métodos de detoxificación de hidrolizado de raquis de palma, el pretratamiento con carbón activado al 2.5%, pH 4 y tiempo de contacto de 30 min tuvo mayor producción de xilitol, los niveles más bajos de compuestos inhibidores como ácido acético, glucosa y de HMF y una menor degradación de xilosa con respecto al pretratamiento por overliming.

En la evaluación del pretratamiento con detoxificación con carbón activado y sin detoxificar, se seleccionó este último porque no se requiere agregar xilosa o aplicar procesos de concentración de xilosa para generar mayor producción de xilitol, se produce el mayor rendimiento de producto (0.74 g g^{-1}) y se consume la mayor cantidad de xilosa durante el proceso de fermentación. En la comparación de los diferentes medios de cultivo frente al hidrolizado de raquis sin detoxificar, la composición del medio fue importante para la producción de biomasa, especialmente la fuente de nitrógeno como el extracto de levadura. El medio YPX fue el medio sintético más adecuado para la producción de biomasa porque mostró la mayor concentración en el menor tiempo. El hidrolizado de raquis sin detoxificar es un medio apropiado para la producción de xilitol por *Candida tropicalis* en comparación con los otros medios sintéticos.

Referencias

- Carvalho, F. et al. 2005. "Evaluation of the Detoxification of Brewery's Spent Grain Hydrolysate for Xylitol Production by *Debaryomyces Hansenii* CCMI 941." *Process Biochemistry* 40(3-4): 1215-23.
- Dasgupta, Diptarka, Sheetal Bandhu, Dilip K. Adhikari, and Debashish Ghosh. 2017. "Challenges and Prospects of Xylitol Production with Whole Cell Bio-Catalysis: A Review." *Microbiological Research* 197: 9-21.

- Harahap, Budi Mandra, and Made Tri Ari Penia Kresnowati. 2018. "Moderate Pretreatment of Oil Palm Empty Fruit Bunches for Optimal Production of Xylitol via Enzymatic Hydrolysis and Fermentation." *Biomass Conversion and Biorefinery* 8(2): 255–63.
- Hassan, Osman et al. 2013. "Optimization of Pretreatments for the Hydrolysis of Oil Palm Empty Fruit Bunch Fiber (EFBF) Using Enzyme Mixtures." *Biomass and Bioenergy* 56(0): 137–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.04.021>.
- Huang, Chiung Fang, Yi Feng Jiang, Gia Luen Guo, and Wen Song Hwang. 2011. "Development of a Yeast Strain for Xylitol Production without Hydrolysate Detoxification as Part of the Integration of Co-Product Generation within the Lignocellulosic Ethanol Process." *Bioresource Technology* 102(3): 3322–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.111>.
- Kamal, Siti M. Mustapa, Nurul L. Mohamad, Abdul G. Liew Abdullah, and Norhafizal Abdullah. 2011. "Detoxification of Sago Trunk Hydrolysate Using Activated Charcoal for Xylitol Production." *Procedia Food Science* 1: 908–13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.137>.
- Kresnowati, M.T.A.P., Tjandra Setiadi, Tan Mellisa Tantra, and David Rusdi. 2016. "Microbial Production of Xylitol from Oil Palm Empty Fruit Bunch Hydrolysate: Effects of Inoculum and PH." *Journal of Engineering and Technological Sciences* 48(5): 523–33.
- Ledezma-Orozco, Edgar et al. 2018. "Producción de Xilitol a Partir de Hidrolizados Ácidos No Detoxificados de Bagazo de Sorgo Por." *Agrociencia* 52: 1095–1106.
- Lenihan, P. et al. 2010. "Dilute Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass." *Chemical Engineering Journal* 156(2): 395–403.
- Ling, Hongzhi, Keke Cheng, Jingping Ge, and Wenxiang Ping. 2011. "Statistical Optimization of Xylitol Production from Corn cob Hemicellulose Hydrolysate by *Candida Tropicalis* HDY-02." *New Biotechnology* 28(6): 673–78.
- Lorliam, Wanlapa et al. 2017. "Optimization of Xylitol Production by *Candida Tropicalis* A26." *Chiang Mai Journal of Science* 44(1): 50–58.
- Manjarres-Pinzon, Mario Arias-Zabala, Guillermo Correa-Londono, and Eduardo Rodriguez-Sandoval. 2017. "Xylose Recovery from Dilute-Acid Hydrolysis of Oil Palm (*Elaeis Guineensis*) Empty Fruit Bunches for Xylitol Production." *African Journal of Biotechnology* 16(41): 1997–2008.
- Manjarres-Pinzón, Katherine et al. 2016. "Producción de Xilitol Por *Candida Guilliermondii* a Partir de Fermentación de Residuos de Palma de Aceite." *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 19(2): 403–9.
- Mardawati, Efri et al. 2015. "Microbial Production of Xylitol from Oil Palm Empty Fruit Bunches Hydrolysate: The Effect of Glucose Concentration." *Journal of the Japan Institute of Energy* 94(8): 769–74.
- Mohagheghi, Ali, Mark Ruth, and Daniel J. Schell. 2006. "Conditioning Hemicellulose Hydrolysates for Fermentation: Effects of Overliming PH on Sugar and Ethanol

- Yields." *Process Biochemistry* 41(8): 1806–11.
- Mohamad, Lina et al. 2016. "Dynamic Mathematical Modelling of Reaction Kinetics for Xylitol Fermentation Using *Candida Tropicalis*." *Biochemical Engineering Journal* 111: 10–17.
- Mohamad, NL, SM Mustapa-Kamal, and A.G. Liew. 2009. "Effects of Temperature and PH on Xylitol Recovery from Oil Palm Empty Fruit Bunch Hydrolysate by *Candida Tropicalis*." *Journal of Applied Sciences* 9(17): 3192–3195.
- Mpabanga, Tandiwe P., Anuj K. Chandel, Silvio Silvério Da Silva, and Om V. Singh. 2012. D-Xylitol: Fermentative Production, Application and Commercialization *D-Xylitol*. eds. Silvio Silvério da Silva and Anuj Kumar Chandel. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Mussatto, Solange I., and Inês C. Roberto. 2008. "Establishment of the Optimum Initial Xylose Concentration and Nutritional Supplementation of Brewer's Spent Grain Hydrolysate for Xylitol Production by *Candida Guilliermondii*." *Process Biochemistry* 43(5): 540–46.
- Mussatto, Solange I, and Inês C. Roberto. 2004. "Alternatives for Detoxification of Diluted-Acid Lignocellulosic Hydrolyzates for Use in Fermentative Processes: A Review." *Bioresource Technology* 93(1): 1–10.
- Parajó, Juan Carlos, Herminia Domínguez, and Jose Manuel Domínguez. 1998. "Biotechnological Production of Xylitol. Part 1: Interest of Xylitol and Fundamentals of Its Biosynthesis." *Bioresource Technology* 65(3): 191–201.
- Piñeros-Castro, Yineth et al. 2011. "Producción de Azúcares Fermentables Por Hidrólisis Enzimática de Cascarilla de Arroz Pretratada Mediante Explosión Con Vapor. (Spanish)." *Revista Ion* 24(2): 23–28.
- Ping, Yuan, Hong Zhi Ling, Gang Song, and Jing Ping Ge. 2013. "Xylitol Production from Non-Detoxified Corncob Hemicellulose Acid Hydrolysate by *Candida Tropicalis*." *Biochemical Engineering Journal* 75: 86–91.
- Shamsudin, Saleha et al. 2012. "Effect of Steam Pretreatment on Oil Palm Empty Fruit Bunch for the Production of Sugars." *Biomass and Bioenergy* 36: 280–88.
- Taherzadeh, M. J., and K. Karimi. 2007. "Acid-Based Hydrolysis Processes Forr Ethanol from Lignocellulosic Materials: A Review." *Bioresources Technology* 2(3): 472–99.
- Yewale, Tatyaso et al. 2017. "Xylitol Production from Non-Detoxified and Non-Sterile Lignocellulosic Hydrolysate Using Low-Cost Industrial Media Components." *3 Biotech* 7(1): 1–9.

4. Capítulo 4

Optimización de las condiciones de fermentación a escala de matraz para la producción de xilitol en hidrolizados de raquis de palma por *Candida tropicalis*.

4.1. Resumen

El objetivo de este estudio fue optimizar diferentes condiciones de fermentación en la producción de xilitol con *Candida tropicalis* utilizando hidrolizado de raquis de palma no detoxificado. La metodología de superficie de respuesta (RSM) se empleó para optimizar el proceso de producción de xilitol bajo diferentes condiciones de proceso. Los parámetros de fermentación optimizados en matraz Erlenmeyer de 100 mL fueron: pH de 6.0, biomasa de 5.42 g L⁻¹, volumen de 26 mL y xilosa inicial de 20 g L⁻¹. A estas condiciones de proceso se obtuvo una predicción de xilitol de 4.3 g/L y un valor de xilosa residual de 12.6 g L⁻¹. Estas condiciones son el punto de partida para realizar el proceso de la producción de xilitol con *C. tropicalis* a escalas mayores.

Palabras clave: *Candida tropicalis*, fermentación, hidrolizado, racimos vacíos de palma de aceite, xilitol, optimización

4.2. Introducción

Para la aplicación industrial de xilitol, su rendimiento y el consumo de sustrato deben ser altos y los costos de producción bajos. La producción de xilitol a bajo costo implica el uso de una fuente de xilosa sin necesidad de detoxificación, reciclaje de células de levadura, alto rendimiento de xilosa a xilitol, alta productividad, menos aportación de energía, fácil procesamiento posterior para purificar el xilitol y uso de medios de fermentación procedentes de subproductos industriales. Por lo tanto, es necesario que el carbono, nitrógeno, minerales y otros nutrientes, incluidos los parámetros del proceso, sean económicamente competitivos para garantizar la viabilidad comercial del proceso con un mejor rendimiento de la fermentación (Yewale et al. 2017).

Además de la naturaleza y composición de los hidrolizados, que varían ampliamente dependiendo del tipo de materia prima y de las condiciones de hidrólisis empleadas, la producción de xilitol depende de varias variables de proceso como: pH, concentración de sustrato, nivel de inóculo y composición del medio, entre otros (Silva and Roberto 2001b). El método clásico de estudiar una variable a la vez puede ser efectivo en algunas situaciones, pero no considera los efectos combinados de todos los factores involucrados. En los procesos de fermentación, donde las variables operativas interactúan e influyen mutuamente en los efectos sobre la respuesta, es esencial que el método de optimización tenga en cuenta estas interacciones, de modo que se pueda determinar un conjunto de condiciones experimentales óptimas (Silva and Roberto 2001b).

La metodología de superficie de respuesta (RSM) se puede definir como una colección de herramientas estadísticas y matemáticas que son útiles para modelar y optimizar una respuesta experimental influenciada por muchas variables (Ling et al. 2011; Silva and Roberto 2001b). RSM se puede dividir en los siguientes pasos: (1) selección de las variables independientes y respuestas, (2) selección del diseño experimental, (3) ejecución de experimentos y recopilación de resultados, (4) modelado matemático de los datos experimentales, (5) dibujo de superficies de respuesta, (6) verificación de modelos mediante análisis de varianza y, finalmente, (7) identificación de condiciones óptimas.

Las respuestas experimentales a los experimentos de diseño generalmente se ajustan a funciones cuadráticas y las relaciones de segundo orden pueden aproximarse razonablemente bien a la mayoría de los sistemas de fermentación (Sampaio et al. 2017).

Sin embargo, cuando se debe optimizar más de una respuesta, es necesario usar las llamadas funciones de deseabilidad. RSM se ha utilizado a menudo para optimizar diferentes bioprocesos y también se ha aplicado con éxito en la bioconversión de xilosa a xilitol por las levaduras *Candida tropicalis* (Ling et al. 2011; Yewale et al. 2017), *Candida guilliermondii* (Silva and Roberto 2001b) y *Debaryomyces hansenii* (Sampaio et al. 2017). Para la fecha, no se reportado la optimización del proceso de producción de xilitol a partir de hidrolizados de raquis de palma. Por consiguiente, el objetivo de este estudio fue efectuar la optimización de diferentes condiciones de fermentación como: tamaño del inóculo, concentración de xilosa, pH y volumen, en la producción de xilitol con *C. tropicalis* utilizando hidrolizado de raquis de palma no detoxificado.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Materiales

Los racimos vacíos de frutos o raquis de palma fueron suministrados por la planta de beneficio Palmares del Oriente S.A.S. Los racimos se lavaron, secaron y molieron en una máquina pica-pasto (Molino #1, JM. ESTRADA.S.A, La Estrella, Colombia), hasta un tamaño de partícula de 3 a 5 cm.

4.3.2. Hidrólisis ácida del raquis de palma

La hidrólisis ácida de los raquis se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 mL con una relación 1:8 sólido/líquido, tomando 40 g del raquis y 320 mL de ácido sulfúrico diluido al 2%. Los matraces fueron esterilizados por 30 min a 121°C y posteriormente sumergidos

en un baño de hielo para detener la hidrólisis. Finalmente, se filtró todo el contenido del hidrolizado y se ajustó el pH a 5.5- 5.6 con perlas de NaOH. El hidrolizado obtenido no se detoxificó, pero fue suplementado con 4 g L⁻¹ extracto de levadura, 3 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.5 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O y 0.1 g L⁻¹ CaCl₂·2H₂O.

4.3.3. Microorganismo y preparación del preinóculo

Las células de *Candida tropicalis* fueron mantenidas con una edad de cultivo de 24 h en agar PDA a 30°C. Para la preparación del preinóculo se tomaron colonias aisladas del cultivo *C. tropicalis* y se suspendieron en 100 mL cultivado en medio sintético de xilosa (20 g L⁻¹), extracto de levadura y peptona (YPX), pH 5.6, 119 rpm y 30°C durante 24 h. Después, las células se recuperaron por centrifugación (2500 rpm, 20 min). La suspensión de células obtenidas (alrededor de 5 g L⁻¹) fue utilizada para inocular los matraces a diferentes condiciones de fermentación.

4.3.4. Fermentación en matraz agitado y optimización

El medio de cultivo para el estudio de optimización fue hidrolizado de raquis de palma (HR) suplementado con 4 g extracto de levadura/L, 3 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.5 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O y 0.1 g L⁻¹ CaCl₂·2H₂O y un contenido inicial de xilosa de 20 ± 2 g L⁻¹. Los cuatro factores seleccionados y evaluados que afectan la fermentación de xilosa y la producción de xilitol a escala de matraz de 100 mL fueron: el tamaño del inóculo, la concentración de xilosa inicial, el pH y el volumen de los medios. Los matraces fueron esterilizados a 121°C y 20 min; se dejaron enfriar y fueron inoculados acorde a los niveles de biomasa arrojados por el diseño. Las muestras se tomaron a las 48 y 96 h de fermentación.

La metodología de superficie de respuesta (RSM) se utilizó para optimizar el proceso de producción de xilitol bajo diferentes condiciones de fermentación (Manjarres-Pinzon et al. 2017). Se utilizó un diseño basado en Box-Behnken con 30 corridas y seis repeticiones del punto central durante 96 h de fermentación. Las variables independientes y sus

niveles fueron: tamaño del inóculo (3-7 g L⁻¹), concentración de xilosa (20-40 g L⁻¹), pH (4-6) y volumen (26- 40 mL). Se tomaron como variables dependientes el contenido de xilosa y la producción de xilitol. Por cada una de las variables dependientes, se ajustó una ecuación de un modelo completo de segundo orden (Ecuación 1).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i (X_i) + \sum_{i=1}^4 \beta_{4+i} (X_i^2) + \sum_{i=1}^4 \sum_{i'>i}^4 \beta_{6+i+i'} (X_i X_{i'}), \quad i = 1,2,3,4 \quad (1)$$

Donde Y representa el valor esperado de la variable de respuesta (contenido de xilosa y xilitol), β_i representan los coeficientes estimados del modelo, X1, X2, X3 y X4 son las variables independientes (tamaño del inóculo, concentración de xilosa, pH y volumen). El análisis de regresión se realizó usando el software Design- Expert 6.0, Stat-Ease Inc. (Minneapolis, MN, 473 USA). Adicionalmente, se realizó la validación experimental de los parámetros optimizados por medio de RSM que mostraron un máximo de xilitol.

4.3.5. Métodos analíticos

Las concentraciones de xilosa y xilitol se determinaron utilizando un sistema HPLC (Shimadzu Prominence), con un detector de RI, equipado con una columna Aminex HPX-87H (Biorad). La elución se llevó a cabo con H₂SO₄ acuoso (0,005 M) a un caudal de 0.6 mL/min. La temperatura del horno se mantuvo a 50°C. El volumen de inyección fue de 20 µL (Manjarres-Pinzón et al. 2016). Las muestras se prepararon por duplicado y se filtraron a través de un filtro de jeringa de membrana de nylon de 25 mm (tamaño de poro 0.45 µm) antes del análisis.

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. Estudio de optimización

La producción de xilitol y el consumo de la xilosa a escala de matraz agitado a diferentes condiciones experimentales se muestran en la Tabla 4-1. La máxima concentración de xilosa residual (29.6 g L⁻¹) se obtuvo a pH 6, 3 g L⁻¹ de biomasa, 40 g L⁻¹ de sustrato y 40 mL de volumen. La mayor concentración de xilitol (6.5 g L⁻¹) se dio a las siguientes

condiciones: pH 3, 5 g L⁻¹ de biomasa, 30 g L⁻¹ de sustrato y 33 mL de volumen. La mínima xilosa residual (0.33 g L⁻¹) se dio a pH 5, 5 g L⁻¹ de biomasa, 10 g L⁻¹ de sustrato y 33 mL de volumen. Para el caso de la xilosa, los factores que influyen significativamente en esta variable fueron el sustrato y volumen. La mayor productividad (0.34 g L⁻¹ h⁻¹), rendimiento (0.61 g g⁻¹) y un adecuado porcentaje de consumo de xilosa (95.2%) fue para un pH de 6 en la producción de xilitol con *C. tropicalis* empleando hidrolizado de tusas de maíz sin detoxificación (Ping et al. 2013). Incrementar el aprovechamiento de la fracción hemicelulósica del raquis de palma es lo que se busca generalmente en un proceso de fermentación para que sea económicamente factible; es decir, entre menor xilosa residual haya al final, mayor es el aprovechamiento del hidrolizado de raquis de palma. Este parámetro se tuvo en cuenta en el momento de realizar la optimización del proceso.

Tabla 4-1: Diseño Box-Behnken (BBD) aplicado en producción de xilitol a escala de matraz en hidrolizados de raquis de palma y que corresponden a los experimentos usados en el RSM

Corrida	pH	Biomasa(g/L)	Sustrato (g/L)	Volumen (mL)	Variables de respuesta	
					Xilosa residual (g/L)	Xilitol(g/L)
1	5	5	30	33	13,93	4,33
2	5	5	30	33	12,15	4,34
3	5	5	30	19	4,15	5,39
4	6	3	20	26	0,83	3,59
5	4	7	40	40	25,29	3,74
6	6	3	20	40	7,48	2,32
7	4	3	20	26	1,27	3,35
8	6	3	40	26	26,79	1,92
9	6	7	40	40	27,10	1,62
10	5	5	30	33	12,24	3,92
11	3	5	30	33	10,48	6,56
12	5	5	30	33	12,82	4,29
13	6	7	20	40	9,02	2,80
14	5	5	30	33	12,66	4,04
15	4	7	40	26	18,75	5,06
16	6	3	40	40	29,64	1,63
17	6	7	40	26	15,68	3,85
18	5	5	30	47	20,97	2,06
19	4	3	20	40	11,07	2,39
20	4	7	20	40	10,32	3,07
21	6	7	20	26	0,70	3,97
22	4	3	40	40	20,45	4,24
23	7	5	30	33	11,22	4,07
24	5	5	10	33	0,33	2,14
25	5	5	30	33	11,75	4,68
26	5	1	30	33	12,83	4,19
27	5	5	50	33	28,43	3,75
28	5	9	30	33	13,74	3,97
29	4	3	40	26	17,13	4,65
30	4	7	20	26	1,28	3,48

La Figura 4-1 presenta los efectos de la biomasa y del pH sobre la producción de xilitol mientras las otras dos variables se mantuvieron constantes. Como se observa, a mayor concentración de biomasa inicial y mayor pH se obtiene mayor concentración de xilitol. De acuerdo con el análisis del modelo planeado, se obtuvo un efecto significativo en la producción del xilitol del pH, volumen, de la interacción pH y sustrato, y un efecto cuadrático del sustrato y el volumen. El modelo cuadrático tuvo un ajuste R^2 de 0.8365 y el análisis de varianza mostró que el modelo es significativo ($F= 8.52$) (Ver anexo A) Cuanto más cercano sea el valor de R^2 a 1, mejor será la correlación entre los valores experimentales y los datos estimados del modelo (Lorliam et al. 2017; Yewale et al. 2017). Las regresiones múltiples realizadas por el software generaron la siguiente ecuación como una función empírica de las variables empleadas en el estudio:

$$\begin{aligned} \text{Xilitol} = & -10.45514 + 0.06665 (\text{pH}) + 0.4917 (\text{Biomasa}) + 0.5899 (\text{Sustrato}) + 0.4142 \\ & (\text{Volumen}) + 0.1301(\text{pH}^2) - 0.04427 (\text{Biomasa}^2) - 4.60487\text{E}-003(\text{Sustrato}^2) - 5.43031\text{E}- \\ & 003(\text{Volumen}^2) + 0.064684(\text{pH}) (\text{Biomasa}) - 0.056593(\text{pH}) (\text{Sustrato}) - 0.016529(\text{pH}) \\ & (\text{Volumen}) + 5.38781\text{E}-004 (\text{Biomasa})(\text{Sustrato}) - 9.84844\text{E}-003(\text{Biomasa})(\text{Volumen}) \\ & - 3.87455\text{E}-004(\text{Sustrato})(\text{Volumen}) \end{aligned}$$

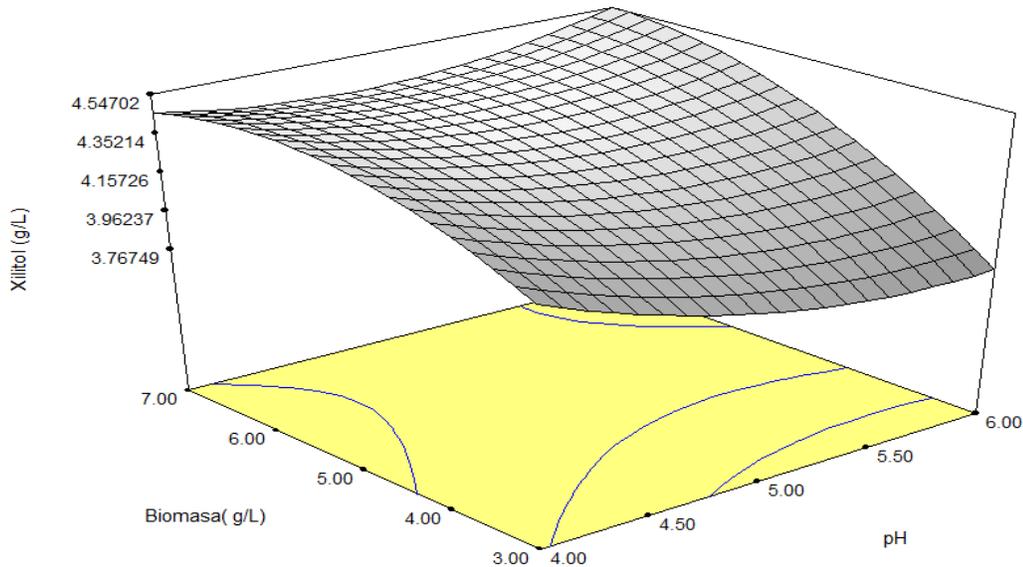


Figura 4-1: Superficie de respuesta para la producción de xilitol como función del pH y la biomasa inicial.

Con el fin de optimizar la producción de xilitol se aplicó un método de función de deseabilidad donde se emplearon las siguientes restricciones: pH en el rango de 4 a 6, biomasa en el rango de 3 a 7 g L⁻¹, sustrato mínimo en intervalo de 20 a 40 g L⁻¹, volumen en el rango de 26 a 40 mL y máxima producción de xilitol con un intervalo experimental de 1.6 a 6.5 g L⁻¹. Con estos parámetros se obtuvieron 10 soluciones óptimas con valores de deseabilidad entre 0.639 a 0.748 y producciones de xilitol entre 3.94 y 4.38 g L⁻¹ (Ver Anexo B). El volumen y la concentración de sustrato de las funciones de deseabilidad tuvieron valores muy cercanos entre sí y se ubicaron en 26 mL y 20 g L⁻¹, respectivamente.

No necesariamente el medio que contiene la concentración inicial más alta de xilosa da la máxima producción de xilitol, porque diferentes levaduras tienen distintas capacidades de bioconversión, y los diversos hidrolizados presentan diferentes composiciones químicas que también pueden interferir en el rendimiento de la levadura (Mussatto and Roberto 2008). Por otro lado, valores de pH iguales a 6 presentaron mayores producciones de xilitol. Al evaluar la producción de xilitol con *C. tropicalis* en hidrolizado de maíz también se concluyó que al aumentar el pH de 4.5 a 6 conducía a un mayor incremento en la productividad y rendimiento de xilitol, y también a pH 6 se reportó el mayor rendimiento de biomasa en el consumo de xilosa (Cheng et al. 2009).

En cuanto a la biomasa, la función de deseabilidad tomó diferentes valores sin una tendencia clara y con un rango entre 3.34 y 7 g L⁻¹ de biomasa. Las mayores producciones de xilitol tuvieron resultados con concentraciones de biomasa entre 5.42 y 7 g L⁻¹, en donde se seleccionó el menor valor entre estos dos. Una de las razones de esta decisión se basa en que una baja cantidad de inóculo y un largo ciclo de fermentación producen menores rendimientos de xilitol, y una alta cantidad de inóculo podría resultar en un alto consumo de xilosa para el crecimiento celular en la etapa inicial de la fermentación, lo que resulta en una disminución de la tasa de conversión del xilitol (Xu et al. 2019). En este caso se descartaría tomar valores cercanos a los datos extremos del rango experimental para la biomasa inicial de la fermentación (3 y 7 g L⁻¹). Por lo tanto, las condiciones de la solución de deseabilidad seleccionada tuvo los

siguientes criterios: pH de 6.0, biomasa de 5.42 g L^{-1} , volumen de 26 mL y sustrato de 20 g L^{-1} . A estas condiciones de proceso se obtuvo una predicción de xilitol de 4.3 g/L , un valor de xilosa residual de 12.6 g L^{-1} y un valor de la función de deseabilidad de 0.73. Estas condiciones son el punto de partida para realizar el proceso de producción de xilitol con *C. tropicalis* a otras escalas mayores.

4.4.2. Validación del modelo de optimización

La verificación de las condiciones óptimas calculadas para la producción de xilitol se realizó llevando a cabo un experimento real con unas condiciones muy similares a las reportadas por la función de deseabilidad. Los parámetros utilizados para la fermentación fueron: pH 5.6, volumen de 26 mL, sustrato inicial de 21 g L^{-1} y una biomasa inicial de 5.2 g L^{-1} . El rendimiento de xilitol fue de 0.35 g g^{-1} con una producción máxima de xilitol de 5.6 g L^{-1} y una xilosa residual de 7.09 g L^{-1} después de 96 h de fermentación (Figura 4-2). El punto de predicción del modelo para el xilitol fue 4.3 g L^{-1} ; esto quiere decir que la concentración de xilitol obtenida experimentalmente está 23% por encima del valor estimado del modelo, lo que coincide con la función de deseabilidad del modelo (0.73). Lo anterior indica que el modelo propuesto por la RSM tiene una buena capacidad para predecir los valores de producción de xilitol con *C. tropicalis* en el hidrolizado de raquis de palma (Lorliam et al. 2017; Sampaio et al. 2017; Silva and Roberto 2001b).

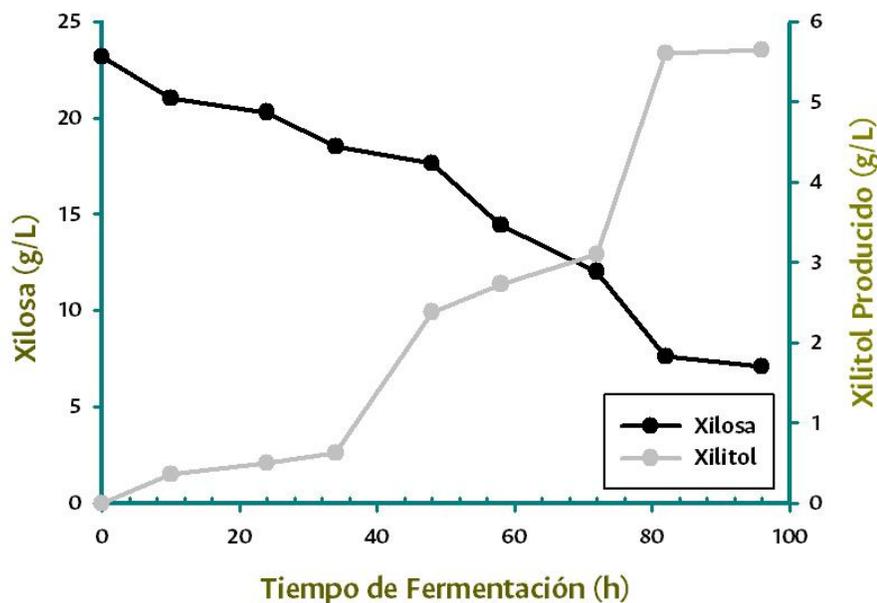


Figura 4-2: Cinética de consumo de xilosa y producción de xilitol en hidrolizados de raquis de palma por *Candida Tropicalis* a escala de matraz

La fermentación de xilosa para la producción de xilitol utilizando *C. tropicalis* en medios de hidrolizado de raquis no detoxificados se ilustra en la Fig. 4-2. Durante las primeras 34 h, la captación de xilosa fue principalmente para la producción de biomasa; después de este tiempo se observó un aumento significativo en la producción de xilitol desde 2.38 g L⁻¹ hasta 5.6 g L⁻¹, alcanzando la máxima concentración a las 96 h de fermentación.

4.5. Conclusiones

Estos resultados son interesantes desde un punto de vista económico, ya que el medio de fermentación fue un hidrolizado de raquis de palma sin detoxificar, lo que representa una reducción de costos en los pretratamientos del medio. Además, se demostró que al optimizar el proceso de producción de xilitol con *C. tropicalis* a partir de hidrolizados de raquis se obtuvo la siguiente combinación de las condiciones de operación: pH de 6.0, biomasa de 5.42 g L⁻¹, volumen de 26 mL y concentración de xilosa inicial de 20 g L⁻¹. Con estas condiciones de proceso optimizadas se puede producir 4.3 g L⁻¹ de xilitol. La validación del modelo propuesto presentó un buen ajuste con respecto a los datos experimentales. El siguiente paso para profundizar en el estudio de la fermentación del

xilitol con *C. tropicalis* debe ser la producción en un biorreactor utilizando como punto de referencia las condiciones optimizadas.

Referencias

- Cheng, Ke Ke et al. 2009. "Optimization of PH and Acetic Acid Concentration for Bioconversion of Hemicellulose from Corncobs to Xylitol by *Candida Tropicalis*." *Biochemical Engineering Journal* 43(2): 203–7.
- Ling, Hongzhi, Keke Cheng, Jingping Ge, and Wenxiang Ping. 2011. "Statistical Optimization of Xylitol Production from Corn cob Hemicellulose Hydrolysate by *Candida Tropicalis* HDY-02." *New Biotechnology* 28(6): 673–78.
- Lorliam, Wanlapa et al. 2017. "Optimization of Xylitol Production by *Candida Tropicalis* A26." *Chiang Mai Journal of Science* 44(1): 50–58.
- Manjarres-Pinzon, Mario Arias-Zabala, Guillermo Correa-Londono, and Eduardo Rodriguez-Sandoval. 2017. "Xylose Recovery from Dilute-Acid Hydrolysis of Oil Palm (*Elaeis Guineensis*) Empty Fruit Bunches for Xylitol Production." *African Journal of Biotechnology* 16(41): 1997–2008.
- Manjarres-Pinzón, Katherine et al. 2016. "Producción de Xilitol Por *Candida Guilliermondii* a Partir de Fermentación de Residuos de Palma de Aceite." *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 19(2): 403–9.
- Mussatto, Solange I., and Inês C. Roberto. 2008. "Establishment of the Optimum Initial Xylose Concentration and Nutritional Supplementation of Brewer's Spent Grain Hydrolysate for Xylitol Production by *Candida Guilliermondii*." *Process Biochemistry* 43(5): 540–46.
- Ping, Yuan, Hong Zhi Ling, Gang Song, and Jing Ping Ge. 2013. "Xylitol Production from Non-Detoxified Corn cob Hemicellulose Acid Hydrolysate by *Candida Tropicalis*." *Biochemical Engineering Journal* 75: 86–91.
- Sampaio, Fábio Coelho et al. 2017. "Comparison of Response Surface Methodology and Artificial Neural Network for Modeling Xylose-to-Xylitol Bioconversion." *Chemical Engineering and Technology* 40(1): 122–29.
- Silva, and Ines Roberto. 2001. "Optimization of Xylitol Production by *Candida Guilliermondii* FTI 20037 Using Response Surface Methodology." *Process Biochemistry* 36(11): 1119–24.
- Xu, Linlin et al. 2019. "Xylitol Production by *Candida Tropicalis* 31949 from Sugarcane Bagasse Hydrolysate." *Sugar Tech* 21(2): 341–47.
- Yewale, Tatyaso et al. 2017. "Xylitol Production from Non-Detoxified and Non-Sterile Lignocellulosic Hydrolysate Using Low-Cost Industrial Media Components." *3 Biotech* 7(1): 1–9.

5. Capítulo

Efecto de la agitación y el oxígeno disuelto sobre la actividad xilosa reductasa durante la producción de xilitol a escala de bioreactor.

5.1. Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la velocidad de agitación y el oxígeno disuelto a escala de biorreactor de 7 L sobre la producción de la enzima xilosa reductasa (XR) mediante *Candida sp.* durante la bioconversión de la xilosa en hidrolizados de raquis de palma de aceite sin detoxificar. El mayor consumo de xilosa (95.5%) y la máxima producción de xilitol (5.46 g L^{-1}) se presentó bajo condiciones de 30% de oxígeno disuelto y 50 rpm. La máxima actividad XR ($0.646 \text{ U mg}^{-1} \text{ proteína}$) fue obtenida después de 144 h de fermentación y a las mismas condiciones mencionadas anteriormente de oxígeno disuelto y velocidad de agitación.

En general, el presente trabajo demuestra que la disponibilidad de oxígeno influye en la actividad xilosa reductasa de *Candida tropicalis* y la producción de xilitol a escala de biorreactor utilizando hidrolizados de raquis de palma, observándose un rendimiento de xilitol ($Y_{P/S}$) de 0.27 g g^{-1} y una productividad volumétrica (Q_P) de $0.33 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La producción de xilitol a partir de hidrolizados de raquis en biorreactor de 7 L con *C.*

tropicalis mostró que, a menor oxígeno disuelto independientemente de las condiciones de agitación evaluadas, se evidenciaba un incremento en la producción de xilitol.

Palabras clave: *Candida tropicalis*, xilitol, xilosa reductasa, oxígeno disuelto, raquis de palma

5.2. Introducción

Diferentes estudios han demostrado la influencia de varios factores sobre la producción biotecnológica de xilitol, como la edad del inóculo, la concentración inicial de xilosa (Xu et al. 2019), pH (Manaf et al. 2017), fuente de carbono, nutrientes, temperatura, aireación y modo de operación del biorreactor (Albuquerque et al. 2014; Dasgupta et al. 2017). Una de las tendencias biotecnológicas para la producción de xilitol es el desarrollo de cepas recombinantes con alto potencial de producción de xilitol, como por ejemplo *Saccharomyces sp.* con *Candida sp.* gen XYL1, debido a que la primera especie es más tolerante en términos de la fermentación de xilosa, toxicidad y tolerancia al crecimiento en presencia de inhibidores de hidrolizados hemicelulósicos (Prakasham, Rao, and Hobbs 2009). Sin embargo, las cepas utilizadas en este trabajo no han tenido ninguna transformación genética, son cepas nativas (Yokoyama et al. 1995). En levaduras del género *Candida sp.* los métodos de ingeniería metabólica y la obtención de estas cepas recombinantes no se ha realizado ni documentado recientemente (Dasgupta et al. 2017).

El oxígeno disuelto es uno de los factores más importantes que afecta la producción de xilitol, especialmente cuando se utilizan levaduras del género *Candida sp* para la bioconversión de la D-xilosa (Albuquerque et al. 2014). Durante el proceso de fermentación, levaduras del género *Candida sp* metabolizan la xilosa hasta xilitol en presencia de enzimas claves que participan en dicha ruta como la xilosa reductasa (XR; EC1.1.1.21), la cual es una enzima intracelular ubicada en el citoplasma y con capacidad para reducir la xilosa a xilitol en la primera fase de la ruta metabólica en presencia de NADPH como cofactor (Cocotle-Ronzon et al. 2012). La actividad xilosa reductasa tiene

especial atención científica por su aplicación en la fermentación de sustratos lignocelulósicos para la producción de etanol y xilitol (Zhang et al. 2019).

El estudio de una de las enzimas clave en la producción de xilitol como la xilosa reductasa (XR) y su correlación con la concentración de oxígeno disuelto y la velocidad de agitación en hidrolizados de raquis de palma a escala de biorreactor de banco de tanque agitado no se ha reportado hasta el momento. Por esta razón, es necesario explorar cuáles condiciones de fermentación conllevan a la máxima eficiencia en bioconversión de la xilosa a xilitol en hidrolizados de palma de aceite, a través del estudio de la actividad xilosa reductasa como enzima clave en este proceso. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia del oxígeno disuelto y de la velocidad de agitación sobre la actividad xilosa reductasa a escala de biorreactor de banco (7 L) de tanque agitado durante la fermentación de hidrolizados de raquis de palma para la producción de xilitol utilizando *Candida tropicalis*.

5.3. Materiales y métodos

5.3.1. Materiales

Los racimos vacíos de frutos o raquis de palma fueron suministrados por la planta de beneficio Palmares del Oriente S.A.S. Los racimos fueron preparados para ser hidrolizados y utilizarlos en las fermentaciones a escala de biorreactor como se describen en estudios previos (Manjarres-Pinzon et al. 2017).

5.3.2. Hidrólisis ácida del raquis de palma

La hidrólisis ácida de los raquis se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 mL con una relación 1:8 sólido-líquido, tomando 40 g del raquis y 320 mL de ácido sulfúrico diluido al 2%. Los matraces fueron esterilizados por 30 min a 121°C y posteriormente sumergidos en un baño de hielo para detener la hidrólisis. Finalmente se filtró todo el contenido del hidrolizado (30 L) y se ajustó el pH a 5.5 - 5.6 con perlas de NaOH. El hidrolizado

obtenido no se detoxificó, pero fue suplementado con 4 g L⁻¹ extracto de levadura, 3 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.5 g L⁻¹ MgSO₄.7H₂O y 0.1 g L⁻¹ CaCl₂.2H₂O.

5.3.3. Microorganismo y preparación del preinóculo

Las células de *Candida tropicalis* fueron mantenidas con una edad de cultivo de 48 h en agar PDA a 30°C. El preinóculo se preparó transfiriendo colonias de las células de la levadura a Erlenmeyers de 250 mL con 100 mL de medio extracto de levadura – peptona - xilosa (YPX). Los matraces se incubaron en un agitador rotatorio a 200 rpm durante 24 h a 30°C Después las células se recuperaron por centrifugación (2500 rpm, 20 min). La suspensión de células obtenidas (alrededor de 5 g L⁻¹) fue utilizada para inocular el medio de fermentación a escala de biorreactor.

5.3.4. Proceso de fermentación

Los cultivos por lote se realizaron en biorreactor de 7 L marca Applikon con módulo de agitación (Applikon ADI310) y control de oxígeno disuelto Alpha-DO2000PPG (Eutech Instruments, NL). Las fermentaciones se realizaron con un volumen de trabajo de 2.5 L de hidrolizado de raquis sin detoxificar el cual fue esterilizado junto con el biorreactor en autoclave a 121°C durante 20 minutos. El hidrolizado tenía una concentración inicial de xilosa de 20 a 22 g L⁻¹, la concentración del inóculo utilizado fue alrededor de 5 g L⁻¹, el pH de todos los cultivos se mantuvo en 5.6 y una temperatura de 30°C. Se evaluó el efecto de la velocidad de agitación (50, 75 y 100 rpm) y diferentes condiciones de oxígeno disuelto (30, 55 y 80%) durante 164 h de fermentación, tomando muestras cada 24 h con el fin de determinar el crecimiento celular, el consumo de xilosa, la producción de xilitol y la actividad enzimática xilosa reductasa.

5.3.5. Extractos enzimáticos

Las células de cada tratamiento y tiempo se recolectaron por centrifugación a 2500 rpm durante 30 min. Un volumen de 1000 μL de biomasa se tomó para la ruptura celular utilizando un mortero con nitrógeno líquido. Posteriormente, se adicionó 3 mL de buffer fosfato pH 7.2. Esta solución se sometió a una segunda centrifugación a 2500 rpm por 20 min. El sobrenadante se utilizó para las determinaciones enzimáticas xilosa reductasa.

5.3.6. Métodos analíticos

Crecimiento celular: la concentración celular se determinó por el método del peso seco (Rafiqul and Sakinah 2014).

Cuantificación de xilosa y xilitol: la xilosa y el xilitol se analizaron utilizando un sistema de HPLC (Shimadzu Prominence), con un detector de RI, equipado con una columna Aminex HPX-87H (Biorad). La elución se llevó a cabo con H_2SO_4 acuoso (0,005 M) a un caudal de 0.6 ml min^{-1} . La temperatura del horno se mantuvo a 50°C . El volumen de inyección fue de $20 \mu\text{L}$ (Manjarres-Pinzón et al. 2016). Las muestras se prepararon por duplicado y se filtraron a través de un filtro de jeringa de membrana de nylon de 25 mm (tamaño de poro $0.45 \mu\text{m}$) antes del análisis.

Determinación de actividad enzimática xilosa reductasa: la actividad xilosa reductasa (XR) (EC 1.1.1.21) fue establecida por la oxidación del cofactor NADPH como co-sustrato por el cambio de la absorbancia a 340 nm y 30°C utilizando un espectrofotómetro (Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Waltham, MA). La actividad xilosa reductasa se determinó usando cubetas que contenían una solución de 100 μL de agua desionizada, 600 μL del buffer fosfato pH 7.2, 100 μL de mercaptoetanol, 50 μL del extracto a analizar y 50 μL de NADPH 3 mM. Se midió la absorbancia después de 1 min y se designó como la absorbancia pre-xilosa del extracto a analizar. Posteriormente, se agregaron 100 μL de una solución de xilosa 0.5 M y se midió la absorbancia cada 6 s por 60 s. Una unidad de XR (U) fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 μmol de NADPH por min. La actividad específica xilosa reductasa fue expresada como una unidad de la enzima por mg de proteína.

La ecuación utilizada para determinar la actividad enzimática fue:

$$\text{Actividad} = \frac{1000 * TV * dA/dt}{\epsilon * V * CF}$$

Donde *TV* es el volumen total de la cubeta que en este caso corresponde a 1000 μL , *V* representa el volumen del extracto celular empleado 50 μL , ϵ representa el coeficiente de extinción molar del NADPH que es 6.22 L mmol^{-1} , *dA/dt* es la diferencia entre la velocidad experimental y la velocidad del control y *CF* es el valor de dilución empleado que para el caso es 1.

La proteína se determinó utilizando el método de Bradford usando microplacas con agitación, el mismo espectrofotómetro mencionado anteriormente y utilizando una solución estándar de albúmina de suero bovino a una longitud de onda de 595 nm (Bradford 1976).

5.3.7. Diseño experimental

Para las fermentaciones en biorreactor se empleó un diseño factorial 2^k utilizando una herramienta de cribado, tomando como factores el oxígeno disuelto (30,55 y 80%) y la velocidad de agitación (50, 75 y 100) rpm, respectivamente. Los datos experimentales se sometieron a un ANOVA, con un nivel de significancia del 5% y se utilizó diferencia mínima significativa (LSD) para comparar los tratamientos con diferencias significativas. Los resultados se presentan como el promedio de los datos. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y los datos se analizaron con Statgraphics Plus 5.1.

5.4. Resultados y discusión

5.4.1. Fermentación de la xilosa y producción de xilitol en diferentes condiciones de oxígeno y agitación

La capacidad para fermentar a xilitol la xilosa contenida en hidrolizados de raquis de palma por *Candida tropicalis* fue evaluada bajo varias condiciones de oxígeno y agitación en biorreactor de 7 L. La cepa fue capaz de consumir xilosa en los 5 tratamientos evaluados, lo que indica que el hidrolizado de raquis de palma contiene fuentes de carbono suficientes para su crecimiento, aunque dicho consumo varió considerablemente entre los tratamientos. La xilosa es consumida en mayor proporción en condiciones de 30% de oxígeno disuelto (OD) y 50 rpm, mostrando un consumo de 95.5%, mientras que condiciones de oxígeno disuelto de 80% y la misma velocidad de agitación sólo mostró un consumo de 69% de la xilosa. Este comportamiento se puede observar en la Figura 5-1, donde la xilosa inicial (21 g L^{-1}) fue consumida hasta una xilosa residual de 0.9 y 6.3 g L^{-1} , respectivamente. *C. tropicalis* mostró una mayor capacidad para consumir xilosa bajo condiciones limitadas de oxígeno y bajas velocidades de agitación, aunque este último factor no fue estadísticamente significativo, en los niveles probados, durante la fermentación de la xilosa.

Estudios han reportado que es evidente que las levaduras requieren poca oxigenación para reducir la xilosa (Albuquerque et al. 2014). Otros estudios han reportado que la microaerobiosis genera condiciones de restricción de O_2 favoreciendo la acumulación de xilitol y regenerando el NADPH, cofactor importante para la bioconversión de la xilosa a xilitol (Dasgupta et al. 2017).

Así mismo, la producción de xilitol se vio favorecida con agitaciones bajas (50 rpm) y condiciones de oxígeno limitadas (30%) con una producción máxima de 5.46 g L^{-1} seguido de 4.9 g L^{-1} cuando la concentración de oxígeno fue de 80%, tal como se muestra en la Figura 5-2. A pesar que las concentraciones alcanzadas en la producción del edulcorante son similares en condiciones diferentes de OD, las condiciones limitadas permitieron dejar muy poca xilosa residual y tener una mayor productividad durante el

proceso de fermentación, lo que indica un buen resultado en términos económicos y de eficiencia del proceso fermentativo. El OD en condiciones bajas aumenta la posibilidad de producción de xilitol, siendo 30% la mejor para *C. tropicalis* a escala de biorreactor de banco usando hidrolizados de raquis de palma.

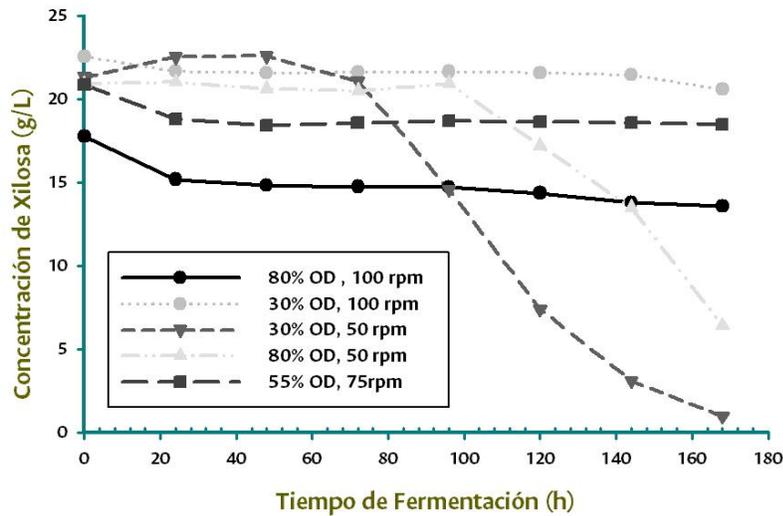


Figura 5-1: Concentración de xilosa durante la fermentación de hidrolizado de raquis de palma usando *C. tropicalis*

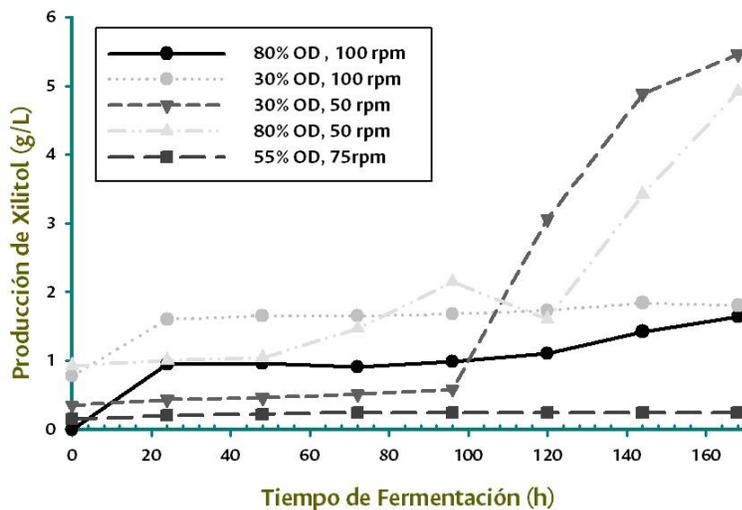


Figura 5-2: Producción de xilitol durante la fermentación de hidrolizado de raquis de palma usando *C. tropicalis*

Concentraciones de oxígeno disuelto de 30% y bajas agitaciones (50 rpm), fueron condiciones que favorecieron el crecimiento celular, el cual mostró una curva de crecimiento con una fase lag de 24 h y una fase exponencial que inicia desde las 48 h de fermentación. El preinóculo en las fermentaciones se realizó en un medio sintético rico en xilosa, lo que probablemente hizo que, al inocular las células en un hidrolizado de raquis de palma, estas debieron adaptarse a un nuevo ambiente con diferentes condiciones en nutrientes, pH, presencia de inhibidores, presencia de otras azúcares, condiciones de oxígeno, etc.

Las células comienzan a ser activas después de 48 h con una fase exponencial que duró aproximadamente 96 h, alcanzando la máxima concentración de biomasa (11.2 g L^{-1}) que corresponden a 6.2 g L^{-1} producidos durante las 144 h de fermentación (Figura 5-3). Otros estudios han reportado que durante la fermentación de xilitol se han alcanzado valores de biomasa similares utilizando *C. tropicalis* y bagazo de caña (Tizazu, Roy, and Moholkar 2018) o medios sintéticos (S. Wang et al. 2015). Sin embargo, los datos reportados en el presente estudio son útiles para conocer el comportamiento cinético de *C. tropicalis* en hidrolizados de raquis de palma en biorreactor de 7 L; aunque no se debería comparar con otras investigaciones porque las condiciones experimentales y los medios de cultivo usados no fueron iguales.

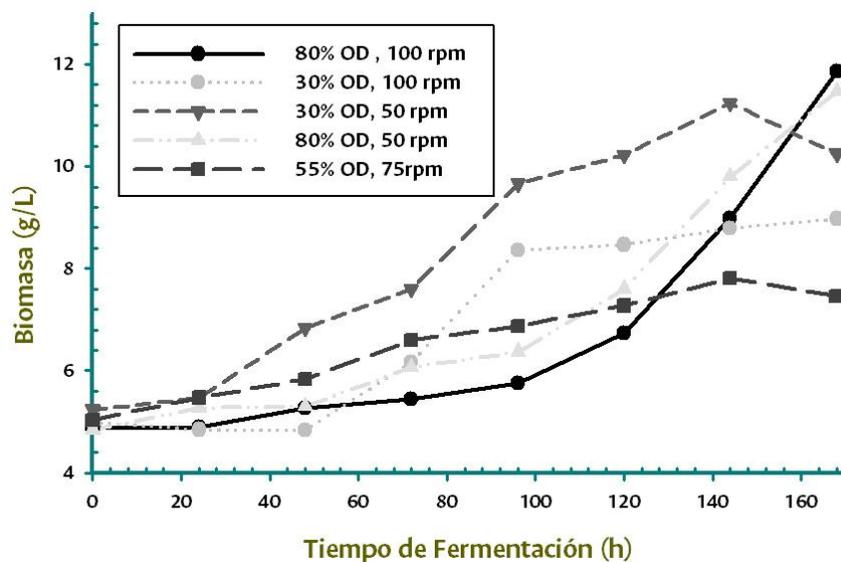


Figura 5-3: Biomasa formada durante la fermentación del hidrolizado de raquis de palma usando *Cándida tropicalis*

Diversos estudios han reportado que las levaduras productoras de xilitol tienen una mayor toma de xilosa y producción de xilitol bajo condiciones limitadas de oxígeno (Veras, Parachin, and Almeida 2017). Este estudio mostró mejores productividades volumétricas (Q_P 0.033 g L⁻¹ h⁻¹) que fueron observadas después de 144 h de fermentación, tal como se muestra en la Figura 5-4; estudios que han utilizado hidrolizados de raquis de palma y *Debaryomyces hansenii* ITBCC R85 para la producción de xilitol obtuvieron productividades menores a los del presente estudio (0.02 g L⁻¹ h⁻¹) después de 96 h de fermentación (Mardawati et al. 2015).

En este mismo sentido, el mayor rendimiento $Y_{P/S}$ (0.98 g g⁻¹) fue el del tratamiento 30% de OD y 100 rpm; sin embargo, en este tratamiento sólo se produjo 1.8 g L⁻¹ de xilitol durante las 168 h de fermentación y un consumo de 1.98 g L⁻¹ de xilosa; es por esto que el rendimiento es tan elevado (Figura 5-5). Mientras que, el rendimiento con 30% de OD y 50 rpm fue de 0.27 g g⁻¹, superando algunos reportados en la literatura a escala de biorreactor de banco (Mardawati et al. 2015), o estudios que han modificado levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* para mejorar la fermentabilidad de la xilosa sobre medio sintético e hidrolizado de materiales lignocelulósicos durante 100 h de fermentación obteniendo rendimientos $Y_{p/s}$ igual a 0.04 g/g (Karhumaa et al. 2007).

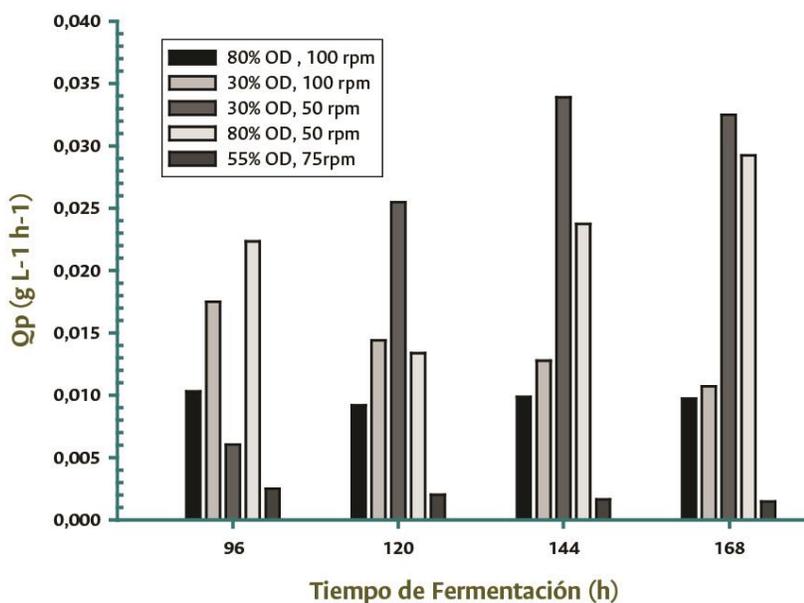


Figura 5-4: Productividad volumétrica obtenida durante la fermentación de hidrolizados de raquis de palma usando *Candida tropicalis* a escala de biorreactor

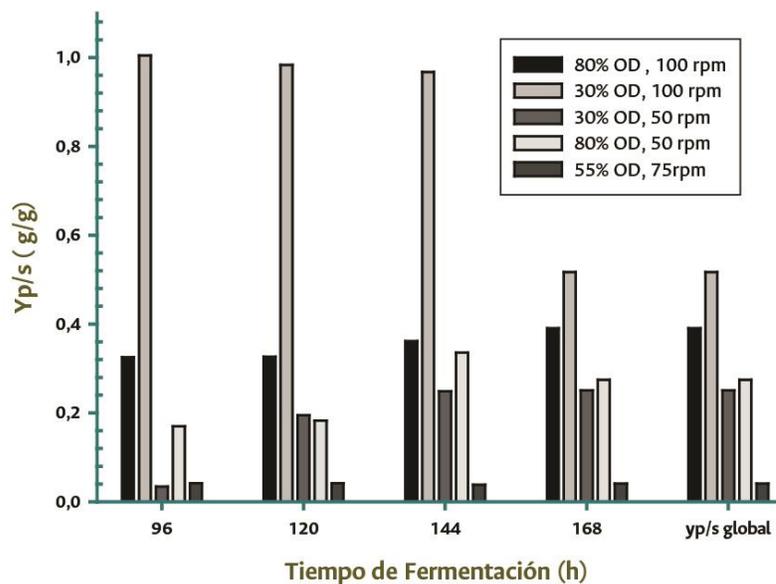


Figura 5-5: Rendimiento del xilitol obtenida durante la fermentación de hidrolizados de raquis de palma usando *Candida tropicalis* a escala de bioreactor

5.4.2. Efecto del oxígeno disuelto y la agitación sobre la actividad xilosa reductasa a escala de biorreactor

La correlación entre la capacidad de *C. tropicalis* para fermentar xilosa y producir una de las enzimas claves en la producción de xilitol como la xilosa reductasa (XR) bajo diferentes condiciones de OD y agitación en hidrolizados de raquis de palma a escala de biorreactor de banco de tanque agitado no se ha reportado hasta el momento, hasta donde sabemos. Hay diferentes estudios sobre el comportamiento de enzimas claves en el metabolismo de *C. guilliermondii* en hidrolizados de arroz teniendo en cuenta la concentración inicial de xilosa y pH del medio (Gurpilhares et al. 2009), el comportamiento de la XR y la xilitol deshidrogenasa (XDH) durante la producción de xilitol usando *C. guilliermondii* FTI 20037 en medio sintético y diferentes valores de k_La en biorreactor de tanque agitado (Branco et al. 2009), otros autores han evaluado el efecto de la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) sobre enzimas importantes en el metabolismo de la xilosa por *Debaryomyces hansenii* (Gírio et al. 1994) y se ha estudiado el efecto de adaptar *C. tropicalis* sobre la producción de XR en hidrolizados de aserrín (Rafiqul and Sakinah 2014).

En el presente estudio, la actividad XR fue medida en extractos crudos celulares de *C. tropicalis* durante la fermentación de hidrolizados de raquis sin detoxificar en diferentes condiciones de oxígeno (30-80%) y de agitación (50 y 100 rpm) durante un tiempo total de fermentación de 168 h (Figura 5-6). La máxima concentración de XR tuvo un valor de $0.91 \text{ U mg}^{-1}_{\text{Proteína}}$ con un 80% de OD y una velocidad de agitación de 100 rpm al comienzo de la fermentación. Sin embargo, a estas mismas condiciones durante el proceso de fermentación los valores de XR fluctuaron ampliamente, no se mostró ninguna tendencia y las concentraciones de xilitol no fueron las mejores.

Este comportamiento también se ha reportado en otros estudios utilizando hidrolizado de arroz y *C. guilliermondii* (Gurpilhares et al. 2009). Una XR alta al inicio de la fermentación puede atribuirse a que las células utilizadas vienen de un preinóculo que tiene xilosa (YPX) y probablemente el preinóculo usado en el tratamiento con 80% de OD y 100 rpm de velocidad tenía una XR alta desde el momento en que se inoculó al biorreactor. Normalmente, las células en un cultivo se encuentran en diferentes fases de crecimiento (asincrónicas), lo que influye directamente en su actividad metabólica (Arruda et al. 2011).

Por otro lado, con las condiciones de 30% de OD y una velocidad de agitación de 50 rpm, los valores de XR fueron aumentando gradualmente hasta un resultado de 0.646 U mg^{-1} proteína a las 144 h de fermentación, tratamiento que también presentó las concentraciones más altas de xilitol (5.46 g L^{-1}). Después de este tiempo, la cantidad de XR bajó considerablemente, debido probablemente a que las condiciones limitadas de oxígeno restringen el crecimiento celular y, por ende, la actividad xilosa reductasa se ve disminuida después de alcanzar su punto máximo.

El anterior comportamiento también se vio reflejado en la producción de xilitol mediante *C. guilliermondii FTI 20037* en medio sintético (Branco et al. 2009). Al relacionar la producción de xilitol con estas condiciones se demuestra que el aumento gradual de XR incide directamente en una mayor cantidad de xilitol producido. Un comportamiento similar a las anteriores condiciones fue para el tratamiento con 80% de OD y 50 rpm, aunque su producción de xilitol fue menor que la de 30% de OD y 50 rpm. A estas condiciones de proceso la actividad XR comenzó a aumentar gradualmente después de 48 h de fermentación, pero el consumo de xilosa en toda la fermentación fue del 69%,

mucho menor en comparación con el tratamiento de 30% de OD y 50 rpm, cuyo consumo de xilosa fue superior al 95%, mostrando mejor aprovechamiento del sustrato durante todo el tiempo de fermentación.

Una de las causas de dicho comportamiento es que a altas concentraciones de oxígeno las células toman el sustrato para el crecimiento es así como una concentración de xilosa residual (6.38 g L^{-1}) después de 168 h, en el tratamiento 80% de OD y 50 rpm, y una producción de xilitol de (4.91 g L^{-1}), reflejan que para producir xilitol es importante tener concentraciones altas de biomasa. En el caso del tratamiento 30% de OD y 50 rpm hubo una producción de biomasa menor que el tratamiento 80% de OD y 50 rpm, pero mayor producción de xilitol. Esto confirma lo reportado por algunos autores, que afirman que la aireación estimula el transporte de azúcar en algunas levaduras y la producción de xilitol está directamente relacionada con el crecimiento de la biomasa y el consumo de oxígeno (Vallejos and Area 2017).

En este estudio, condiciones limitadas de oxígeno lograron dicho efecto en biorreactor de 7 L, demostrando que la producción de xilitol podría no ser favorecida por altas concentraciones de xilosa reductasa, tal como lo reportaron Rafiqul et al. (2014), sino por el comportamiento de dicha enzima durante toda la fermentación, la cual debe tener una tendencia de aumento sin fluctuaciones en el tiempo.

El metabolismo en general se acelera y la producción de biomasa se incrementa con el aumento de oxígeno disponible. Otros estudios han reportado que el incremento de $k_L a$, el cual se relaciona con el oxígeno disuelto en el medio, genera una desviación del metabolismo a la producción de biomasa y una disminución de XR durante el proceso, mientras que con una condición de oxígeno disuelto limitado aumenta la producción de xilitol y genera un aumento o se sostiene la cantidad de XR en el medio (Branco et al. 2009; S.-Y. Kim, Kim, and Oh 1997). Los valores de xilitol en altas condiciones de oxígeno pueden deberse a que las células tienden a producir más aminoácidos, enzimas y proteínas. En este trabajo el valor de proteínas estuvo alrededor de $1.7\text{-}1.8 \text{ mg mL}^{-1}$, en todos los tratamientos donde la concentración de xilitol fue máxima, indicando que los tratamientos con mayor concentración de proteína fueron los mejores para la producción de dicho polirol. Por otro lado, bajo un suministro limitado de oxígeno, es posible

garantizar las condiciones mínimas en las que se regenera una fracción del cofactor NADH.

Por lo tanto, la diferencia en la actividad entre la XR y la XDH permite la acumulación intracelular de xilitol hasta una concentración límite, después de lo cual se excreta el exceso de xilitol. La producción directa de xilitol no aporta ninguna ganancia de energía a la célula, y la acumulación de NADH daña el metabolismo natural de las células. Por consiguiente, se hace evidente que se necesitan cantidades reducidas de oxígeno para mantener las funciones celulares vitales mínimas y, en consecuencia, hacer viable la producción de xilitol (Faria et al. 2002).

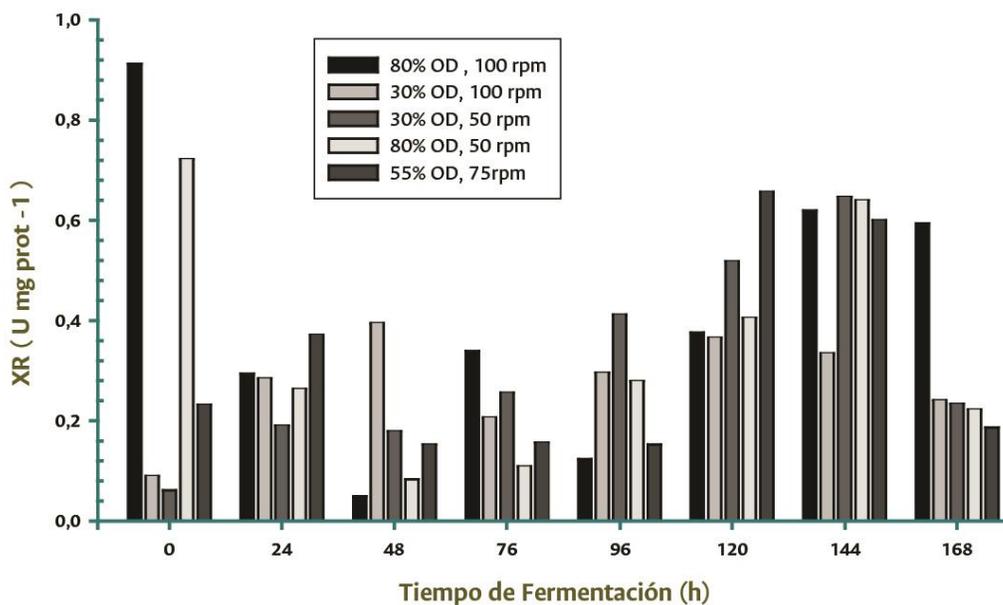


Figura 5-6: Actividad enzimática xilosa reductasa (XR) durante la fermentación de hidrolizado de raquis de palma usando *C. tropicalis* a escala de biorreactor de 7 L

5.5. Conclusiones

El hidrolizado de raquis de palma sin detoxificar representa una fuente de carbono importante para el crecimiento de *Candida tropicalis* a escala de biorreactor de 7L. La bioconversión de la xilosa a xilitol por este tipo de levaduras y en este tipo de hidrolizados, requiere estudios que correlacionen variables de operación del biorreactor, como oxígeno disuelto y agitación, sobre la actividad enzimática xilosa reductasa,

importante en la reducción de la xilosa. Condiciones limitadas de oxígeno y bajas velocidades de agitación mostraron que *C. tropicalis* aumentaba su concentración de enzima paulatinamente durante todo el proceso de fermentación. Es precisamente este aumento sin fluctuaciones en el tiempo, el que podría ser el patrón que debe tener metabólicamente la cepa para una buena fermentabilidad de la xilosa y obtener altas concentraciones de xilitol. Las mejores condiciones de operación fueron 30% OD y 50 rpm, con una toma de xilosa del 95.5 % y una producción máxima de xilitol de (5.46g/L). Durante el proceso de fermentación, la máxima actividad XR (0.646U/mg proteína) fue obtenida después de 144 h a las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Esto demuestra que el proceso fermentativo comienza a ser efectivo después del cuarto día posterior a la inoculación del biorreactor.

Referencias

- Albuquerque, Tiago Lima De, Ivanildo José Da Silva, Gorete Ribeiro De MacEdo, and Maria Valderéz Ponte Rocha. 2014. "Biotechnological Production of Xylitol from Lignocellulosic Wastes: A Review." *Process Biochemistry* 49(11): 1779–89.
- Arruda, Priscila Vaz de, Rita de Cássia Lacerda Brambilla Rodrigues, Débora Danielle Virgínio da Silva, and Maria das Gracias de Almeida Felipe. 2011. "Evaluation of Hexose and Pentose in Pre-Cultivation of *Candida Guilliermondii* on the Key Enzymes for Xylitol Production in Sugarcane Hemicellulosic Hydrolysate." *Biodegradation* 22(4): 815–22.
- Bradford. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 72(1–2): 248–54.
- Branco, Ricardo F. et al. 2009. "Profiles of Xylose Reductase, Xylitol Dehydrogenase and Xylitol Production under Different Oxygen Transfer Volumetric Coefficient Values." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84(3): 326–30.
- Cocotle-Ronzon, Yolanda, Marisol Zendejas-Zaldo, Micloth López del Castillo-Lozano, and MaGuadalupe Aguilar-Uscanga. 2012. "Preliminary Characterization of Xylose Reductase Partially Purified by Reversed Micelles from *Candida Tropicalis*; IEC5-ITV, an Indigenous Xylitol-Producing Strain." *Advances in Chemical Engineering and Science* 02(01): 9–14.
- Dasgupta, Diptarka, Sheetal Bandhu, Dilip K. Adhikari, and Debashish Ghosh. 2017. "Challenges and Prospects of Xylitol Production with Whole Cell Bio-Catalysis: A Review." *Microbiological Research* 197: 9–21.
- Faria, Luis F.Figueiredo, Maria Antonieta P. Gimenes, Ronaldo Nobrega, and Nei Pereira. 2002. "Influence of Oxygen Availability on Cell Growth and Xylitol Production by

Candida Guilliermondii." *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology* 98–100: 449–58.

Gírio, Francisco M. et al. 1994. "Effect of Oxygen Transfer Rate on Levels of Key Enzymes of Xylose Metabolism in *Debaryomyces Hansenii*." *Enzyme and Microbial Technology* 16(12): 1074–78.

Gurpilhares, Daniela B., Francislene A. Hasmann, Adalberto Pessoa, and Inês C. Roberto. 2009. "The Behavior of Key Enzymes of Xylose Metabolism on the Xylitol Production by *Candida Guilliermondii* Grown in Hemicellulosic Hydrolysate." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36(1): 87–93.

Karhumaa, Kaisa, Rosa Garcia Sanchez, Bärbel Hahn-Hägerdal, and Marie F. Gorwa-Grauslund. 2007. "Comparison of the Xylose Reductase-Xylitol Dehydrogenase and the Xylose Isomerase Pathways for Xylose Fermentation by Recombinant *Saccharomyces Cerevisiae*." *Microbial Cell Factories* 6: 1–10.

Kim, Sang-Yong, Jung-Hoe Kim, and Deok-Kun Oh. 1997. "Improvement of Xylitol Production by Controlling Supply in *Candida Parapsilosis*." *Journal of Fermentation and Bioengineering* 83(3): 267–70.

Manaf, Shareena Fairuz Abdul, Abdullah Amru Indera Luthfi, Jamaliah Md Jahim, and Shuhaida Harun. 2017. "Interaction Effects of PH and Inhibitors in Oil Palm Frond (OPF) Hemicellulosic Hydrolysate on Xylitol Production: A Statistical Study." *Journal of Physical Science* 28: 241–55.

Manjarres-Pinzon, Mario Arias-Zabala, Guillermo Correa-Londono, and Eduardo Rodriguez-Sandoval. 2017. "Xylose Recovery from Dilute-Acid Hydrolysis of Oil Palm (*Elaeis Guineensis*) Empty Fruit Bunches for Xylitol Production." *African Journal of Biotechnology* 16(41): 1997–2008.

Manjarres-Pinzón, Katherine et al. 2016. "Producción de Xilitol Por *Candida Guilliermondii* a Partir de Fermentación de Residuos de Palma de Aceite." *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 19(2): 403–9.

Mardawati, Efri et al. 2015. "Microbial Production of Xylitol from Oil Palm Empty Fruit Bunches Hydrolysate: The Effect of Glucose Concentration." *Journal of the Japan Institute of Energy* 94(8): 769–74.

Prakasham, R. S., R. Sreenivas Rao, and Phil J. Hobbs. 2009. "Current Trends in Biotechnological Production of Xylitol and Future Prospects." *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* 3(1): 8–36.

Rafiqul, I. S.M., and A. M.M. Sakinah. 2014. "Production of Xylose Reductase from Adapted *Candida Tropicalis* Grown in Sawdust Hydrolysate." *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3(4): 227–35.

Tizazu, Belachew Zegale, Kuldeep Roy, and Vijayanand S. Moholkar. 2018. "Mechanistic Investigations in Ultrasound-Assisted Xylitol Fermentation." *Ultrasonics Sonochemistry* 48(May): 321–28.

Vallejos, María E &, and María C Area. 2017. *Food Bioconversion Xylitol as Bioproduct*

From the Agro and Forest Biorefinery. Elsevier Inc.

- Veras, Henrique César Teixeira, Nádia Skorupa Parachin, and João Ricardo Moreira Almeida. 2017. "Comparative Assessment of Fermentative Capacity of Different Xylose-Consuming Yeasts." *Microbial Cell Factories* 16(1): 1–8.
- Wang, Shizeng et al. 2015. "Metabolic Responses in *Candida Tropicalis* to Complex Inhibitors during Xylitol Bioconversion." *Fungal Genetics and Biology* 82: 1–8.
- Xu, Linlin et al. 2019. "Xylitol Production by *Candida Tropicalis* 31949 from Sugarcane Bagasse Hydrolysate." *Sugar Tech* 21(2): 341–47.
- Yokoyama, Shin Ichiro et al. 1995. "Purification, Characterization and Structure Analysis of NADPH-Dependent d-Xylose Reductases from *Candida Tropicalis*." *Journal of Fermentation and Bioengineering* 79(3): 217–23.
- Zhang, Meng et al. 2019. "A Unique Xylose Reductase from *Thermomyces Lanuginosus*: Effect of Lignocellulosic Substrates and Inhibitors and Applicability in Lignocellulosic Bioconversion." *Bioresource Technology* 281(December 2018): 374–81.

6. Capítulo 6

Modelado del crecimiento celular y producción de xilitol a escala de matraz por *Candida tropicalis* en diferentes medios de cultivo utilizando modelos no estructurados.

6.1. Resumen

Con el fin de describir la cinética de fermentación de la producción de xilitol con *Candida tropicalis* en medio sintético YPX (Extracto de levadura, peptona y xilosa) y en hidrolizado de raquis sin detoxificar a escala de matraz de 100 mL se aplicaron modelos no estructurados para el crecimiento celular, consumo de xilosa y producción de xilitol. Los resultados demostraron que la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}) y el rendimiento celular ($Y_{x/s}$) experimentales se acercaron más a los resultados del modelo de Tessier en medio sintético y al modelo de Contois en hidrolizado de raquis sin detoxificar. Además, los valores de desempeño de las ecuaciones para predecir la fermentación fueron muy similares entre todos los modelos.

Palabras clave: *Candida tropicalis*, xilitol, modelamiento, raquis de palma, modelos no estructurados.

Nomenclatura

dP/dt : Acumulación de xilitol en el medio de cultivo (g de P $L^{-1} h^{-1}$)

dS/dt : Acumulación de xilosa en el medio de cultivo (g de S $L^{-1} h^{-1}$)

dX/dt : Acumulación de biomasa en el medio de cultivo (g de células $L^{-1} h^{-1}$)

B : Constante de saturación aparente del modelo de Contois (g de S g^{-1} de células)

K_S : Constante de saturación del modelo de Monod (g de S L^{-1})

K_t : Constante de saturación aparente del modelo de Tessier (g de S L^{-1})

P : Concentración del xilitol (g L^{-1})

S : Concentración de la xilosa (g L^{-1})

t : Tiempo (h)

$Y_{P/S}$: Rendimiento del producto-sustrato (g de P g^{-1} de S)

$Y_{X/S}$: Rendimiento biomasa-sustrato (g de células g^{-1} de S)

μ : Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

μ_{max} : Velocidad máxima específica de crecimiento (h^{-1})

α : Constante asociada al crecimiento en el modelo de Luedeking–Piret (mg de P g^{-1} de células)

β : Constante no asociadas al crecimiento en el modelo de Luedeking–Piret (mg de P g^{-1} de células h^{-1})

m_s : Coeficiente de mantenimiento (g de S g^{-1} de células h^{-1})

6.2. Introducción

El modelado matemático es una herramienta importante para simular y predecir las condiciones de operación de un proceso. Sin embargo, es necesario entender adecuadamente los principios bioquímicos de un proceso biotecnológicos para construir un modelo apropiado (Aguilar et al. 2002). Para desarrollar un modelo matemático a partir de datos experimentales a escala matraz que muestre el crecimiento de la levadura y la producción de xilitol es importante describir de forma cualitativa el sistema en donde se

evidencia el problema. Además, se deben tener en cuenta las leyes fundamentales que rigen el sistema, el objetivo del modelo y la especificación de las variables de entrada y salida, así como el grado de exactitud, ámbito de aplicación y los factores durante el proceso fermentativo que soportan el modelo.

La información sobre el modelado de la cinética de producción de xilitol es poca y se ha enfocado en la predicción de crecimiento de la *Candida guilliermondii* utilizando métodos no lineales (Aguilar et al. 2002), en el desarrollo de un modelo con *Candida parapsilosis* sometida a condiciones de oxígeno limitada (Aranda-Barradas, Delia, and Riba 2000), un modelo de crecimiento de *Candida mogii* con la presencia de glucosa como co-sustrato para facilitar la producción de xilitol (Tochampa et al. 2005) y un modelo de crecimiento de *Candida tropicalis* en función de la concentración inicial de xilosa y concentración de oxígeno que se relaciona con la velocidad de agitación (L. Mohamad et al. 2016).

La diversidad de materias primas y la complejidad de los procesos de fermentación hacen que haya muchas formas de abordar la descripción matemática de estos procesos. Los modelos basados en cinética incluyen modelos cinéticos no estructurados, donde los microorganismos generalmente se consideran componentes o reactivos en el sistema (Kucharska et al. 2018). La modelización de la respuesta funcional, también denominada velocidad de crecimiento microbiano específico o cinética de reacción se desarrolló al mismo tiempo tanto en ecología teórica como en ecología microbiana.

Si excluimos mecanismos complejos como la inhibición, las funciones que describen la velocidad de crecimiento de los microorganismos se pueden clasificar en dos clases principales, dependiendo de si involucran solo la concentración del recurso (sustrato o nutriente) en el medio que contiene el cultivo, como en el caso del modelo de Monod o densidades de sustrato y de biomasa como en el caso del modelo de Contois (Krichen et al. 2017). La ecuación de Monod se aplica a la degradación de los sustratos en la concentración que satura parcialmente la actividad de las células microbianas. En el modelo de Contois se supone que la tasa de saturación media depende de la concentración de biomasa, mientras que en la ecuación de Tessier se basa en una función exponencial (Sakthipriya, Doble, and Sangwai 2018).

En la actualidad no existen estudios que muestren modelos de crecimiento y producción de xilitol con hidrolizados de raquis de palma, y tampoco se han efectuado sus respectivas verificaciones. El crecimiento de levaduras de género *Candida sp.* ha sido ajustado utilizando modelos de Monod, Contois y Tessier en medios sintéticos (Aguiar et al. 2002). El objetivo de este estudio es proponer un modelo no estructurado para el crecimiento celular y producción de xilitol tanto en medio sintético como en hidrolizado de raquis de palma a escala matraz utilizando *Candida tropicalis*.

6.3. Materiales y métodos

6.3.1. Microorganismo y medio de cultivo

Se utilizó *Candida tropicalis* (ATCC 96745). La cepa fue conservada a 4°C en agar YPX (Extracto de levadura, peptona y xilosa) con una concentración de 20 g L⁻¹ de cada uno de estos compuestos. La cepa fue subcultivada en el mismo agar a 30°C durante 48 h antes de realizar los preinóculos. El pH final fue 5.6 y el medio de fermentación fue el hidrolizado de raquis sin detoxificar (Manjarres-Pinzon et al. 2017)

6.3.2. Preinóculo y condiciones de fermentación

El preinóculo se realizó en matraces Erlenmeyer de 100 mL con 40 mL de medio a evaluar y 20 g L⁻¹ de sustrato xilosa. Se incubaron a 30°C y 120 rpm por 18 h. Al final de este tiempo se inocularon los matraces Erlenmeyer con hidrolizado de raquis de palma como medio de fermentación con el fin de estudiar su cinética y modelar su comportamiento. Las fermentaciones también se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 100 mL con 40 mL de medio. La concentración de inóculo fue de 0.6 y 1.6 g L⁻¹, la relación volumen de medio y volumen del matraz Erlenmeyer fue de 0.4, pH 5.6 y agitación 120 rpm. Para el estudio cinético, las fermentaciones con hidrolizados de raquis se realizaron durante 96 h.

6.3.3. Métodos analíticos

La concentración celular se determinó por espectrofotometría por densidad óptica (OD) a 620 nm (Genesys 20, Thermo Scientific) y se correlacionó con el método del peso seco (Manjarres et al. 2018). La cuantificación de xilosa y xilitol se efectuó usando un sistema de HPLC (Shimadzu Prominence), con detector de RI, equipado con una columna Aminex HPX-87H (Biorad). La elución se llevó a cabo con H₂SO₄ acuoso (0,005 M) a un caudal de 0.6 mL/min. La temperatura del horno se mantuvo a 65°C. El volumen de inyección fue de 20 µL (Piñeros-Castro et al. 2011). Las muestras se prepararon por duplicado y se filtraron.

6.3.4. Modelos de fermentación

Las cinéticas de crecimiento, consumo de sustrato y la producción de xilitol fueron estudiadas en varios medios de fermentación a escala de matraz con 100 mL de capacidad. Los modelos estudiados para crecimiento celular fueron Monod (1), Contois (2) y Tessier (3); para la producción de producto, Luedeking-Piret (4) y para el consumo de sustrato (5) (Aguiar et al. 2002).

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{max}XS}{Ks+S} \quad (1)$$

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{max}XS}{BX+S} \quad (2)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max}X \left(1 - e^{\left(\frac{-S}{K_t}\right)} \right) \quad (3)$$

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dx}{dt} + \beta X \quad (4)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} - m_s X - \frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \quad (5)$$

Donde los parámetros estimados fueron μ_{max} , B, α , β , Y_x/s y Y_p/s . K_s y K'_s , acorde al modelo empleado y el algoritmo utilizado a través de Runge-Kutta de orden 4 (RK4).

6.3.5. Modelo cinético no estructurado

Para la estimación de los parámetros cinéticos se utilizaron observaciones experimentales. El proceso de estimación de los parámetros se realizó usando el algoritmo del software Berkeley Madonna 8.0, donde se deben introducir los parámetros tanto de los modelos de crecimiento celular como los modelos de consumo de sustrato y producción de xilitol. El procedimiento de estimación involucró la variación de diferentes valores de los parámetros con el fin de minimizar las diferencias entre los datos experimentales u observados y los predichos por el modelo. Los datos iniciales de los parámetros fueron seleccionados acorde con los datos reportados en la literatura para este tipo de fermentación; como ejemplo se puede citar la máxima velocidad específica de crecimiento de una levadura que se tomó con valores de 0.2 y 0.5 h^{-1} , los rendimientos entre 0 y 1, el parámetro B fue de 1.88, K_s de 599 y K_t de 305; (Aguiar et al. 2002).

6.4. Resultados y discusión

6.4.1. Cinética de crecimiento celular

La concentración de biomasa vs. tiempo durante la fermentación en medio sintético YPX y en hidrolizado de raquis sin detoxificar se presenta en la Figura 6-1. Es importante resaltar que la fermentación en medio sintético toma 33 h, mientras que en el hidrolizado de raquis sin detoxificar tarda 96 h; esto se debe principalmente a que en este último medio de cultivo la levadura se demora un poco más en adaptarse al medio y realizar toda su fase metabólica para el proceso de fermentación por ser un medio que contiene inhibidores y nutrientes diferentes lo que hace que la levadura tenga una fase de adaptación prolongada.

El modelo de Contois predice adecuadamente los valores experimentales del crecimiento celular en medio sintético; sin embargo, en el hidrolizado de raquis el comportamiento de todos los modelos predice el crecimiento celular en las primeras 24 h y después de ese tiempo los valores de los modelos tienden a ser menores que los experimentales. Por consiguiente, se puede mencionar que el tipo de medio de cultivo es un factor que afecta la sensibilidad de los parámetros de un modelo cinético de crecimiento. En otro estudio la aplicación del modelo de Contois en el crecimiento celular de *C. guilliermondii* empleando un medio sintético fue muy apropiado con desviaciones muy pequeñas (Aguar et al. 2002)

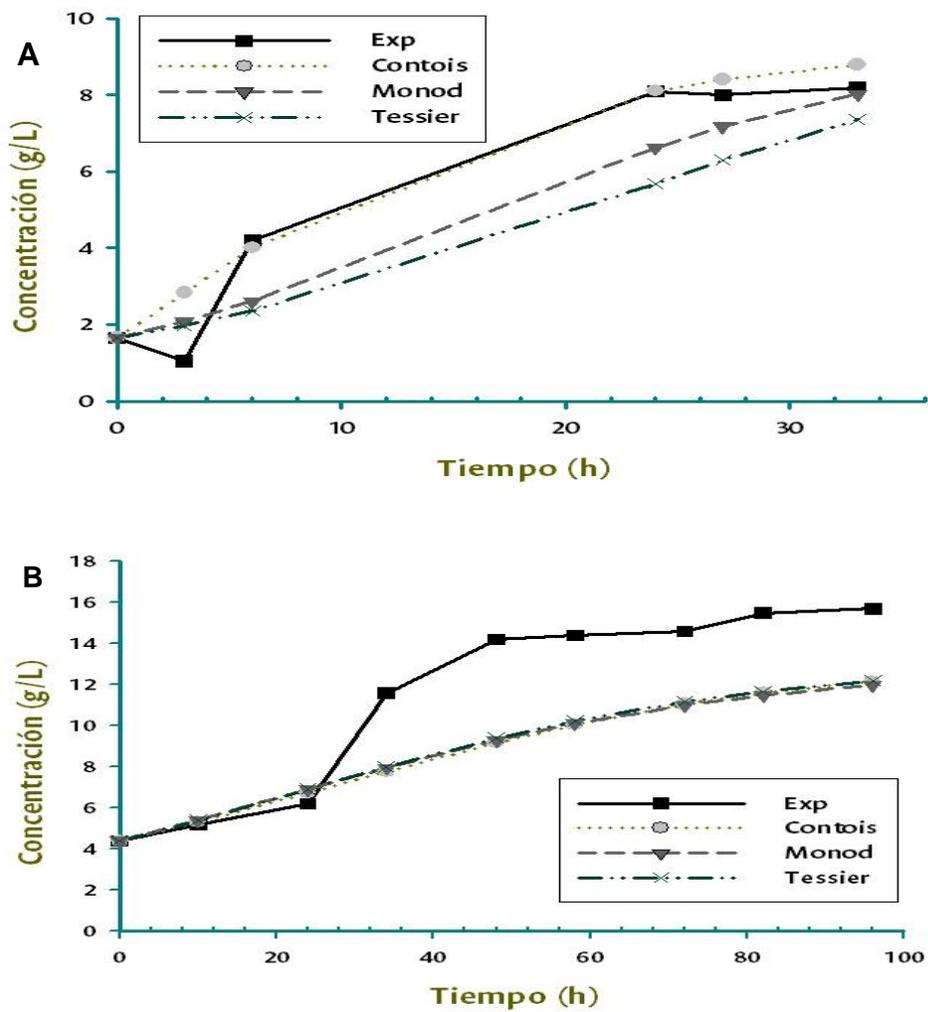


Figura 6-1: Concentración de biomasa durante la fermentación en medio YPX (a) y en hidrolizado de raquis sin detoxificar (b)

6.4.2. Cinética de consumo de xilosa

La Figura 6-2 muestra el consumo de xilosa durante la fermentación en medio sintético y en hidrolizado de raquis sin detoxificar. La concentración de xilosa disminuyó gradualmente con el tiempo en ambos medios evaluados. La xilosa se consumió en un 50% en YPX y en un 70% en HR en los datos experimentales. La concentración de xilitol aumenta principalmente durante el período de consumo rápido de xilosa, lo que confirma la acumulación de xilitol debido a los factores de desequilibrio de las actividades enzimáticas que implican el consumo de xilosa en las células (L. Mohamad et al. 2016).

En medio sintético, tanto el modelo de Monod como de Tessier predicen adecuadamente los valores experimentales en las primeras 3 h de fermentación; pero a partir de las 24 h los modelos se distancian de los valores experimentales, siendo el modelo de Tessier el más cercano en cuanto a los valores reportados. En forma similar se comportan los valores estimados por los modelos en el hidrolizado de raquis sin detoxificar, donde se puede destacar que los resultados estimados fueron muy similares entre los modelos y alejados completamente de los experimentales. Es necesario resaltar que la modelación del consumo de sustrato tomo como base la ecuación (5), la cual está muy relacionada con las variables de la cinética de crecimiento de cada modelo estudiado.

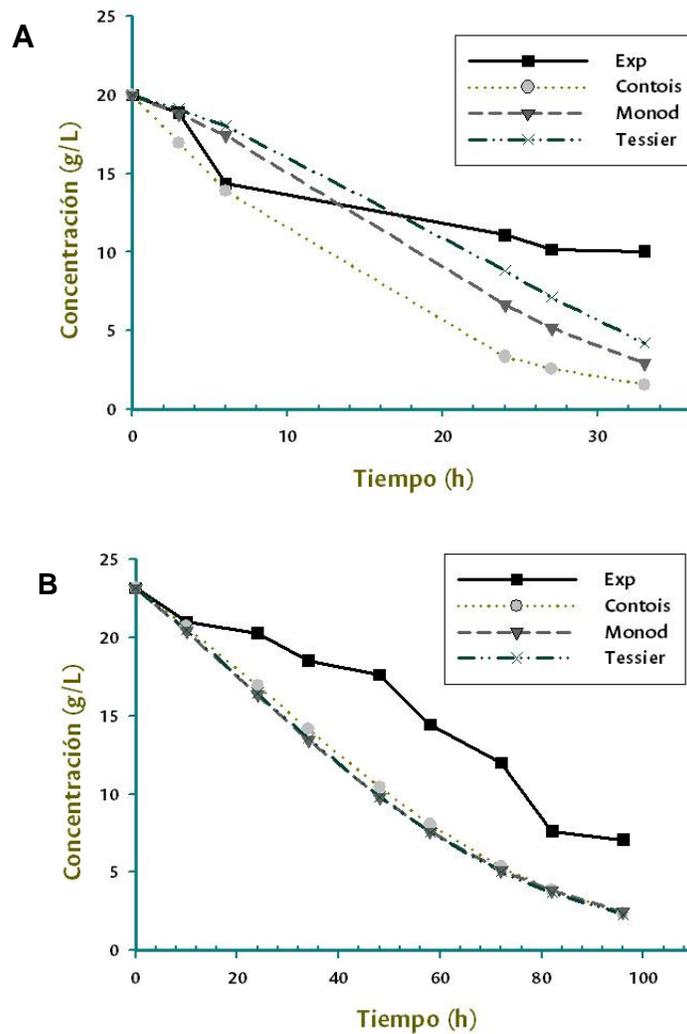


Figura 6-2: Concentración de xilosa durante la fermentación en medio YPX (a) y en hidrolizado de raquis sin detoxificar (b).

6.4.3. Cinética de producción de xilitol

La producción de xilitol durante la fermentación en medio sintético y en hidrolizado de raquis sin detoxificar se muestra en la Figura 6-3. Todos los modelos empleados son muy parecidos entre sí y predicen adecuadamente la producción de xilitol sobre todo en medio sintético. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la ecuación base para el desarrollo de esta cinética fue la de Luedeking-Piret en todos los modelos, aunque también dependen de otros parámetros que se encuentran tanto en el crecimiento celular como

en el consumo de sustrato. Como se reportó en la ecuación 4, la ecuación de Luedeking-Piret para describir la formación de producto es función del crecimiento y el mantenimiento celular (Veeravalli and Mathews 2018). La ecuación de Luedeking-Piret se desarrolló originalmente para explicar la cinética de fermentación de la glucosa en la secreción de ácido láctico basada en la velocidad instantánea de crecimiento y la densidad bacteriana.

Sin embargo, se ha modificado para relacionar la tasa de producción de cualquier metabolito con el consumo y la concentración de sustrato (Mahdinia et al. 2019). Se puede evidenciar que la concentración de xilitol es mayor en hidrolizado de raquis sin detoxificar con un valor alrededor de 6 g/L en comparación con el medio sintético que es de 1.3 g/L. Los estudios han demostrado que la producción de xilitol se afecta por muchos factores como el tipo de microorganismo utilizado, la composición del medio y las condiciones ambientales como el pH, la temperatura, la agitación y la aireación (L. Mohamad et al. 2016; Pappu and Gummadi 2016)

6.4.4. Comparación de los modelos

Un modelo cinético es de gran ayuda para entender y optimizar un proceso de fermentación (Zhu, Fang, and Wang 2016). La Tabla 6-1 muestra los parámetros estimados de cada modelo durante la fermentación de *C. tropicalis* en dos medios de cultivo. El modelamiento matemático del comportamiento del crecimiento celular es altamente investigado para controlar, predecir y diseñar el procesamiento, la estabilidad y la seguridad de los alimentos y bioproductos (Guo et al. 2018; Pappu and Gummadi 2016).

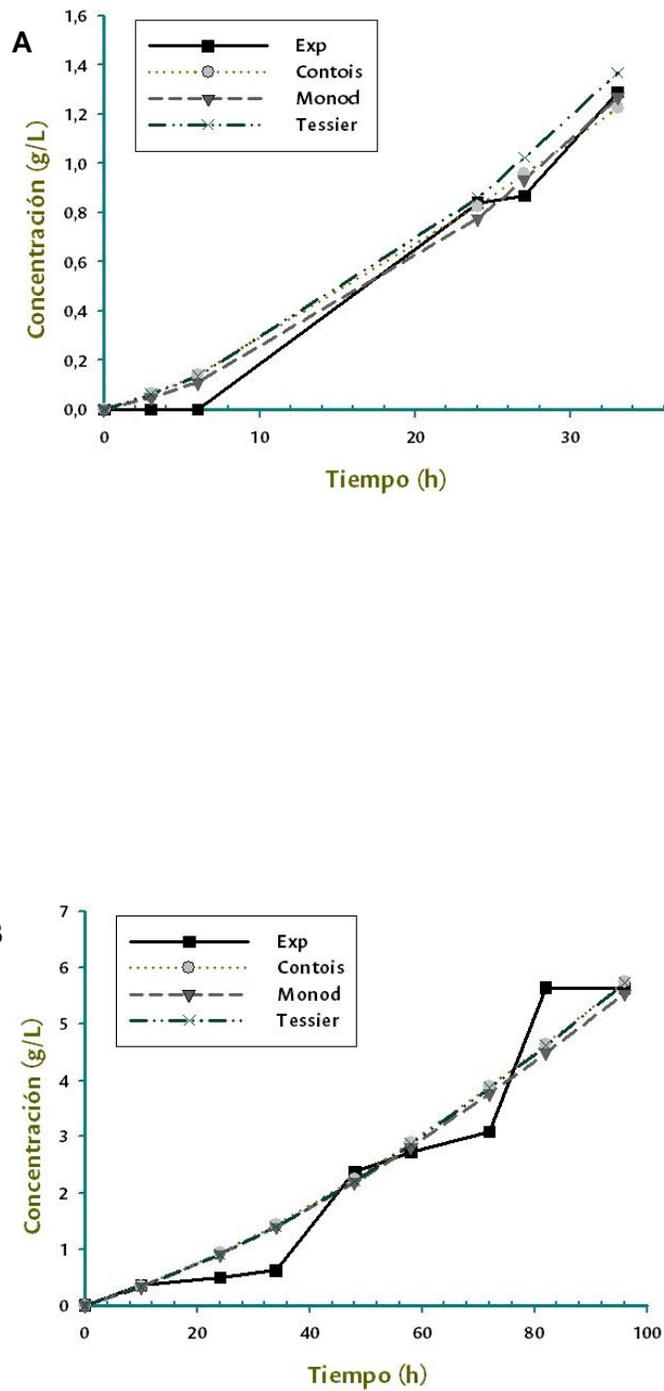


Figura 6-3: Concentración de xilitol durante la fermentación en medio YPX (a) y en hidrolizado de raquis sin detoxificar (b).

Las ecuaciones de Monod y Tessier se emplean normalmente para describir el crecimiento con una población baja celular; mientras que el modelo de Contois se trabaja

usualmente mejor en cultivos con alta densidad celular (Aguiar et al. 2002). La cinética de Monod, expresada como la degradación del sustrato resultado de la absorción microbiana y la concentración celular, tiene una gran influencia en las velocidades de degradación. La cinética de Contois considera el hecho de que una alta concentración de células adheridas a la superficie de las partículas podría inhibir la degradación del sustrato. Mientras que la cinética de Tessier tiene en cuenta la energía de mantenimiento para la actividad celular, lo que significa que la tasa máxima de crecimiento se reducirá cuando la concentración de sustrato es menor y los microorganismos compiten por las fuentes de alimento (Y. Wang and Witarsa 2016).

La velocidad de crecimiento específica máxima experimental (μ_{\max}) se calculó a partir de la pendiente de la línea de regresión del logaritmo natural de los números de células ($\ln X$) en la fase creciente en función del tiempo (L. Mohamad et al. 2016). Es necesario resaltar que el valor experimental de μ_{\max} en el medio sintético fue muy parecido al reportado por el modelo de Tessier, mientras que en hidrolizado de raquis sin detoxificar estuvo más cercado al obtenido en la ecuación de Contois (Tabla 6- 1). También se observa que el valor experimental de μ_{\max} es mayor en el medio sintético que en el hidrolizado, lo que indica que el medio influye en el potencial del crecimiento celular. Generalmente, el extracto de levadura proporciona buenos factores de crecimiento y nitrógeno orgánico para los microorganismos. Además, las actividades de las enzimas involucradas en el crecimiento celular se inhiben por los cambios en el medio de cultivo (Zhu, Fang, and Wang 2016).

La μ_{\max} de una levadura comúnmente está entre 0.2 y 0.5 h⁻¹. En el crecimiento de *C. guilliermondii* empleando un medio sintético para la producción de xilitol se encontró un valor de μ_{\max} para el modelo de Contois de 0.25 h⁻¹, muy cercano al experimental de ese estudio (0.24 h⁻¹) (Aguiar et al. 2002). Sin embargo, en otros trabajos el valor ha estado por debajo de lo reportado anteriormente. En la producción de xilitol con *C. parapsilosis* en medio sintético se obtuvieron valores de μ_{\max} de 0.1 a 0.13 h⁻¹ (Aranda-Barradas, Delia, and Riba 2000); con *C. tropicalis* en medio sintético se reportó un valor de 0.12 h⁻¹ (L. Mohamad et al. 2016) y con *Debaryomyces nepalensis* en medio sintético fueron valores de 0.029 a 0.078 h⁻¹ (Pappu and Gummadi 2016). Los valores de esta última investigación estuvieron muy cercanos a los valores experimentales reportados por

nosotros. Esto indica que la μ_{max} depende experimentalmente de las condiciones de fermentación y los microorganismos utilizados.

Los valores experimentales del rendimiento de xilitol ($Y_{P/S}$) y celular ($Y_{X/S}$) fueron mayores en el hidrolizado que en el medio sintético. Los datos de los modelos se acercaron más a los resultados experimentales de $Y_{X/S}$ que de $Y_{P/S}$, siendo este último muy parecido entre los modelos. Esto probablemente se debe a que la ecuación base utilizada para la modelación de producto fue la misma para todos los modelos como se mencionó anteriormente. La producción de xilitol con *C. tropicalis* en medio sintético encontraron valores de $Y_{X/S}$ y $Y_{P/S}$ entre 0.09 a 0.15 ($g\ g^{-1}$) y entre 0.13 a 0.41 ($g\ g^{-1}$), respectivamente (L. Mohamad et al. 2016). Con respecto a la producción de xilitol con *Debaryomyces nepalensis* en medio sintético se reportaron valores de $Y_{X/S}$ y $Y_{P/S}$ entre 0.1 a 0.6 ($g\ g^{-1}$) y 0.1 a 0.5 ($g\ g^{-1}$), respectivamente (Pappu and Gummadi 2016). Los valores experimentales de nuestro estudio son levemente mayores para $Y_{X/S}$, mientras que los datos de $Y_{P/S}$ están en el rango de la literatura.

Tabla 6-1: Valores estimados de los parámetros de crecimiento celular, consumo de xilosa y producción de xilitol durante la fermentación con *Candida tropicalis* en diferentes medios de cultivo aplicando modelos no estructurados.

Medio de cultivo	Modelo	μ_{max}^a	$Y_{X/S}^c$	$Y_{P/S}^b$	Alfa	Beta	ms^d
Medio sintético YPX	Experimental	0.076	0.65	0.13			
	Monod	0.5	0.7	0.8	0.05	0.004	2.39e -07
	Contois	0.5	0.69	0.8	0.05	0.004	0.03
	Tessier	0.08	0.7	0.8	0.08	0.006	0.089
Hidrolizado de raquis sin detoxificar	Experimental	0.033	0.727	0.364			
	Monod	0.58	0.8	0.7	0.01	0.006	0.051
	Contois	0.026	0.8	0.7	0.02	0.0065	0.000000117
	Tessier	0.1	0.79	0.69	0.001	0.006	0.000000245

^aVelocidad máxima específica de crecimiento (h^{-1}), ^bRendimiento producto-sustrato (g de xilitol g^{-1} de xilosa), ^cRendimiento biomasa-sustrato (g de células g^{-1} de xilosa) ^dCoefficiente de mantenimiento (g de xilosa g^{-1} de células h^{-1}).

Los cultivos microbianos que no crecen o crecen lentamente pueden reciclar gran parte de la energía metabólica derivada de la fermentación inicial de un polisacárido para impulsar la producción adicional de un metabolito secundario (Singh et al. 2019). Con el fin de determinar si esto podría estar ocurriendo en este estudio, se determinó la cantidad

de sustrato utilizado para la biomasa en la fase de no crecimiento y el coeficiente de mantenimiento para la *C. tropicalis* en medio sintético y en hidrolizado de raquis sin detoxificar (Tabla 6-1). El coeficiente de mantenimiento indica la porción de sustrato consumido para el mantenimiento de la función celular y se emplea como una corrección para la cinética del crecimiento microbiano (Y. Wang and Witarsa 2016). En medio sintético, los valores estimados de los coeficientes de mantenimiento mostraron que en el modelo de Tessier se utilizó más xilosa para sus componentes no crecientes, que contribuyeron a la formación de xilitol; mientras en el hidrolizado, el modelo de Monod mostró mayor utilización de xilosa para sus componentes no crecientes. Los valores estimados de los coeficientes de mantenimiento son bajos comparados con la literatura (Pappu and Gummadi 2016; Singh et al. 2019), lo que podría suponer que el xilitol se produce principalmente durante la fase de crecimiento celular.

El coeficiente de formación de producto estimado (*alfa*), que representa la producción de xilitol asociada al crecimiento, siempre fue mayor en todos los modelos en ambos medios, exceptuando el modelo de Tessier en hidrolizado. Esto indica que la formación de xilitol depende del crecimiento celular. La producción de xilitol en la fase estacionaria está representada por *beta*, que es el coeficiente de producto de no crecimiento. Un valor comparativamente bajo de *beta* sugiere que la producción de xilitol se mantiene baja en condiciones de no crecimiento. Estos resultados están de acuerdo a lo reportado anteriormente para el coeficiente de mantenimiento.

Tabla 6-2: Parámetros estimados y desviaciones de los modelos aplicados en la fermentación con *Candida tropicalis* con diferentes medios de cultivo

Medio de cultivo	Modelo	Ks	B	Kt	CV biomasa (%)	CV sustrato (%)	CV producto (%)	RSME biomasa	RSME sustrato	RSME producto
Medio sintético YPX	Monod	104.13	-	-	21	32	12	1.04	4.174	0.062
	Contois	-	15	-	15	48	15	0.788	5.684	0.078
	Tessier	-	-	14.47	32	24	17	1.51	3.223	0.094
Hidrolizado de raquis sin detoxificar	Monod	600	-	-	33	38	23	3.318	5.093	0.54
	Contois	-	1.76	-	33	35	22	3.325	4.769	0.533

	Tessier	-	-	96.2 4	32	38	22	3.21	5.124	0.525
--	---------	---	---	-----------	----	----	----	------	-------	-------

Los parámetros cinéticos estimados, los coeficientes de variación (CV) y la raíz cuadrada del error mínimo (RSME) de los modelos se muestran en la Tabla 6-2. Los CV y RSME son más bajos en medio sintético que en hidrolizado, exceptuando los CV y RSME de sustrato del modelo de Contois que reporta un valor de 48% y 5.684, respectivamente. Menores valores de CV y RSME representan mejor aplicación del modelo (Pappu and Gummadi 2016). Si nos enfocamos solo en estos valores, se podría pensar que el modelo de Monod es el más representativo en medio sintético y el modelo de Contois en el hidrolizado. Sin embargo, al tener en cuenta los valores experimentales de μ_{\max} y $Y_{x/s}$, los modelos que más se acercan a la realidad son Tessier en medio sintético y Contois en hidrolizado. Esto último es fundamental aclararlo, ya que un modelo es la representación matemática de un fenómeno o proceso, y aparentemente puede tener una buena capacidad de predicción representada en diferentes comparaciones estadísticas y errores experimentales; pero ante todo el modelo debe estar acorde con la predicción adecuada de lo que sucede en la realidad. Como la fermentación es un bioproceso complejo, es difícil obtener un perfil completo para revelar lo que realmente sucede durante todo el proceso y predecir la cinética del crecimiento y el metabolismo de las células en ciertas condiciones. Aunque se han llevado a cabo una enorme cantidad de investigaciones sobre el modelado matemático de los procesos microbianos, la aplicabilidad de los conceptos biológicos en los modelos sigue siendo limitada (Tian et al. 2018)

6.5. Conclusiones

Modelos no estructurados para el crecimiento celular, consumo de xilosa y producción de xilitol fueron aplicados en la fermentación por *C.tropicalis* en medio sintético y en hidrolizado de raquis sin detoxificar. De acuerdo con los valores experimentales y la comparación de la evaluación del desempeño de los modelos, estos revelan que el modelo de Tessier predice mejor los resultados en medio sintético y el modelo de Contois tiene mejor ajuste en hidrolizado de raquis sin detoxificar.

El xilitol es un metabolito asociado al crecimiento celular. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que este tipo de procesos son complejos y dependen de diversas variables. Además, la aplicabilidad de los conceptos biológicos en los modelos sigue siendo limitada.

Referencias

- Aguiar, Wilson B. et al. 2002. "Growth Model and Prediction of Oxygen Transfer Rate for Xylitol Production from D-Xylose by *C. Guilliermondii*." *Biochemical Engineering Journal* 12(1): 49–59.
- Aranda-Barradas, J. S., M. L. Delia, and J. P. Riba. 2000. "Kinetic Study and Modelling of the Xylitol Production Using *Candida Parapsilosis* in Oxygen-Limited Culture Conditions." *Bioprocess Engineering* 22(3): 219–25.
- Guo, Dong-Sheng et al. 2018. "Development of a Multi-Stage Continuous Fermentation Strategy for Docosahexaenoic Acid Production by *Schizochytrium* Sp." *Bioresource Technology* 269(July): 32–39.
- Krichen, E. et al. 2017. "High Biomass Density Promotes Density-Dependent Microbial Growth Rate." *Biochemical Engineering Journal* 130: 66–75.
- Kucharska, Karolina et al. 2018. "Key Issues in Modeling and Optimization of Lignocellulosic Biomass Fermentative Conversion to Gaseous Biofuels." *Renewable Energy* 129: 384–408.
- Mahdinia, Ehsan et al. 2019. "Modeling of Vitamin K (Menaquinone-7) Fermentation by *Bacillus Subtilis* Natto in Biofilm Reactors." *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 17(April 2018): 196–202.
- Manjarres-Pinzon, Mario Arias-Zabala, Guillermo Correa-Londono, and Eduardo Rodriguez-Sandoval. 2017. "Xylose Recovery from Dilute-Acid Hydrolysis of Oil Palm (*Elaeis Guineensis*) Empty Fruit Bunches for Xylitol Production." *African Journal of Biotechnology* 16(41): 1997–2008.
- Manjarres, JK et al. 2018. "Biotechnological Production of Xylitol from Oil Palm Empty Fruit Bunches Hydrolysate." *Advance Journal of Food Science and Technology* 16(SPL): 134–37.
- Mohamad, Lina et al. 2016. "Dynamic Mathematical Modelling of Reaction Kinetics for Xylitol Fermentation Using *Candida Tropicalis*." *Biochemical Engineering Journal* 111: 10–17.
- Pappu, J. Sharon Mano, and Sathyanarayana N. Gummadi. 2016. "Modeling and Simulation of Xylitol Production in Bioreactor by *Debaryomyces Nepalensis* NCYC 3413 Using Unstructured and Artificial Neural Network Models." *Bioresource*

- Technology* 220(2016): 490–99.
- Piñeros-Castro, Yineth et al. 2011. “Producción de Azúcares Fermentables Por Hidrólisis Enzimática de Cascarilla de Arroz Pretratada Mediante Explosión Con Vapor. (Spanish).” *Revista Ion* 24(2): 23–28.
- Sakthipriya, N., Mukesh Doble, and Jitendra S. Sangwai. 2018. “Kinetic and Thermodynamic Behavior of the Biodegradation of Waxy Crude Oil Using *Bacillus Subtilis*.” *Journal of Petroleum Science and Engineering* 160(June 2017): 412–21.
- Singh, Raghuveer et al. 2019. “Comparative Kinetic Modeling of Growth and Molecular Hydrogen Overproduction by Engineered Strains of *Thermotoga Maritima*.” *International Journal of Hydrogen Energy* 4.
- Tian, Xiwei et al. 2018. “Kinetic Analysis of Sodium Gluconate Production by *Aspergillus Niger* with Different Inlet Oxygen Concentrations.” *Bioprocess and Biosystems Engineering* 41(11): 1697–1706.
- Tochampa, Worasit et al. 2005. “A Model of Xylitol Production by the Yeast *Candida Mogii*.” *Bioprocess and Biosystems Engineering* 28(3): 175–83.
- Veeravalli, Sathyanarayanan S., and Alexander P. Mathews. 2018. “Continuous Fermentation of Xylose to Short Chain Fatty Acids by *Lactobacillus Buchneri* under Low PH Conditions.” *Chemical Engineering Journal* 337(December 2017): 764–71.
- Wang, Yongjiang, and Freddy Witarsa. 2016. “Application of Contois, Tessier, and First-Order Kinetics for Modeling and Simulation of a Composting Decomposition Process.” *Bioresource Technology* 220: 384–93.
- Zhu, Chunjie, Baishan Fang, and Shizhen Wang. 2016. “Effects of Culture Conditions on the Kinetic Behavior of 1,3-Propanediol Fermentation by *Clostridium Butyricum* with a Kinetic Model.” *Bioresource Technology* 212: 130–37.

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1. Conclusiones

Aprovechar la fracción hemicelulósica del raquis de palma, hizo necesario estudiar las mejores condiciones para la liberación de la xilosa. Emplear hidrólisis ácida diluida con una temperatura de operación de 121°C, durante 30 min, una relación de sólido: líquido 1:8, una concentración de ácido del 2% y un tamaño de partícula de 4 cm mostró ser el mejor procedimiento para obtener hidrolizados de raquis de palma con concentraciones de xilosa de 32.597 g L⁻¹ y glucosa de 0.769 g L⁻¹. En estas condiciones, las concentraciones de inhibidores perjudiciales para la levadura como HMF y ácido acético son mínimas.

En general, el hidrolizado de raquis de palma es una fuente de carbono para el crecimiento y producción de xilitol por levaduras de género *Candida sp.* Sin embargo, *C. guilliermondii* pierde su capacidad metabólica para la producción de xilitol a medida que se usan siembras sucesivas; quizás el tipo de pase es uno de los factores que tiene gran influencia en esta levadura lo que pudo deberse a la pérdida de material genético que codifica para proteínas importantes en la ruta metabólica de la xilosa a xilitol.

Además del tipo de pase de las cepas, fue importante estudiar la influencia de la detoxificación en la eficiencia de las levaduras para producir xilitol. El carbón activado al 2.5%, pH 4 y tiempo de contacto de 30 min es el mejor método para detoxificar hidrolizados de raquis de palma. Sin embargo, el hidrolizado sin detoxificar resultó ser el mejor medio para la producción de xilitol con *Candida tropicalis*, en comparación con hidrolizados detoxificados y otros medios sintéticos, lo que representa una ventaja

económica y posesiona al hidrolizado de raquis de palma como un medio viable para la producción de xilitol.

El estudio de las fermentaciones a escala de matraz mostró que *C. tropicalis*, a unas condiciones de pH de 6.0, inóculo de 5.42 g L⁻¹, volumen de 26 mL y concentración de xilosa inicial de 20 g L⁻¹, mostró ser la más adecuada para la producción de xilitol, y el modelo no estructurado de Contois es el mejor para representar el crecimiento celular y la producción de xilitol a esta escala.

Por otra parte, la producción de xilitol a escala de biorreactor de 7 L tiene lugar después de un tiempo de fermentación de 144 h, donde condiciones limitadas de oxígeno (30% de oxígeno disuelto) y agitaciones bajas (50 rpm), resultaron ser las mejores con una toma de xilosa del 95.5%, una producción máxima de xilitol de 5.46 g/L y una actividad xilosa reductasa de 0.646 U mg⁻¹ proteína. No sólo los altos niveles de actividad xilosa reductasa representan una mayor producción de xilitol, sino que esta enzima debe aumentar gradualmente durante toda la fermentación para garantizar la reducción de la xilosa a xilitol por *C. tropicalis*, levadura que presentó mejores resultados durante las fermentaciones del hidrolizado de raquis de palma.

7.2. Recomendaciones

Con el propósito de fortalecer investigaciones futuras en el marco del aprovechamiento de residuos lignocelulósicos como el raquis de palma se plantean las siguientes recomendaciones:

Evaluar de diferentes cepas para la producción de xilitol en condiciones de oxígeno disuelto por debajo de 30% en escala de matraz.

Estudiar la suplementación de otras fuentes de nitrógeno, otras fuentes de carbono como glucosa y glicerol para evaluar su influencia en la producción de xilitol.

Evaluar otros metabolitos como etanol que pueden presentarse en este proceso en cualquiera de las escalas estudiadas.

Estudiar la influencia sobre la producción de xilitol de otras concentraciones iniciales de sustrato, diferentes a las presentadas en este trabajo.

Evaluar el efecto de la edad del inóculo de las cepas sobre la producción de xilitol a escala de matraz y biorreactor.

Evaluar otras enzimas claves como xilitol deshidrogenasa para conocer el comportamiento metabólico de las cepas en diferentes condiciones de oxígeno disuelto y agitación.

Ensayar técnicas para la extracción y purificación del xilitol producido con raquis de palma y levadura del género *Candida sp.*

Estudiar el aprovechamiento de la fracción celulósica y hemicelulósica la mediante la cofermentación con levaduras capaces de producir etanol y xilitol al mismo tiempo de fermentación.

Realizar un análisis elemental rayos X (XRD) sobre el raquis hidrolizado para correlacionarlo con los resultados de SEM.

Efectuar una caracterización química del raquis residual con el fin de profundizar en el análisis de resultados

A. Anexo: Prueba de bondad de ajuste en los modelos para producción de xilitol

Source	Sum of square	DF	Mean square	F value
Linear	20.58	20	1.03	14.68
2FI	14.65	14	1.05	14.93
Quadratic	5.97	10	0.60	8.52
Cubic	3.33	2	1.67	23.78
Pure Error	0.35	5	0.70	

B. Anexo: Soluciones durante la optimización de la producción de xilitol

Solutions Number	pH	Biomasa	Sustrato	Volumen	Xilitol	Desirability
1	6.00	6.95	20.00	26.00	4.38555	0.748
2	6.00	6.05	20.01	26.00	4.33243	0.741
3	6.00	7.00	21.12	26.01	4.44708	0.735
4	<u>6.00</u>	<u>5.42</u>	<u>20.01</u>	<u>26.00</u>	<u>4.25316</u>	<u>0.730</u>
5	<u>5.24</u>	<u>6.01</u>	<u>20.01</u>	<u>26.00</u>	<u>4.05887</u>	<u>0.703</u>
6	<u>5.20</u>	<u>7.00</u>	<u>20.00</u>	<u>26.00</u>	<u>4.05564</u>	<u>0.702</u>
7	<u>4.00</u>	<u>5.71</u>	<u>22.26</u>	<u>26.08</u>	<u>4.30794</u>	<u>0.695</u>
8	<u>4.00</u>	<u>5.77</u>	<u>22.26</u>	<u>26.06</u>	<u>4.30782</u>	<u>0.695</u>
9	<u>4.11</u>	<u>5.58</u>	<u>22.12</u>	<u>26.00</u>	<u>4.26611</u>	<u>0.692</u>
10	<u>4.00</u>	<u>3.34</u>	<u>22.63</u>	<u>34.19</u>	<u>3.94542</u>	<u>0.639</u>