



---

# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Área Temática: Biotecnología Alimentaria

TESIS:

**“CARACTERIZACIÓN FERMENTATIVA DE LA PRODUCCIÓN DE  
XILITOL POR *Candida magnoliae* UTILIZANDO HIDROLIZADOS  
DE SEMILLA DE TAMARINDO COMO SUSTRATO”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Presenta:

**IBQ Ricardo Martínez Corona**

Director de tesis:

**D. C. Carlos Cortés Penagos**

Co-director de tesis:

**D. C. Juan Carlos González Hernández**

MORELIA, MICHOACÁN

ABRIL 2013

*A mi mamá, el motor de mi existencia.  
A mi papá, el mejor ejemplo de vida que pude tener.  
A mi hermana, mi apoyo, mi protectora.*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios. Por llenarme de tantas bendiciones, comenzando por mi hermosa familia. Por permitirme hacer lo que más me gusta. Por seguir cuidando mis pasos.

A mis padres. A mi mamá, la Josha, la cual llena de alegría y de amor mi vida día a día, no importa que tan complicado pueda ser el panorama; sería imposible expresarte cuánto te quiero y lo afortunado que me siento de ser tu hijo, tu amor es lo más preciado que pueda tener. A mi papá, por estar siempre ahí, por tener siempre las palabras indicadas para apoyarme y salir adelante, por compartir conmigo tantos momentos tan sencillos, pero tan significativos; te admiro infinitamente, espero algún día poder llegar a ser sólo un poco de lo que tú eres. Este y todos mis logros, siempre serán suyos. Los amo.

A mi hermana Paola, porque más que eso, es mi amiga. Por siempre cuidarme, por siempre protegerme. Por escucharme, por aconsejarme. Porque contigo compartimos los momentos más difíciles, pero también los más hermosos y divertidos. Gracias por quererme tanto, te amo.

A mis asesores y sinodales. Al Dr. Carlos Cortés Penagos, por darme la oportunidad de trabajar con él, por su apoyo, su atención y amabilidad. De manera especial al Dr. Juan Carlos González Hernández, por su confianza y amistad, por inculcarme el gusto por la investigación. A la Dra. Ma. del Carmen Chávez Parga, la Mtra. Mariana Alvarez Navarrete y el Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores, por compartirme su conocimiento, por sus consejos y observaciones. A todos ellos, porque no solamente son grandes investigadores, sino también son grandes personas.

A mi amiga, Diana, que siempre está ahí para ayudarme, darme palabras de ánimo y regalarme un sinfín de sonrisas. Por enseñarme que la vida es y siempre será para disfrutarse. Gracias por ser mi mejor amiga.

A todos mis amigos, que cerca o lejos siempre están apoyándome y compartiendo mis alegrías y tristezas. Por su sinceridad, por quererme como soy. Gracias Luis, Héctor, Óscar, Manuel, Juan Carlos, Vero, Diego, Jorge.

A mis compañeros y amigos de la maestría, por hacer de éste un camino fácil de transitar. De manera muy especial a Karla y Nora, las cuales me han brindado su amistad y momentos divertidos de principio a fin.

A mis ayudantes en el proyecto, con las cuales no sólo compartí momentos agradables en el laboratorio, sino también su amistad. A Idania y Alicia. A Manjuro y Karen. Gracias por su ayuda, espero les guste el resultado de su apoyo.

Finalmente, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo de beca otorgada.

Este trabajo ha sido gracias a ustedes.

## RESUMEN

La semilla de tamarindo está compuesta en un 50 a 72 % de un heteropolisacárido ramificado, llamado xiloglucano, conformado principalmente por D-glucosa, D-xilosa, D-galactosa y L-arabinosa. Al fragmentar el xiloglucano mediante un proceso acoplado de hidrólisis ácida y tratamiento térmico, es posible obtener cantidades considerables de azúcares fermentables, donde sobresalen la glucosa y la xilosa

La xilosa es el precursor del xilitol, el cual es un azúcar con características similares a la sacarosa; ha sido reportado su uso en tratamiento para diabéticos como un edulcorante alternativo, y en la prevención y tratamiento de las caries, ya que induce la remineralización de los dientes. La síntesis química del xilitol es muy costosa y de bajos rendimientos. Por otra parte, el xilitol puede ser obtenido por fermentación, usando levaduras que incorporan la xilosa a su metabolismo, tal como *Candida magnoliae*.

Al tratarse de un proceso biológico, la producción de xilitol por fermentación depende de diversos factores ambientales. Por ello, la importancia de evaluar el efecto de algunos de ellos: concentración inicial de sustrato, agitación y aireación.

La evaluación del efecto de la concentración inicial de sustrato y agitación, a nivel matraz, se realizó a partir de un diseño experimental factorial  $3^2$ . Ambos factores influyeron considerablemente sobre la producción de xilitol de *C. magnoliae*, donde la optimización del diseño experimental predijo un rendimiento de 0.57 g de xilitol/g de xilosa, a una concentración inicial de sustrato de 50 g/L y una agitación de 177 rpm.

Por otro lado, el efecto de la agitación y aireación sobre la síntesis de xilitol por fermentación de medios hidrolizados de semilla de tamarindo utilizando *C. magnoliae*, se midió con un diseño experimental  $2^2$  con un punto central. En este caso, la aireación y la interacción entre los factores fueron las que tuvieron un efecto significativo sobre la producción de xilitol. El mayor rendimiento alcanzado fue de 0.71 g de xilitol/g de xilosa, a una agitación de 100 rpm y una aireación de 0.1 vvm.

Así, los tres factores evaluados tuvieron un alto impacto sobre la obtención de xilitol utilizando *C. magnoliae*, una levadura poco estudiada y que se postula como una buena productora de xilitol. Además, el hidrolizado de semilla de tamarindo es un medio rico en azúcares fermentables, que puede ser aprovechado para la producción de compuestos de interés, como el xilitol.

## CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	2
2.1 TAMARINDO	2
2.1.1 COMPOSICIÓN DE LA SEMILLA DE TAMARINDO	2
2.1.2 USOS PRINCIPALES DE LA SEMILLA DE TAMARINDO	3
2.2 XILITOL	4
2.2.1 PROPIEDADES QUÍMICAS Y FISIOLÓGICAS	4
2.2.2 PRODUCCIÓN DEL XILITOL	5
2.3 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE XILITOL	7
2.3.1 METABOLISMO DE LA XILOSA EN LEVADURAS NO-CONVENCIONALES	8
2.4 ANTECEDENTES	10
2.4.1 OBTENCIÓN DE XILITOL POR CONVERSIÓN BIOTECNOLÓGICA	10
2.4.2 HIDRÓLISIS DE LA SEMILLA DE TAMARINDO	12
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	14
<b>4. HIPÓTESIS</b>	15
<b>5. OBJETIVOS</b>	15
<b>6. METODOLOGÍA</b>	16
6.1 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LA SEMILLA DE TAMARINDO	17
6.2 DISEÑO EXPERIMENTAL A NIVEL MATRAZ	17
6.3 ACONDICIONAMIENTO DE LA SEMILLA DE TAMARINDO	19
6.4 HIDRÓLISIS	19
6.5 CARACTERIZACIÓN DEL MEDIO HIDROLIZADO DE SEMILLA DE TAMARINDO	19
6.6 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	20
6.7 LEVADURA	20
6.8 PREPARACIÓN DE INÓCULO	20
6.9 FERMENTACIÓN	20
6.10 CUANTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN	21
6.11 ANÁLISIS DE RESULTADOS	22
6.12 DISEÑO EXPERIMENTAL A NIVEL BIORREACTOR	22
6.13 ENSAYOS DE FERMENTACIÓN EN BIORREACTOR	23
<b>7. RESULTADOS</b>	25
7.1 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LA SEMILLA DE TAMARINDO	25
7.2 DISEÑO EXPERIMENTAL NIVEL MATRAZ	25
7.2.1 CRECIMIENTO CELULAR	26
7.2.2 CONSUMO DE GLUCOSA Y PRODUCCIÓN DE ETANOL	28
7.2.3 CONSUMO DE XILOSA Y PRODUCCIÓN DE XILITOL	31
7.2.4 PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y GLICEROL	33
7.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DISEÑO EXPERIMENTAL A NIVEL MATRAZ	34
7.2.5.1 TIEMPO DE DUPLICACIÓN (td)	34

7.2.5.2 RENDIMIENTO PRODUCTO-SUSTRATO ( $Y_{p/s}$ )	36
7.2.5.3 PRODUCCIÓN DE XILITOL	38
7.2.5.4 PRUEBA ESTADÍSTICA DE TUKEY-KRAMER	40
7.2.5.5 OPTIMIZACIÓN DEL RENDIMIENTO PRODUCTO-SUSTRATO	41
7.3 DISEÑO EXPERIMENTAL NIVEL BIORREACTOR	42
7.3.1 CRECIMIENTO CELULAR	42
7.3.2 pH Y OXÍGENO DISUELTO	44
7.3.3 CONSUMO DE GLUCOSA Y PRODUCCIÓN DE ETANOL	45
7.3.4 CONSUMO DE XILOSA Y PRODUCCIÓN DE XILITOL	47
7.3.5 PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y GLICEROL	50
7.3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DISEÑO EXPERIMENTAL A NIVEL BIORREACTOR	51
7.3.6.1 TIEMPO DE DUPLICACIÓN ( $t_d$ )	51
7.3.6.2 RENDIMIENTO PRODUCTO-SUSTRATO ( $Y_{p/s}$ )	52
7.3.6.3 PRODUCCIÓN DE XILITOL	54
7.3.6.4 PRUEBA ESTADÍSTICA DE TUKEY-KRAMER	56
<b>8. DISCUSIÓN</b>	57
8.1 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LA SEMILLA	57
8.2 HIDROLIZADO DE SEMILLA DE TAMARINDO	57
8.3 DISEÑO EXPERIMENTAL NIVEL MATRAZ	58
8.4 DISEÑO EXPERIMENTAL NIVEL BIORREACTOR	63
<b>9. CONCLUSIONES</b>	67
<b>10. REFERENCIAS CONSULTADAS</b>	69
<b>11. ANEXOS</b>	75
11.1 SELECCIÓN DE LA LEVADURA UTILIZADA EN LOS DISEÑOS EXPERIMENTALES	75
11.2 IDENTIFICACIÓN DE AZÚCARES EN EL MEDIO HIDROLIZADO DE SEMILLA DE TAMARINDO	82
11.3 ARTÍCULOS	84
11.4 PRESENTACIONES EN CONGRESOS	86

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición de la semilla de tamarindo	2
<b>Tabla 2.</b> Poder edulcorante de algunos carbohidratos	4
<b>Tabla 3.</b> Especies comúnmente usadas en la síntesis de xilitol	7
<b>Tabla 4.</b> Antecedentes experimentales en la producción de xilitol por conversión biotecnológica	11
<b>Tabla 5.</b> Tratamientos con la mayor liberación de azúcares reductores y xilosa	13
<b>Tabla 6.</b> Métodos utilizados en los análisis bromatológicos para la semilla de tamarindo	17
<b>Tabla 7.</b> Valores codificados para cada factor evaluado con el diseño experimental $3^2$	18
<b>Tabla 8.</b> Tratamientos del diseño factorial $3^2$	18
<b>Tabla 9.</b> Valores codificados para cada factor evaluado con el diseño experimental $2^2$ con punto central	22
<b>Tabla 10.</b> Tratamientos del diseño factorial $2^2$ con punto central	22
<b>Tabla 11.</b> Características del biorreactor utilizado en el diseño experimental	23
<b>Tabla 12.</b> Flujo de aire en el rotámetro para cada nivel del diseño experimental $2^2$ con punto central	24
<b>Tabla 13.</b> Composición de la semilla de tamarindo con testa y sin testa	25
<b>Tabla 14.</b> Composición del medio hidrolizado de semilla de tamarindo a diferentes concentraciones iniciales de sustrato para el diseño experimental $3^2$	26
<b>Tabla 15.</b> Valores promedio de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), tiempo de duplicación ( $t_d$ ) y velocidad de división ( $\delta$ ) para el diseño experimental $3^2$	28
<b>Tabla 16.</b> Rendimiento producto-sustrato ( $Y_{p/s}$ ) promedio para los distintos tratamientos del diseño experimental $3^2$	33
<b>Tabla 17.</b> Producción máxima de biomasa y glicerol para los distintos tratamientos del diseño experimental $3^2$	34
<b>Tabla 18.</b> Análisis de varianza descompuesto a efectos con un grado de libertad para el tiempo de duplicación del diseño experimental $3^2$	35
<b>Tabla 19.</b> Análisis de varianza descompuesto a efectos con un grado de libertad para el rendimiento producto-sustrato del diseño experimental $3^2$	37
<b>Tabla 20.</b> Análisis de varianza descompuesto a efectos con un grado de libertad para la producción de xilitol del diseño experimental $3^2$	39
<b>Tabla 21.</b> Resultados promedio del diseño experimental $3^2$ para distintos parámetros comparados mediante la prueba estadística Tukey-Kramer	41
<b>Tabla 22.</b> Composición del medio hidrolizado de semilla de tamarindo para tratamientos del diseño $2^2$ con punto central	42
<b>Tabla 23.</b> Valores promedio de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), tiempo de duplicación ( $t_d$ ) y velocidad de división ( $\delta$ ) para el diseño experimental $2^2$ con punto central	44
<b>Tabla 24.</b> Rendimiento producto-sustrato ( $Y_{p/s}$ ) promedio para los distintos tratamientos del diseño experimental $2^2$ con punto central	50

<b>Tabla 25.</b> Producción máxima de biomasa y glicerol para los distintos tratamientos del diseño experimental $2^2$ con punto central	50
<b>Tabla 26.</b> Análisis de varianza para el tiempo de duplicación del diseño factorial $2^2$ con punto central	51
<b>Tabla 27.</b> Análisis de varianza para el rendimiento producto-sustrato del diseño factorial $2^2$ con punto central	53
<b>Tabla 28.</b> Análisis de varianza para la producción de xilitol del diseño factorial $2^2$ con punto central	54
<b>Tabla 29.</b> Resultados promedio del diseño experimental $2^2$ para distintos parámetros comparados mediante la prueba estadística Tukey-Kramer.	56
<b>Tabla 30.</b> Composición del hidrolizado de semilla de tamarindo para fermentaciones preliminares	75
<b>Tabla 31.</b> Comparación de medias por la prueba t de Student para los parámetros en la hora 48 de las fermentaciones preliminares	78
<b>Tabla 32.</b> Factores de retención de cromatografía de capa fina en estándares	83
<b>Tabla 33.</b> Factores de retención identificados en las muestras de hidrolizado de semilla de tamarindo	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura del xiloglucano propuesta por Fry <i>et al.</i> (1993)	3
<b>Figura 2.</b> Estructura química del xilitol	4
<b>Figura 3.</b> Producción química del xilitol	6
<b>Figura 4.</b> Mecanismos utilizados por las levaduras para la absorción de xilosa	8
<b>Figura 5.</b> Metabolismo de la glucosa y xilosa en levaduras productoras de xilitol	9
<b>Figura 6.</b> Estrategia experimental	16
<b>Figura 7.</b> Crecimiento celular de los tratamientos del diseño experimental 3 <sup>2</sup>	27
<b>Figura 8.</b> Consumo de glucosa y producción de etanol para los tratamientos del diseño 3 <sup>2</sup>	30
<b>Figura 9.</b> Consumo de xilosa y producción de xilitol en los tratamientos del diseño 3 <sup>2</sup>	32
<b>Figura 10.</b> Efectos principales de los factores sobre el tiempo de duplicación (diseño experimental 3 <sup>2</sup> )	36
<b>Figura 11.</b> Efecto de interacción de factores para el tiempo de duplicación (diseño experimental 3 <sup>2</sup> )	36
<b>Figura 12.</b> Efectos principales de los factores sobre el rendimiento producto-sustrato (diseño experimental 3 <sup>2</sup> )	38
<b>Figura 13.</b> Efecto de interacción de factores para el rendimiento producto-sustrato (diseño experimental 3 <sup>2</sup> )	38
<b>Figura 14.</b> Efectos principales de los factores sobre la producción de xilitol (diseño experimental 3 <sup>2</sup> )	40
<b>Figura 15.</b> Efecto de interacción de factores para la producción de xilitol (diseño experimental 3 <sup>2</sup> )	40
<b>Figura 16.</b> Contornos de la superficie de respuesta estimada para $Y_{p/s}$ en el diseño 3 <sup>2</sup>	42
<b>Figura 17.</b> Crecimiento celular para los tratamientos del diseño 2 <sup>2</sup> con punto central	43
<b>Figura 18.</b> Oxígeno disuelto y pH a través del tiempo para un tratamiento del diseño experimental 2 <sup>2</sup> con punto central: agitación de 100 rpm y aireación de 0.1 vvm	45
<b>Figura 19.</b> Consumo de glucosa en los tratamientos del diseño 2 <sup>2</sup> con punto central	46
<b>Figura 20.</b> Producción de etanol en los tratamientos del diseño 2 <sup>2</sup> con punto central	47
<b>Figura 21.</b> Consumo de xilosa en los tratamientos del diseño 2 <sup>2</sup> con punto central	48
<b>Figura 22.</b> Producción de xilitol en los tratamientos del diseño 2 <sup>2</sup> con punto central	49
<b>Figura 23.</b> Efectos principales de los factores sobre el tiempo de duplicación (diseño experimental 2 <sup>2</sup> )	52
<b>Figura 24.</b> Efecto de interacción de factores para el tiempo de duplicación (diseño experimental 2 <sup>2</sup> )	52

<b>Figura 25.</b> Efectos principales de los factores sobre el rendimiento producto-sustrato (diseño experimental 2 <sup>2</sup> )	53
<b>Figura 26.</b> Efecto de interacción de factores para el rendimiento producto-sustrato (diseño experimental 2 <sup>2</sup> )	54
<b>Figura 27.</b> Efectos principales de los factores sobre la producción de xilitol (diseño experimental 2 <sup>2</sup> )	55
<b>Figura 28.</b> Efecto de interacción de factores para la producción de xilitol (diseño experimental 2 <sup>2</sup> )	55
<b>Figura 29.</b> Consumo de xilosa, y producción de xilitol, con <i>D. hansenii</i>	76
<b>Figura 30.</b> Crecimiento celular (a), producción de biomasa (b) y comportamiento del pH (c) durante la fermentación de <i>C. guilliermondii</i>	77
<b>Figura 31.</b> Consumo de xilosa, y producción de xilitol, con <i>C. guilliermondii</i>	78
<b>Figura 32.</b> Consumo de glucosa durante las fermentaciones preliminares en el medio hidrolizado de semilla de tamarindo	79
<b>Figura 33.</b> Crecimiento celular (a), producción de biomasa (b) y comportamiento del pH (c) durante la fermentación de <i>C. magnoliae</i>	80
<b>Figura 34.</b> Consumo de xilosa, y producción de xilitol, con <i>C. magnoliae</i>	81
<b>Figura 35.</b> Cromatografía de capa fina	83

## 1. INTRODUCCIÓN

El xilitol es un carbohidrato natural clasificado químicamente como un alcohol azúcar. Se conoce desde hace más de 90 años y ha sido utilizado como endulzante para diabéticos en diversos países de Europa y Asia, debido a que tiene la misma intensidad de dulzura que la sacarosa, pero un valor calórico inferior. Es un compuesto de gran importancia comercial, especialmente para la industria farmacéutica y alimentaria (El-Siddig *et al.*, 2006).

Actualmente, el xilitol se obtiene por hidrogenación catalítica a altas presiones y altas temperaturas a partir de xilosa pura, o xilosa extraída mediante un proceso hidrolítico utilizando mazorca de maíz. Debido a que es un proceso que ocupa múltiples operaciones unitarias de purificación y condiciones extremas en su etapa principal, el producto final tiene un precio muy elevado (Granström, 2002).

El xilitol puede producirse por fermentación con el uso de microorganismos, principalmente levaduras, como es el caso de *C. magnoliae*, que utilizan la xilosa como fuente de carbono para su metabolismo. Es un proceso altamente específico y económico, donde se han reportado rendimientos hasta del 80 % de transformación de xilosa a xilitol (Vanegas *et al.*, 2004).

Las levaduras productoras de xilitol son capaces de aprovechar la xilosa presente en algunos residuos orgánicos, compuestos principalmente por hemicelulosas. Esta ventaja presenta un especial interés económico, ya que son materias primas de bajo costo y alta disponibilidad, por ser desechos agroindustriales.

Por otro lado, Michoacán es uno de los principales estados productores de tamarindo a nivel nacional (Silva y Lucatero, 2006). El fruto es usado en la elaboración de diversos productos, como concentrados para agua, salsas, saborizantes, aderezos y, en mayor medida, dulces (Fundación Michoacán Produce, 2008). Sólo el 40 % del peso total del fruto (pulpa) es utilizado para la elaboración de los productos mencionados, mientras que el 60 % restante (semilla y otros) es desechado.

Por tanto, la semilla de tamarindo, una materia prima con un elevado contenido de azúcares fermentables, puede ser aprovechada para la obtención de productos de interés, como el xilitol. La síntesis de este compuesto por fermentación utilizando levaduras productoras se ve afectada por diversos factores, mismos que deben ser estudiados, con el fin de alcanzar una alta productividad.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 TAMARINDO

El tamarindo (*Tamarindus indica* L.) es un árbol tropical, originario de África, pero que se ha extendido ampliamente en América, especialmente en nuestro país. El árbol, alcanza una altura que va de 10 a 20 metros, y cuya fruta es una vaina alargada color canela, rellena de una pulpa, la cual contiene las semillas (Parrota, 1990).

Dentro de cada vaina se encuentran aproximadamente de 6 a 12 semillas, redondas o de forma romboide y lustres, duras, de color rojo a café violeta; se encuentran alineadas a lo largo de la vaina, con una membrana protectora. Las semillas forman aproximadamente del 30 al 40 % de la fruta (Rao y Mathew, 2001).

En México, los principales Estados productores de tamarindo son Colima (9866 Ton/año), Guerrero (8283 Ton/año), Jalisco (4954 Ton/año) y Michoacán (3179.3 Ton/año), datos reportados en 2004 por SAGARPA y tomados de Silva y Lucatero (2006).

#### 2.1.1 COMPOSICIÓN DE LA SEMILLA DE TAMARINDO

La composición de la semilla de tamarindo varía ampliamente dependiendo de la variedad y el grado de madurez. La semilla está compuesta de la testa (20–30 %) y el grano o endospermo (70–80 %) (Kaur *et al.*, 2006). La composición promedio de la semilla entera, del grano sin testa y de la testa se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1. Composición de la semilla de tamarindo**

Constituyente	Porcentaje (%)		
	Semilla entera	Grano de la semilla (sin testa)	Testa
Humedad	9.4-11.3	11.4-22.7	11.0
Proteína	13.3-26.9	15.0-20.9	-
Grasa/Aceite	4.5-16.2	3.9-16.2	-
Fibra cruda	7.4-8.8	2.5-8.2	21.6
Carbohidratos	50.0-57.0	65.1-72.2	-
Cenizas totales	1.6-4.2	2.4-4.2	7.4
Extracto libre de nitrógeno	59.0	-	-
Azúcares totales	11.3-25.3	-	-
Azúcares reductores	7.4	-	-
Taninos	-	-	20.2

Tomado y modificado de El-Siddig *et al.*, (2006)

El xiloglucano de la semilla de tamarindo, es un heteropolisacárido ramificado que tiene cadenas de D-glucan con enlaces  $\beta$ -(1→4) parcialmente sustituido en las posiciones 0-6

de los residuos D-glucopiranosil con  $\alpha$ -D-xilopiranososa o con 2-O- $\beta$ -D-galactopiranosil  $\alpha$ -D-xilopiranososa (Kumar y Bhattacharya, 2008). De acuerdo con Kaur *et al.* (2006), se trata del principal polisacárido presente en el polvo del grano (60 %) y está compuesto de D-glucosa, D-xilosa, D-galactosa y L-arabinosa en una proporción 8:4:2:1, respectivamente. Fry *et al.* (1993) reportaron que casi el 75% de la cadena principal de glucosa se encuentra enlazada a una unidad de xilosa (Figura 1).

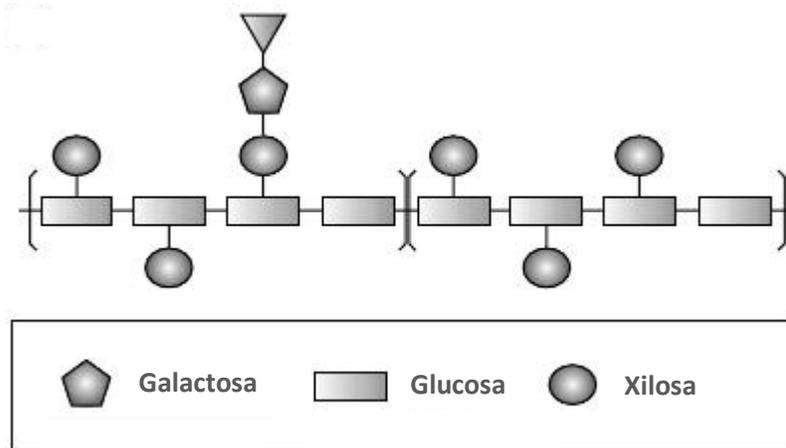


Figura 1. Estructura del xiloglucano propuesta por Fry *et al.* (1993)

En 1994, Sone y Sato determinaron la composición de los principales oligosacáridos generados de la digestión del xiloglucano por celulasas. El estudio determinó que los oligosacáridos con mayor presencia fueron heptasacáridos, octasacáridos y nanosacáridos. La composición del heptasacárido correspondería a una proporción 4: 3 de glucosa: xilosa; el octasacárido tendría una composición 4: 1: 3 de glucosa: galactosa: xilosa; por su parte, el nanosacárido estaría conformado en una proporción 4: 2: 3 por glucosa: galactosa: xilosa.

### 2.1.2 USOS PRINCIPALES DE LA SEMILLA DE TAMARINDO

El polisacárido purificado de la semilla de tamarindo puede ser utilizado como un agente espesante o gelificante en la elaboración de alimentos, de papel, fibras textiles, etc. Además, las excelentes características gelificantes y adhesivas de las semillas en polvo sin testa tienen varias aplicaciones en la industria farmacéutica. Por otro lado, se usa frecuentemente como alimento para ganado y cerdos (El-Siddig *et al.*, 2006; Kumar y Bhattacharya, 2008).

## 2.2 XILITOL

Desde el punto de vista químico, el xilitol se clasifica como un polialcohol formado por una cadena de cinco carbonos o alcohol pentahídrico (Figura 2). Tiene un peso molecular de 152.15 g/mol (Diz *et al.*, 2002).

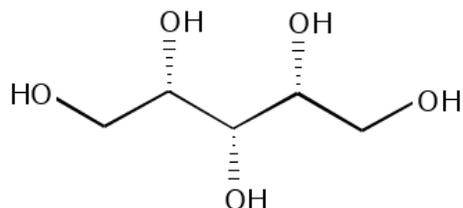


Figura 2. Estructura química del xilitol

### 2.2.1 PROPIEDADES QUÍMICAS Y FISIOLÓGICAS

El xilitol es de apariencia y dulzura similares a la sacarosa, ya que ambos poseen una capacidad edulcorante de 1.0 (Tabla 2), pero aporta un 40 % menos de calorías (2.4 kcal/g); además, es apto como endulzante de alimentos para diabéticos, ya que su metabolismo no está regulado por la insulina (Arrizon *et al.*, 2011).

Tabla 2. Poder edulcorante de algunos carbohidratos

Edulcorante	Poder edulcorante
Lactosa	0.25
Galactosa	0.3
Sorbitol	0.50 - 0.60
Manitol	0.50 - 0.60
Glucosa	0.7
Sacarosa	1
Xilitol	1
Fructosa	1.10 - 1.30

El xilitol es muy estable en la fabricación de alimentos, no fermenta y no produce pardeamiento de Maillard (Silva y Roberto, 2001). Tiene baja viscosidad, alta solubilidad (169 g/100 g a 20°C), baja actividad de agua, lo que le da una alta estabilidad microbiológica, térmica y química. El xilitol posee un elevado poder refrescante respecto a otros azúcares, lo que ha generado una alta demanda por la industria alimenticia, principalmente para productos como dulces y gomas de mascar (Ahmed, 2001).

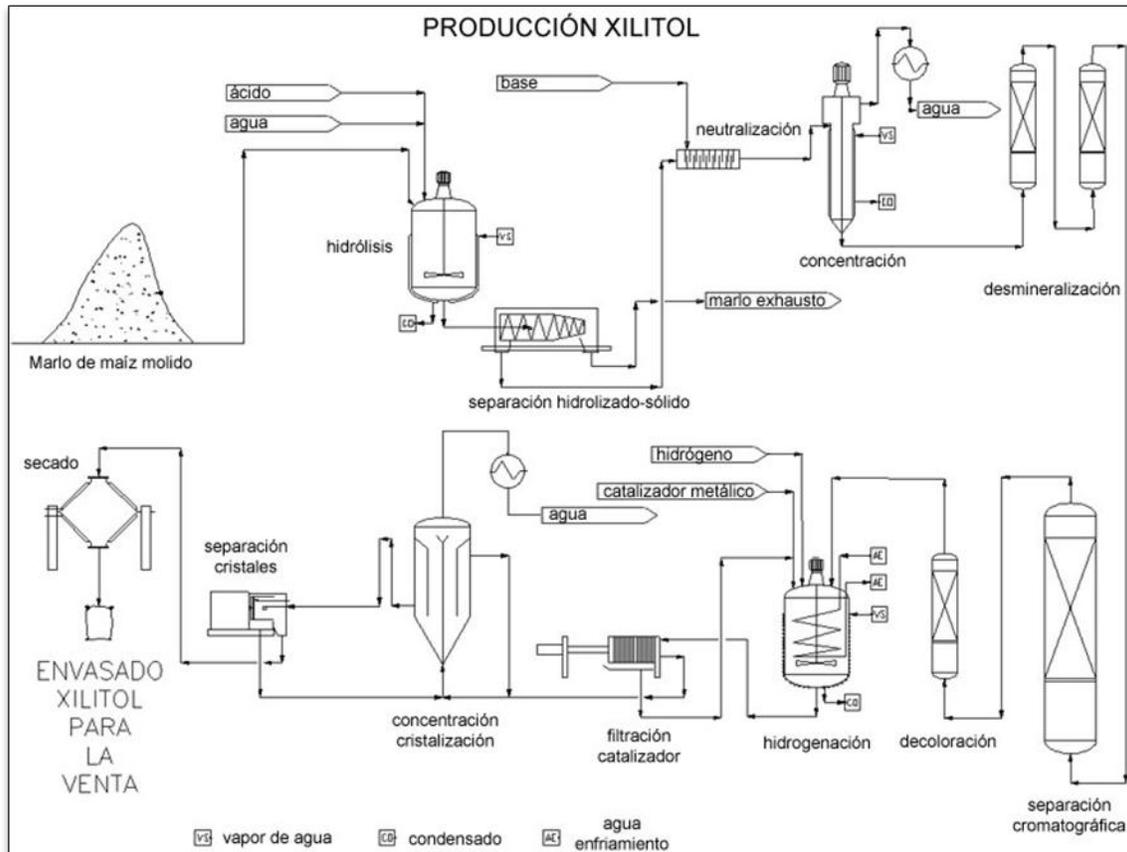
El xilitol mantiene efectos benéficos cuando es usado como edulcorante solo o mezclado con otros azúcares. Por ejemplo, en productos como jaleas o mermeladas actúa como un agente conservador, evitando la contaminación por hongos, bacterias o levaduras, ya que genera una alta presión osmótica, incluso a bajas temperaturas (Mushtaq *et al.*, 2010).

Además, este polialcohol tiene ventajas sobre la salud, ya que se ha demostrado ser un endulzante anticariogénico, que no puede ser utilizado y fermentado por las bacterias de la cavidad oral (Bahador *et al.*, 2012). Además, debido a esta propiedad, se ha propuesto el uso del xilitol para el tratamiento de padecimientos como la otitis media aguda (Faustino *et al.*, 2009). Por estas razones, el xilitol es particularmente atractivo para ser utilizado en vitaminas y gomas de mascar, tabletas, jarabes para la tos, enjuagues bucales, pastas de dientes, etc. (Ahmed, 2001).

### 2.2.2 PRODUCCIÓN DEL XILITOL

En la naturaleza, el xilitol se encuentra en varias frutas y verduras, tales como bayas, hojas de maíz, avena, lechuga, coliflor y champiñones. Además, se puede extraer de la madera de abedul, frambuesas, ciruelas, fibra de maíz, etc. El contenido de xilitol en frutas y verduras es por lo general bajo, por lo que la extracción de este a nivel industrial no resulta en un aprovechamiento económico (Xi *et al.*, 2010).

El xilitol, a escala industrial, es obtenido a partir de xilosa comercial por hidrogenación catalítica a altas presiones y temperaturas. En un proceso similar, la mazorca de maíz molido, un residuo hemicelulósico, es sometido a un proceso hidrolítico con el fin de liberar la xilosa, para después ser sujeta a la operación de hidrogenación (Larosa, 2002). Después de rigurosas operaciones de purificación, la xilosa extraída de la mazorca de maíz se somete a hidrogenación catalítica con níquel, a temperaturas que superan los 110°C y presión de 30 bar (Granström, 2002) (Figura 3). El proceso final de producción de xilitol, incluye muchas etapas de purificación, lo que al final se traduce en altos costos y bajos rendimientos de producto final.



**Figura 3. Producción química del xilitol.** La mazorca de maíz es sometida a hidrólisis ácida y térmica. Después de eliminar la fase sólida, el medio hidrolizado (fase líquida) es neutralizado, concentrado y desmineralizado. La xilosa del medio hidrolizado es separada por cromatografía y nuevamente purificada por decoloración. La operación principal del proceso es la hidrogenación catalítica, donde se sintetiza el xilitol en un reactor a alta presión y temperatura, el cual es obtenido y purificado por una serie de etapas de cristalización. Tomado de Larosa (2002)

Actualmente existen en México varias empresas que lo producen por este sistema, como lo son Comercial Ferbera, Sehyex, Comercializadora de la Industria Alimentaria, Austro-Corp, Química Alkano y Estraton México. No se encuentra especificado el precio de venta para dichas compañías. Debido a sus importantes propiedades sobre la salud, el xilitol se ha ganado una significativa demanda en el mercado correspondiente a un valor global de \$340 millones de dólares al año, con un precio de 4 a 5 dólares por kilogramo (Kadam *et al.*, 2008; Prakasham *et al.*, 2009).

Como proceso alternativo, el xilitol también puede ser producido por fermentación por medio de bacterias, mohos y levaduras. La fermentación es un proceso específico, económico y que genera altos rendimientos, mismos que pueden ser optimizados mejorando las condiciones de fermentación o modificando el microorganismo por ingeniería genética (Granström, 2002; Vanegas *et al.*, 2004).

La producción biotecnológica de xilitol presenta un especial interés económico, académico y científico cuando se obtiene a partir de materias primas de bajo costo y alta disponibilidad. Se han realizado estudios para la obtención de xilitol, a partir de residuos con altos contenidos en xilosa, por mencionar algunos: paja de arroz (Roberto *et al.*, 1999), eucalipto y de paja de trigo (Martínez *et al.*, 2002), caña de azúcar (Santos *et al.*, 2003), mazorca de maíz (El-Batal y Khalaf, 2004), marlo de maíz adicionado con xilosa (Latina *et al.*, 2006) y salvado de arroz (Herazo *et al.*, 2009).

Todos los anteriores son materiales con alto contenido de hemicelulosa, polisacárido compuesto por unidades de hexosas y pentosas, entre las que se encuentra la glucosa, galactosa, xilosa y arabinosa. Por tanto, son una buena fuente de sustrato para un proceso fermentativo. A partir de la revisión bibliográfica, se encontró que no ha sido reportado el uso de la semilla de tamarindo como materia prima para la obtención de xilitol.

De los estudios llevados a cabo con distintas fuentes de sustrato, mencionados anteriormente, el rendimiento más alto obtenido a partir de un residuo hemicelulósico, fue obtenido por Roberto *et al.* (1999), que utilizó como fuente de sustrato hidrolizado de paja de arroz, con un rendimiento de 0.73 g de xilitol/g de xilosa, usando *Candida guilliermondii*.

### 2.3 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE XILITOL

Dentro de las especies microbianas, las levaduras no-convencionales (aquellas que no pertenecen al género de *Saccharomyces* sp.) son reconocidas como las mejores productoras de xilitol (Vanegas *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2006). Se ha reportado el estudio de una amplia variedad de estas levaduras (Tabla 3), entre las que destacan las del género *Pichia* sp., *Candida* sp. y *Debaryomyces* sp. (Ghindea *et al.*, 2010); las cuales incorporan la xilosa a su metabolismo mediante la vía de pentosas fosfato, además de que pueden crecer en xilosa como única fuente de carbono y energía.

**Tabla 3. Especies comúnmente usadas en la síntesis de xilitol**

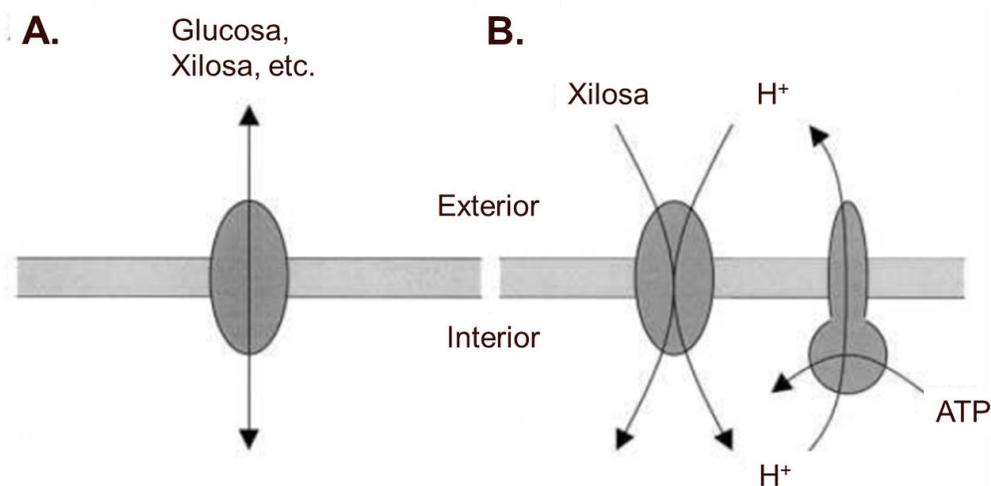
Bacterias		Levaduras	
<i>Enterobacter liqifaciens</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Hansenula polymorpha</i>
<i>Corynebacterium</i> sp.	<i>Pichia stipitis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Trichosporon</i> sp.
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	<i>Pichia farinosa</i>	<i>Candida boidinii</i>	<i>Rhodotorula</i> sp.
<i>Escherichia coli</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Cryptococcus</i> sp.
	<i>Pachysolen tannophilus</i>	<i>Candida magnoliae</i>	<i>Kluyveromyces</i> sp.

Tomado y modificado de Ghindea *et al.*, (2010)

### 2.3.1 METABOLISMO DE LA XILOSA EN LEVADURAS NO-CONVENCIONALES

El primer paso metabólico en la fermentación de la xilosa, corresponde a la absorción de la xilosa hacia el citoplasma de la levadura, la cual puede convertirse en una etapa limitante en el proceso de fermentación (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2001). La xilosa es introducida a la célula a través de los transportadores de glucosa, que corresponden a permeasas ubicadas en la membrana celular que transportan azúcares por difusión facilitada (Boris *et al.*, 2003) (Figura 4A). Debido a la alta afinidad de estos transportadores por la glucosa, la presencia de este azúcar retarda severamente la absorción de xilosa, cuando estos dos azúcares están presentes en el mismo medio (Meinander *et al.*, 1999).

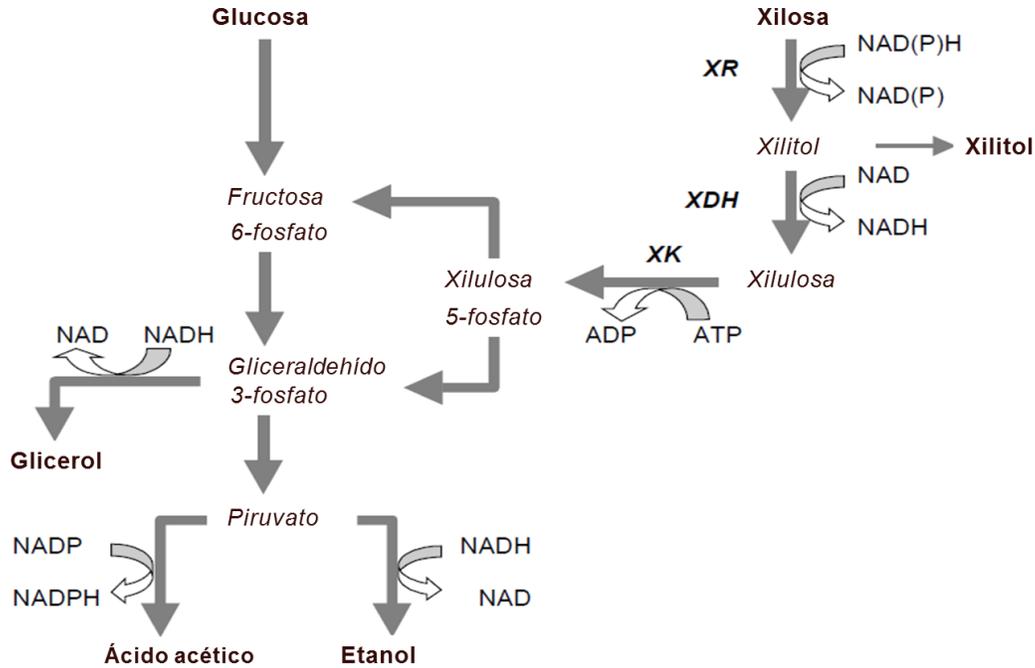
Las levaduras no convencionales que utilizan la xilosa como fuente de carbón, poseen además un sistema alternativo para la absorción de dicho azúcar, donde un simportador de xilosa permite el paso de ésta a través de la membrana por difusión facilitada debida a la fuerza motriz generada por una protón-ATPasa (Weusthuis *et al.*, 1994) (Figura 4B).



**Figura 4. Mecanismos utilizados por las levaduras para la absorción de xilosa:** A. Difusión facilitada impulsada por el gradiente de concentración entre el medio extracelular y el citosol; B. Sistema protón-xilosa impulsada por la fuerza motriz del transporte de protón, mantenido por una protón-ATPasa. Tomado de Weusthuis *et al.* (1994)

Una vez en el citoplasma, la xilosa es introducida al metabolismo de la levadura a partir de tres reacciones, como se muestra en la Figura 5. La xilosa se incorporará al

metabolismo para la generación de energía de la levadura, con la subsecuente producción de glicerol, ácido acético o etanol.



**Figura 5. Metabolismo de la glucosa y xilosa en levaduras productoras de xilitol.** La xilosa es reducida a xilitol a partir de la D-xilosa reductasa (XR) usando como cofactor NADH o NADPH. Dependiendo de las condiciones ambientales, el xilitol es expulsado de la célula u oxidado a xilulosa a partir de la xilitol deshidrogenasa (XDH) en presencia de  $\text{NAD}^+$ . La xilulosa es fosforilada por la xilulokinasa con consumo de ATP, para incorporarse a la vía de las pentosas fosfato y, posteriormente, a la glucólisis. Tomado de Granström (2002)

Las tres principales enzimas involucradas en la vía del metabolismo de la xilosa en levaduras son la D-xilosa reductasa (XR), la xilitol deshidrogenasa (XDH) y la xilulokinasa (XK) (Figura 5). La producción de xilitol es consecuencia de una acumulación de NADH intracelular bajo una limitación de oxígeno.

El suministro de oxígeno afecta la tasa de producción de xilitol, así como su rendimiento; además, determina la división en el flujo de carbono (xilosa) que es determinante para el crecimiento o la formación de xilitol (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2001). Concentraciones excesivas de oxígeno conducen a la oxidación del NADH en  $\text{NAD}^+$ , y un alto ratio  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  conlleva a la oxidación de xilitol a xilulosa, dando como resultado menor producción de xilitol. Bajo dichas condiciones, se promueve la activación de la cadena de respiración, necesaria para la formación de ATP, necesario en la fosforilación de la xilulosa (Deok-Kun *et al.*, 1997).

Bajo condiciones limitadas de oxígeno, el sistema de transferencia de electrones es incapaz de reoxidar todo el NADH generado, habiendo un incremento de este y un decremento en la oxidación de xilitol a xilulosa y, consecuentemente, la acumulación de éste (Does y Bisson, 1989; Skoog y Hahn-Hägerdal, 1990; Deok-Kun *et al.*, 1997).

La producción de etanol por fermentación de la xilosa presente en el medio, depende directamente de la generación de xilitol y de los factores antes mencionados. En tal caso, son necesarias condiciones de mínima aireación para la producción de xilulosa-5-P, el cual genera gliceraldehído 3-P o fructosa 6-P, incorporándose a la glucólisis, para su conversión a piruvato y posterior formación de etanol por fermentación (Vargas y Pereira, 2010)

Además de las condiciones de oxígeno en el medio, la inhibición de la enzima XDH se puede deber a otros factores, tales como: el tamaño del inóculo, la concentración de sustrato, la composición del medio, temperatura y pH (Srivani y Pydi, 2011). El xilitol producido es expulsado al medio extracelular por difusión facilitada (Granström, 2002).

## 2.4 ANTECEDENTES

### 2.4.1 OBTENCIÓN DE XILITOL POR CONVERSIÓN BIOTECNOLÓGICA

El parámetro que mejor representa la productividad de la levadura en determinada fuente de xilosa es el rendimiento de xilitol obtenido ( $Y_{p/s}$ ), y resultan un buen punto de comparación entre los diferentes estudios realizados. Se han utilizado diferentes fuentes de xilosa para el estudio de su conversión a xilitol por medio de fermentación. Entre estas fuentes, se destacan diferentes residuos lignocelulósicos, con alto contenido de xilanos, tal como la paja de arroz, madera de eucalipto, bagazo de caña, entre otros, como se muestra en la Tabla 4.

Las levaduras más estudiadas para la producción de xilitol a partir de medios ricos en xilosa, son del género *Candida* sp., donde destaca *C. guilliermondii* por su alta productividad en medios preparados a partir de la hidrólisis de un residuo orgánico, por ejemplo bagazo de caña o residuo de la malta de la cebada (Tabla 4). Otra levadura de este género, *C. magnoliae*, ha sido poco estudiada, pero se postula como buena productora de xilitol al tener buenos resultados por fermentación en medios hidrolizados de mazorca de maíz (Kiyoshi *et al.*, 2004).

**Tabla 4. Estudios sobre la producción de xilitol por conversión biotecnológica**

Levadura	Fuente de sustrato	Y <sub>p/s</sub> (g/g)	Tipo de reactor	Referencia
<i>Candida guilliermondii</i>	Xilosa	0.78	Biorreactor de lote alimentado	Ojamo <i>et al.</i> , 1994
<i>Candida boidinii</i>	Xilosa	0.47	Matraz (V: 50 mL)	Vandeska <i>et al.</i> , 1995
<i>Candida guilliermondii</i>	Hidrolizado hemicelulósico de paja de arroz	0.73	Reactor de tanque agitado (V: 0.55 L)	Roberto <i>et al.</i> , 1999
<i>Candida parapsilosis</i>	Xilosa-Glucosa	0.63	Biorreactor (V: de 4 a 16 L)	Furlan y de Castro, 2001
<i>Candida guilliermondii</i>	Hidrolizado hemicelulósico de paja de arroz	0.55	Matraz (V: 50 mL)	Silva y Roberto, 2001
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Madera de eucalipto	0.57	Matraz (V: 100 mL)	Diz <i>et al.</i> , 2002
<i>Candida guilliermondii</i>	Bagazo de caña	0.63	Matraz (V: 50 mL)	Martínez <i>et al.</i> , 2002
	Paja de arroz	0.52		
	Eucalipto	0.43		
	Paja de trigo	0.32		
<i>Candida guilliermondii</i>	Hidrolizado de bagazo de caña de azúcar	0.54	Reactor de lecho fluidizado (V: 1.6 L)	Santos <i>et al.</i> , 2003
<i>Candida tropicalis</i>	Hidrolizado hemicelulósico de mazorca de maíz	0.44	Matraz (V:50 mL)	El-Batal y Khalaf, 2004
<i>Candida magnoliae</i>	Hidrolizado hemicelulósico de mazorca de maíz	0.75	Matraz (V:100 mL)	Kiyoshi <i>et al.</i> , 2004
<i>Candida boidinii</i>	Xilosa	0.45	Biorreactor <i>Batch</i> (V: 0.7 L)	Winkelhausen <i>et al.</i> , 2004
<i>Candida guilliermondii</i>	Hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña	0.75	Biorreactor (V: 15 L)	Acosta <i>et al.</i> , 2005
<i>Candida guilliermondii</i>	Residuo de la malta de cebada	0.70	Matraz (V: 100 mL)	Solange e Inês, 2005
<i>Candida guilliermondii</i>	Marlo de maíz adicionado con xilosa	0.50	Matraz	Latina <i>et al.</i> , 2006
<i>Candida guilliermondii</i>	Hidrolizado de bagazo de caña de azúcar	0.55	Matraz (V: 43 mL). Células inmovilizadas	Carvalho <i>et al.</i> , 2007
<i>Candida guilliermondii</i>	Hidrolizado de bagazo de caña de azúcar	0.59	Biorreactor (V: 1.6 L)	Virgínio <i>et al.</i> , 2007
<i>Candida magnoliae</i>	Xilosa	0.57	Matraz (V: 250 mL)	Wannawilai <i>et al.</i> , 2007
		0.39	Biorreactor <i>Batch</i> (V: 1 L)	
<i>Candida guilliermondii</i>	Hidrolizado de cascarilla de arroz	0.57	Matraz (V: 45 mL)	Villalba <i>et al.</i> , 2009

El creciente interés en procesos fermentativos empleando residuos lignocelulósicos es completamente justificable, debido a que estos materiales son baratos, renovables y fuentes ricas de azúcares. Además, su uso industrial contribuye a la reducción de la contaminación causada por ser considerados materiales de desecho (Silva y Roberto, 2001).

Como se mencionó con anterioridad, de los estudios revisados acerca de la obtención de xilitol por vía fermentativa, no se encuentran reportes del uso de semilla de tamarindo con este fin. La hidrólisis de este desecho orgánico, resulta ser una opción para la generación de sustratos fermentables como se describe a continuación.

## 2.4.2 HIDRÓLISIS DE LA SEMILLA DE TAMARINDO

En un estudio previo, González-Hernández *et al.* (2012) definieron las condiciones de hidrólisis que generan una mayor concentración de azúcares fermentables a partir de la semilla de tamarindo. La finalidad de la hidrólisis es la de liberar los azúcares presentes en el xiloglucano, donde el azúcar de mayor interés para este estudio es la xilosa. La hidrólisis fue llevada a cabo utilizando ácidos fuertes y elevadas temperaturas.

Se utilizó un diseño Box-Wilson donde se variaron tres factores: temperatura, concentración de ácido (se probó tanto ácido nítrico, como ácido sulfúrico) y tiempo de exposición al calor. En cada factor se usaron tres niveles: se usaron temperaturas de 90, 105 y 120°C; concentraciones de ácidos al 1, 2 y 3 % v/v y; tiempo de exposición al calor de 10, 20 y 40 minutos en autoclave a una presión de 15 kgf/cm<sup>2</sup>. Se establecieron en total 8 experimentos factoriales, 6 experimentos axiales y 1 punto central, es decir, 15 tratamientos (datos no mostrados).

La semilla de tamarindo recibió un tratamiento previo al diseño experimental. Las semillas se molieron en un molino para granos y se tamizaron en malla 60 Mesh, a fin de obtener un tamaño de partícula máximo de 0.125 mm de diámetro.

La cuantificación de los azúcares reductores liberados se determinó por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), y la concentración de xilosa por ensayo enzimático.

Hubo una menor liberación de xilosa en los tratamientos realizados con ácido sulfúrico, donde aquellas condiciones que lograron mayor liberación de azúcares, alcanzaron aproximadamente 17 g/L de xilosa (datos no mostrados). Por otro lado, los tratamientos y las condiciones a las que hubo una mayor liberación de azúcares reductores, y de xilosa, utilizando ácido nítrico, se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5. Tratamientos con la mayor liberación de azúcares reductores y xilosa**

Trat.	Temperatura (°C)	Concentración de ácido (% v/v)	Tiempo de exposición (min)	Azúcares reductores (g/L)	Xilosa (g/L)
7	120	3	20	93.3	39.24 <sup>A</sup>
8	120	3	40	100.41	33.47 <sup>B</sup>
10	130.2	2	30	112.2	43.02 <sup>A</sup>

Los valores seguidos por la misma letra, no difieren significativamente para prueba de Tukey-Kramer a un nivel de significancia  $\alpha=0.05$ . Los tratamientos se realizaron por duplicado. Datos tomados de González-Hernández *et al.*, (2012).

En los tratamientos 7 y 10 se alcanzó la mayor concentración de xilosa (Tabla 5), y estos no difieren significativamente de acuerdo a la prueba de Tukey-Kramer. Por tanto, para este estudio se seleccionaron las condiciones del tratamiento 7, es decir, una temperatura de 120°C, una concentración de ácido nítrico de 3 % v/v, y un tiempo de exposición de 20 minutos.

La concentración de xilosa en el hidrolizado de semilla de tamarindo utilizando ácido nítrico, con las condiciones antes mencionadas, es mayor a los datos obtenidos por Martínez *et al.* (2002), para otras materias primas como eucalipto (24.32 g/L), bagazo de caña (22.71 g/L) y paja de arroz (18.33 g/L). La semilla de tamarindo, por tanto, se considera una buena fuente de dicho azúcar para la producción de xilitol por vía fermentativa.

Sin embargo, la producción de xilitol por fermentación de hidrolizados hemicelulósicos, se ve obstaculizada por compuestos tóxicos resultantes de las condiciones a las cuales se llevan a cabo los tratamientos de hidrólisis. Estos pueden ser: ácido acético, derivados fenólicos, furfural e hidroximetilfurfural (Modig, 2001; Fernández *et al.*, 2007).

De estos compuestos tóxicos, el ácido acético es el menos agresivo, donde cantidades pequeñas de este al inicio de la fermentación no causa inhibición en la producción de xilitol (Silva *et al.*, 2004). Altos niveles de este ácido conllevan la acidificación del citoplasma de la levadura, con un agotamiento del ATP intracelular debido al desvío de esta molécula a las ATPasas de la membrana celular, que bombean H<sup>+</sup> al exterior para regular el pH intracelular (Almeida *et al.*, 2007).

Los furanos se originan a partir de las reacciones de Maillard de las pentosas y hexosas durante la hidrólisis ácida, y son el principal grupo inhibidor en los medios hidrolizados; el furfural resulta de la deshidratación de las pentosas, mientras el hidroximetilfurfural de las hexosas (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000). Aunque no se conoce el mecanismo preciso por el cual los furfurales inhiben el metabolismo de las

levaduras, se ha sugerido que estos compuestos inhiben las enzimas centrales de la glucólisis, como la hexoquinasa y fosfofructoquinasa, o enzimas acopladas al ciclo del ácido cítrico o la producción de etanol, como la alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa (Almeida *et al.*, 2007). Además, se ha reportado que las levaduras utilizan y transforman furfurales en alcohol furfúrico y ácido furoico bajo condiciones anaeróbicas (Tahezadeh *et al.*, 2000).

Estos compuestos deben ser considerados en la práctica, debido a los problemas que pueden ocasionar en la producción de xilitol.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El xilitol es un edulcorante alternativo con características similares a la sacarosa que ha despertado gran interés debido a su uso seguro en pacientes diabéticos, debido a su menor aporte calórico. Además, incita el fluido salival aumentando la concentración de iones calcio, estimulando la remineralización de los dientes, por lo que se prevé su uso en el tratamiento de las caries.

Su síntesis química es costosa y con una gran cantidad de etapas de purificación, que representa bajos rendimientos, mientras que el uso de un proceso fermentativo resulta una alternativa viable de producción por ser un método específico, seguro, sustentable y económico.

Por otra parte, la semilla de tamarindo se convierte en un desecho cuando este fruto es procesado en la industria alimenticia. Este desecho, se puede convertir en una fuente rica de azúcares, entre los que destacan la glucosa y xilosa, convirtiéndose en un residuo aprovechable para la producción de xilitol, mediante la fermentación de dichos azúcares por *C. magnoliae*.

Debido a ello, es importante conocer el efecto de los factores que afectan la producción de xilitol utilizando una levadura poco estudiada en esta área de investigación biotecnológica, a partir de semilla de tamarindo residual, de la cual no existen reportes de su uso para este fin.

## 4. HIPÓTESIS

La concentración de sustrato, agitación y aireación, durante la fermentación de medios hidrolizados de semilla de tamarindo con *C. magnoliae* ITMLB03, afecta la producción de xilitol.

## 5. OBJETIVOS

### **Objetivo general:**

Determinar el efecto de la concentración de sustrato, agitación y aireación sobre la producción de xilitol por fermentación de medios hidrolizados de semilla de tamarindo utilizando *C. magnoliae* ITMLB03.

### **Objetivos específicos:**

- Caracterizar bromatológicamente la semilla de tamarindo y su hidrolizado como sustrato para la obtención de xilitol.
- Determinar el efecto de la agitación y concentración inicial de sustrato a nivel matraz sobre la obtención de xilitol por fermentación de medios hidrolizados de semilla de tamarindo.
- Analizar mediante un diseño de experimentos el efecto de la agitación y aireación a nivel biorreactor sobre la producción fermentativa de xilitol, etanol y glicerol.

## 6. METODOLOGÍA

A continuación se presenta la metodología propuesta en un diagrama de flujo (Figura 6), y posteriormente se explica cada etapa del diagrama.

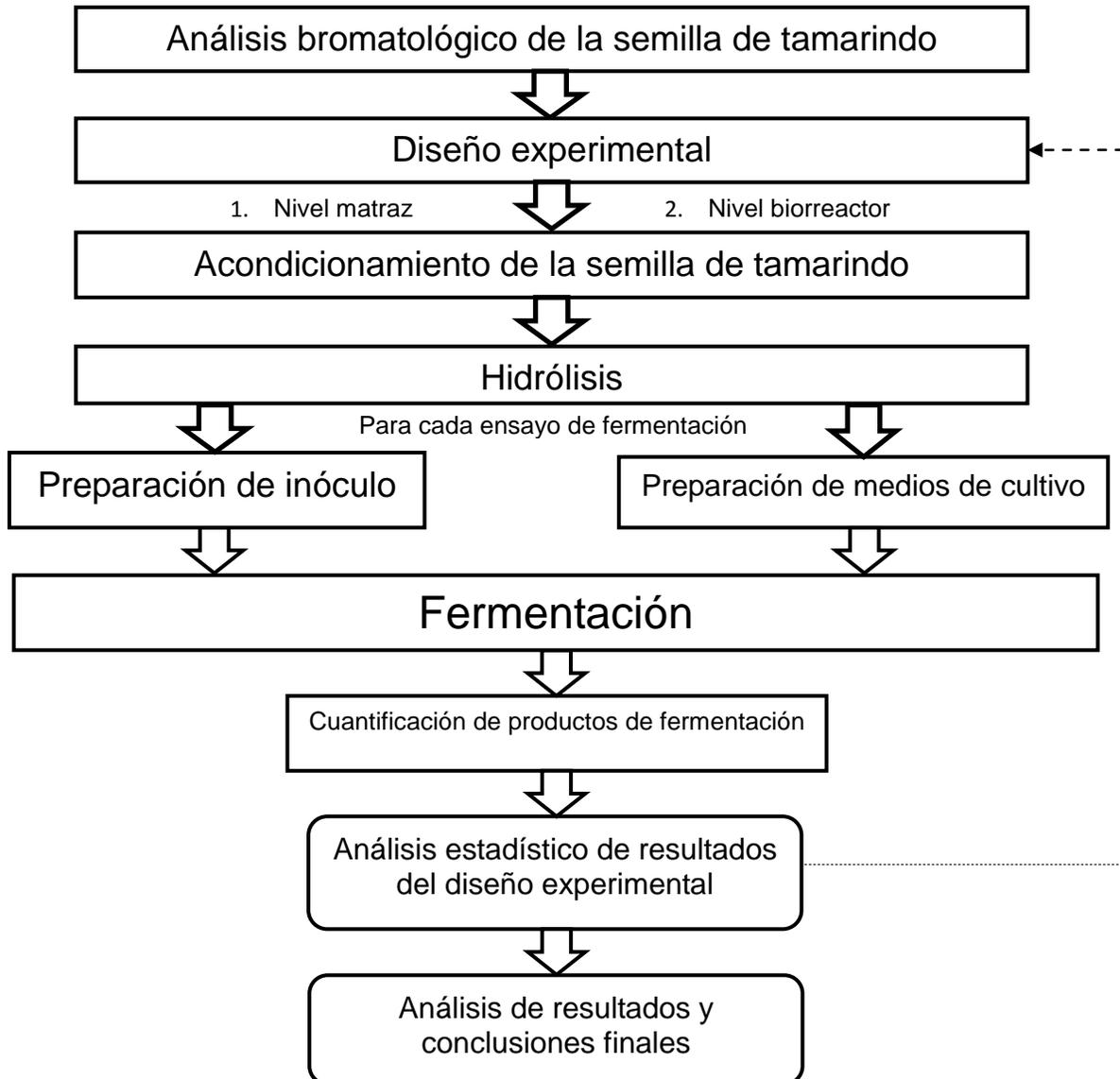


Figura 6. Estrategia experimental

## 6.1 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LA SEMILLA DE TAMARINDO

La semilla de tamarindo con testa y sin testa fue molida y tamizada en malla 60, para alcanzar un tamaño de partícula máxima de 0.125 mm de diámetro, similar a la utilizada durante el proceso de hidrólisis. Los análisis bromatológicos de estas muestras fueron realizados en el Laboratorio de Alimentos del Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Tacámbaro, Michoacán. Los métodos utilizados para dichos análisis se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6. Métodos utilizados en los análisis bromatológicos para la semilla de tamarindo**

Parámetros	Metodología
Humedad %	NMX-F-479-1985. Determinación de Humedad por Tratamiento Térmico.
Proteína %	NMX-F-068-S-1980. Determinación de Proteínas. Método Kjeldahl.
Grasas %	NMX-F-089-s-1978. Determinación de Extracto Etéreo. Método Soxhlet.
Fibra Cruda %	NMX-F-090-s-1978. Determinación de Fibra Cruda en Alimentos.
Cenizas%	NMX-F-066-s-1978. Determinación de Cenizas
Carbohidratos %	Matemática %CTBH: $100 - (H + E.E. + PC + C + FC)$ . Valorado por la A.O.A.C. (Asociación Científica dedicada a la excelencia en Métodos Analíticos)

La fracción de carbohidratos no digeribles se expresa mejor como fibra dietética. El análisis para determinar fibra dietética (fibra soluble e insoluble) utilizado fue el método enzimático de Prosky.

## 6.2 DISEÑO EXPERIMENTAL A NIVEL MATRAZ

Ghindea *et al.* (2010) reportan que la temperatura óptima para la obtención de xilitol en levaduras productoras es de 30° C, donde pequeñas variaciones no afectan los rendimientos de xilitol; así mismo, el pH inicial óptimo establecido se encuentra entre 5.5 y 6.0.

Por lo tanto, se propuso que el diseño experimental a nivel matraz se enfocara en dos factores que afectan significativamente la producción de xilitol, la agitación y la concentración inicial de sustrato.

Se utilizó un diseño factorial  $3^2$ , es decir, de dos factores con tres niveles cada uno. Este diseño, ofrece la ventaja de conocer si existe un efecto lineal, o no lineal (curvatura), de los factores propuestos.

Está comprobado que la producción de xilitol se realiza bajo condiciones semi-anaerobias (Granström, 2002). Por tanto, se utilizó un nivel bajo de agitación que pudiera proveer de dichas condiciones, esta fue a 120 rpm, y un nivel alto de agitación que pudiera proveer de condiciones aeróbicas (240 rpm). El punto medio a comparar fue de 180 rpm.

La concentración de sustrato fue obtenida a partir de la cuantificación de azúcares reductores después de la hidrólisis de la semilla de tamarindo. De acuerdo con estos ensayos, el medio hidrolizado de semilla de tamarindo (con pH corregido a 5.5) tiene una concentración aproximada de 80 g/L de azúcares reductores. Por tanto, se propuso un nivel alto de dicha concentración, un nivel bajo de 20 g/L, y un punto intermedio de 50 g/L, para la concentración al inicio de la fermentación. La concentración de sustratos como glucosa y xilosa está en función de la concentración de azúcares reductores, y fue determinada para cada una de estas.

Los niveles codificados para cada factor, y el diseño factorial, se muestran en las Tabla 7 y 8, respectivamente. Cada tratamiento se realizó por duplicado (n=2).

**Tabla 7. Valores codificados para cada factor evaluado con el diseño experimental 3<sup>2</sup>**

Factor	Valor (rpm)	Valor codificado	Factor	Valor (g/L)	Valor codificado
Agitación (A)	120	-1	Concentración inicial (B)	20	-1
	180	0		50	0
	240	1		80	1

**Tabla 8. Tratamientos del diseño factorial 3<sup>2</sup>**

Tratamiento	A	B
1	-1	-1
2	0	-1
3	1	-1
4	-1	0
5	0	0
6	1	0
7	-1	1
8	0	1
9	1	1

### 6.3 ACONDICIONAMIENTO DE LA SEMILLA DE TAMARINDO

La semilla de tamarindo fue proporcionada por “Productos Gondi S. A. de C. V.” localizada en la ciudad de Morelia, Michoacán. Se retiraron las impurezas de la semilla mediante un lavado. La eliminación de la testa se realizó por choque térmico. La semilla sin testa fue molida y tamizada hasta malla 60 para obtener un tamaño de partícula máximo de 0.125 mm de diámetro.

### 6.4 HIDRÓLISIS

Las condiciones de hidrólisis fueron aquellas determinadas en los antecedentes experimentales. Se disolvieron 7.5 g de polvo de semilla de tamarindo en 50 mL de solución al 3 % v/v de HNO<sub>3</sub>, y se sometieron a tratamiento térmico en autoclave (120° C, 15 kg/cm<sup>2</sup>, 20 min). El medio hidrolizado se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min, y fue filtrado para la eliminación de sólidos generados durante la hidrólisis.

### 6.5 CARACTERIZACIÓN DEL MEDIO HIDROLIZADO DE SEMILLA DE TAMARINDO

Con el fin de conocer la composición del medio hidrolizado de semilla de tamarindo, se cuantificaron los azúcares de interés fermentables, como glucosa y xilosa, así como compuestos tóxicos para la levadura, furfurales, producto de las condiciones a las que se realizó la hidrólisis de la semilla.

La cantidad de glucosa se determinó utilizando el ensayo enzimático de la glucosa oxidasa-peroxidasa, en presencia de orto-dianisidina, la cual es reducida durante las reacciones químicas, resultando en un cambio de color, teniendo el máximo pico de absorción a 440 nm. La cuantificación de xilosa se realizó por ensayo enzimático de la xilosa mutarotasa-xilosa deshidrogenasa, reacciones donde la xilosa es oxidada a ácido glucónico con la formación de NADH, el cual tiene un pico de absorción a 340 nm, y es proporcional a la cantidad de xilosa presente en el medio.

La determinación de furfurales se realizó mediante la metodología propuesta por Martínez *et al.* (2000). El furfural e hidroximetilfurfural tienen un pico de absorción conjunto en el espectro UV a 284 nm. Algunos otros compuestos presentes en medios hidrolizados de residuos orgánicos absorben en la misma región, pero mantienen un codo de absorción a 320 nm. Mediante la sustracción de ambas absorbancias y por

comparación con una curva patrón, se midió la presencia de estos compuestos en el medio hidrolizado de semilla de tamarindo.

La identificación de otros azúcares presentes en el medio hidrolizado de semilla de tamarindo se realizó por cromatografía de capa fina (ANEXO 11.2)

## 6.6 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Consiste en el acondicionamiento del medio hidrolizado de semilla de tamarindo. El pH fue ajustado a 6.0 con una solución de TRIZMA BASE (2-amino-2-hidroximetil propano-1, 3-diol) 2M. La concentración de azúcares iniciales se obtuvo por diluciones del hidrolizado con agua destilada, a la concentración indicada en cada tratamiento de acuerdo al diseño experimental a nivel matraz. Como fuente de nitrógeno para las levaduras se adicionó fosfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$  en una proporción de 1 g/L. El volumen inicial de cada matraz de fermentación fue de 100 mL, en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Los matraces se esterilizaron en autoclave a 121° C, durante 15 min.

## 6.7 LEVADURA

La levadura productora de xilitol elegida para este estudio (ver ANEXO 11.1), *C. magnoliae* ITMLB03, se mantuvo almacenada en cajas de Petri con medio mixto YPD-hidrolizado de semilla de tamarindo (10 g/L de glucosa, 10 g/L de azúcares de hidrolizado de semilla de tamarindo, 10 g/L de bactopectona, 10 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de agar) bajo refrigeración a 4 °C y resiembra cada 3 semanas.

## 6.8 PREPARACIÓN DE INÓCULO

Se prepararon matraces de 50 mL con medio de hidrolizado de semilla de tamarindo a la misma concentración de sustrato a la cual se llevó a cabo cada ensayo de fermentación, de acuerdo al diseño experimental. Se transfirieron cinco asadas de las levaduras de las cajas de Petri a dicho medio, y se incubaron durante 24 h, a 28° C y 200 rpm.

## 6.9 FERMENTACIÓN

La carga microbiana del inóculo fue determinada mediante cuenta viable en cámara de Neubauer. Se inoculó el volumen necesario para tener una concentración inicial de  $3 \times 10^6$  células/mL en el medio de fermentación. Los matraces se incubaron en agitador rotatorio

a las condiciones establecidas por el diseño experimental, manteniéndose constante la temperatura (30 °C) y a un pH inicial aproximado a 6, el cual no fue controlado durante los ensayos. Se tomó muestra de los matraces cada 4 h, para conocer el comportamiento de las siguientes variables:

- Crecimiento celular: Mediante cuenta viable en cámara de Neubauer. Por tinción con azul de metileno, se diferenciaron las células vivas y muertas. El conteo se realizó en microscopio.
- Consumo de azúcares reductores: Se midió mediante la técnica de óxido-reducción del DNS. Los azúcares tienen la capacidad de reducir el ácido 3,5 dinitrosalicílico, ocasionando un cambio de color, que puede ser medido en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 540 nm.
- pH: Se determinó con un potenciómetro.
- Consumo de glucosa: Medido por kit enzimático (glucosidasa y peroxidasa) para cuantificación de glucosa.
- Consumo de xilosa: Medido por kit enzimático (xilosa deshidrogenasa) para cuantificación de xilosa.

## 6.10 CUANTIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN

Los productos de fermentación esperados fueron xilitol, etanol y glicerol. Estos se cuantificaron por ensayo enzimático (Megazyme®).

El xilitol se cuantificó con ayuda de las enzimas sorbitol deshidrogenasa y diaforasa, en presencia de  $\text{NAD}^+$  y cloruro de idonitrotetrazolium (INT), el cual se reduce a INT-formazan al finalizar las reacciones, teniendo una capacidad de absorción a 492 nm y siendo proporcional a la cantidad de xilitol en el medio.

La cuantificación de etanol requirió de dos reacciones enzimáticas, catalizadas por la alcohol deshidrogenasa y la aldehído deshidrogenasa, donde se produce NADH a partir de  $\text{NAD}^+$ , el cual es medido por incremento en la absorción a 340 nm y permite medir la presencia de etanol generado.

Finalmente, el glicerol fue medido por el ensayo enzimático con gliceroquinasa y lactato deshidrogenasa.

## 6.11 ANÁLISIS DE RESULTADOS

El análisis de resultados se realizó en el software JMP 6.0 y STATGRAPHICS Centurion XV.

## 6.12 DISEÑO EXPERIMENTAL A NIVEL BIORREACTOR

Para el diseño experimental a nivel biorreactor se evaluó el efecto, así como la probable interacción de dos factores que tienen un alto impacto en la producción de xilitol por fermentación: agitación y aireación. Para lograr dicho objetivo se utilizó un diseño experimental factorial  $2^2$  con un punto central.

En base a los resultados del diseño experimental a nivel matraz, y que son reportados en los siguientes apartados, se estableció un nivel bajo de agitación de 100 rpm, y un nivel alto de 200 rpm.

Por su parte, y de acuerdo al estudio realizado por Winkelhausen *et al.* (2004), se utilizó un nivel bajo y alto de aireación de 0.1 y 1 vvm, respectivamente (oxígeno suministrado como aire a flujos de gas controlado con un rotámetro).

Los niveles codificados para cada factor, y los tratamientos resultantes del diseño experimental (incluyendo el punto central), se muestran en las Tablas 9 y 10, respectivamente. Cada tratamiento se realizó por duplicado (n=2).

**Tabla 9. Valores codificados para cada factor evaluado con el diseño experimental  $2^2$  con punto central**

Factor	Valor (rpm)	Valor codificado	Factor	Valor (vvm)	Valor codificado
Agitación (A)	100	-1	Aireación (B)	0.1	-1
	150	0		0.55	0
	200	1		1	1

**Tabla 10. Tratamientos del diseño factorial  $2^2$  con punto central**

Tratamiento	A	B
1	1	1
2	-1	1
3	1	-1
4	0	0
5	-1	-1

## 6.13 ENSAYOS DE FERMENTACIÓN EN BIORREACTOR

Los ensayos de fermentación en base a los diferentes tratamientos del diseño experimental a nivel biorreactor se realizaron a una temperatura constante de 30 °C, un pH inicial aproximado a 6.3, el cual no fue controlado durante los ensayos, y una concentración inicial de sustrato de 50 g/L, este último determinado por el diseño experimental a nivel matraz, y analizado en los siguientes apartados. El biorreactor usado marca Applikon® tiene las características que se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11. Características del biorreactor utilizado en el diseño experimental**

Características del biorreactor	
Volumen del biorreactor (L)	3
Volumen de trabajo (L)	1.7
Diámetro del biorreactor (m)	0.13
Tipo de agitador	Rushton
Número de paletas del agitador	6
Diámetro del agitador (m)	0.045
Ancho de la paleta (m)	0.011
Longitud de la paleta (m)	0.011
Número de agitadores	2
Posición desde la base del 1er agitador (m)	0.04
Posición desde la base del 2do agitador (m)	0.125
Número de deflectores	3
Ancho de un deflector (m)	0.013
Tipo de distribuidor de aire	Tubo perforado
Número de orificios del distribuidor	7
Diámetro de orificios del distribuidor (m)	0.001

La preparación del medio de cultivo y del inóculo se realizó como se describe en el apartado 6.6 y 6.7, respectivamente. Se utilizó un volumen de medio de cultivo de 1.7 L. El biorreactor conteniendo el medio de cultivo se esterilizó para cada tratamiento del diseño experimental en autoclave a 121 °C, 1 atm, por 15 min. Así mismo, se esterizaron mangueras (para extracción de muestra y aireación) y material necesario para los ensayos de fermentación.

Se inoculó una concentración de  $3 \times 10^6$  cel/mL de *C. magnoliae* en condiciones anóxicas. El agitador, y los sensores de pH y oxígeno disuelto se desinfectaron con etanol y se conectaron al biocontrolador. Como se mencionó anteriormente, la temperatura se

mantuvo a constante a 30 °C, por baño maría con un Controlador de Temperatura Science®.

La aireación se controló con un Rotámetro Aalborg® conectado a un compresor. El flujo (en L/min) necesario para establecer los distintos niveles del factor aireación, y en base al volumen de medio de cultivo en el biorreactor, se muestran en la Tabla 12.

**Tabla 12. Flujo de aire en el rotámetro para cada nivel del diseño experimental 2<sup>2</sup> con punto central**

Nivel del factor aireación (vvm)	Valor codificado	Flujo de aire (L/min)
0.1	-1	0.17
0.55	0	0.935
1	1	1.7

El crecimiento celular, consumo de azúcares reductores, consumo de glucosa y xilosa, y la producción de xilitol, etanol y glicerol, se cuantificaron con las mismas técnicas descritas en los apartados 6.8 y 6.9 para las fermentaciones a nivel matraz.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LA SEMILLA DE TAMARINDO

Los resultados del análisis bromatológico, para semilla de tamarindo con testa y sin testa, se muestran en la Tabla 13.

**Tabla 13. Composición de la semilla de tamarindo con testa y sin testa**

Parámetros	Porcentaje (%)	
	Semilla con testa	Semilla sin testa
Humedad	5.7	6.1
Proteína	15.2	15.1
Grasas	3.7	4.6
Fibra Cruda	3	3
Cenizas	1.8	2.1
Fibra dietética	70.52	70.33
Fibra insoluble	52.89	17.64
Fibra soluble	17.63	52.69

El principal componente de la semilla de tamarindo utilizada en el presente estudio, como era de esperarse, fue la fracción de fibra dietética, que se esperaba estuviera conformada principalmente por el xiloglucano. La semilla con testa y sin testa tuvo un porcentaje similar de fibra dietética, donde la única diferencia radicó en la concentración de fibra insoluble y soluble.

### 7.2 DISEÑO EXPERIMENTAL NIVEL MATRAZ

Los medios de fermentación para los tratamientos del diseño experimental se prepararon a partir de un mismo lote de hidrolizado de semilla de tamarindo, para evitar diferencias significativas entre la composición de azúcares, glucosa y xilosa, para los distintos tratamientos.

La composición de los hidrolizados de semilla de tamarindo, en los niveles establecidos para el factor de concentración inicial de sustrato, se muestra en la Tabla 14.

**Tabla 14. Composición del medio hidrolizado de semilla de tamarindo a diferentes concentraciones iniciales de sustrato para el diseño experimental 3<sup>2</sup>**

Nivel	Concentración inicial de sustrato (g/L)	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Furfurales (g/L)
-1	20	15.580 ± 0.344	5.912 ± 0.473	0.052 ± 0.010
0	50	35.289 ± 0.750	11.621 ± 1.222	0.128 ± 0.008
1	80	49.271 ± 1.167	14.558 ± 1.585	0.225 ± 0.010

Los datos muestran el promedio ± desviación estándar para n=6

Los datos mostrados en la Tabla 14, por tanto, muestran la composición inicial aproximada de los medios de fermentación para los distintos niveles del factor de concentración inicial de sustrato.

A continuación se presentan los resultados generales de los tratamientos del diseño experimental y, posteriormente, el análisis estadístico de las principales variables de respuesta obtenidas con la levadura *C. magnoliae*.

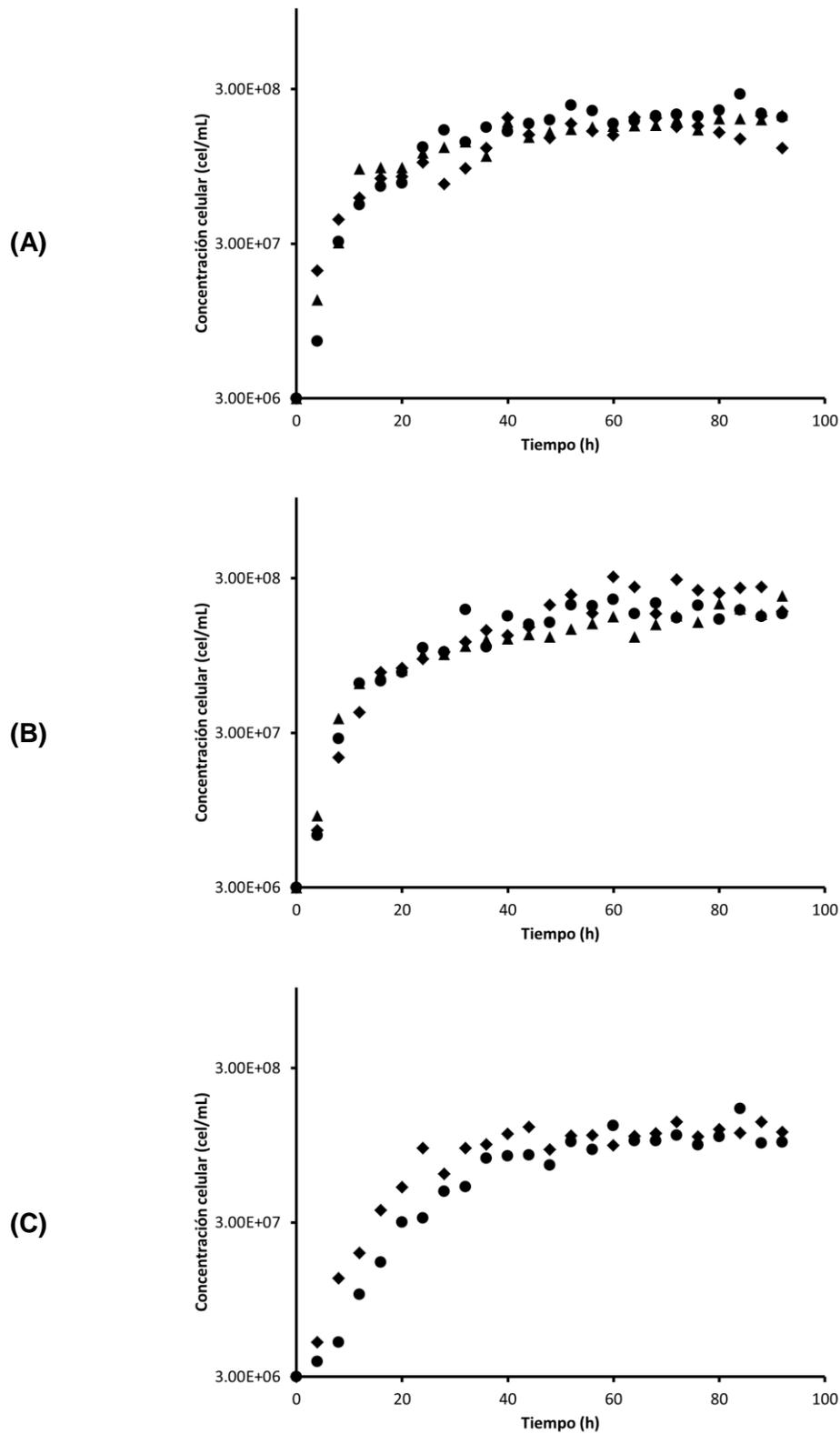
Es importante mencionar que no se muestran los datos resultantes de las variaciones de pH respecto al tiempo de ninguno de los tratamientos, ya que, partiendo de un pH inicial aproximado a 5.5, no existieron cambios significativos su valor. En algunos casos se observó una ligera acidificación del medio durante las primeras horas de fermentación.

### 7.2.1 CRECIMIENTO CELULAR

La levadura utilizada en el diseño experimental, *C. magnoliae*, logró adaptarse a la mayoría de las condiciones establecidas por los distintos tratamientos.

A un nivel bajo de concentración inicial de sustrato, 20 g/L, el crecimiento celular fue similar entre los distintos niveles de agitación, donde no se observaron gráficamente diferencias significativas (Figura 7A); además, la levadura alcanzó la fase estacionaria transcurridas 12 h de fermentación en estos tratamientos.

Una concentración inicial de sustrato de 50 g/L representa un caso similar, donde la única diferencia tiene que ver con el tratamiento a un nivel alto de agitación (240 rpm), terminando su fase exponencial a las 16 h de fermentación (Figura 7B). Las concentraciones celulares a través del tiempo para los tratamientos con concentración inicial de 20 g/L y 50 g/L, fueron semejantes, por lo que no se esperan diferencias significativas entre los parámetros calculados y mostrados en la Tabla 15.



**Figura 7. Crecimiento celular de los tratamientos del diseño experimental 3<sup>2</sup>.** Agitación de (▲) 120 rpm, (●) 180 rpm y (◆) 240 rpm, para distintas concentraciones iniciales de sustrato: (A) 20 g/L; (B) 50 g/L y; (C) 80 g/L. Datos representativos para n=2

El nivel alto de concentración inicial de sustrato (80 g/L) tuvo un impacto mayor sobre el crecimiento celular en comparación con los tratamientos realizados a un nivel bajo y medio de este factor. La fase exponencial duró un período de tiempo mayor para los niveles medio y alto para el factor agitación, comenzando la fase estacionaria transcurridas las 24 y 28 h de fermentación, respectivamente, como se puede observar en la Figura 7C.

El nivel bajo de agitación (120 rpm) a una concentración inicial de sustrato de 80 g/L provocó un efecto negativo sobre la levadura, la cual no mostró crecimiento en dicho tratamiento.

Los parámetros que definen la adaptación de la levadura a los distintos tratamientos se muestran en la Tabla 15. El tiempo de duplicación obtenido para cada tratamiento se comparará estadísticamente en los siguientes apartados.

**Tabla 15. Valores promedio de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), tiempo de duplicación ( $t_d$ ) y velocidad de división ( $\delta$ ) para el diseño experimental 3<sup>2</sup>**

Tratamiento	Concentración inicial de sustrato (g/L)	Agitación (rpm)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$t_d$ (h)	$\delta$ (h <sup>-1</sup> )
1	20	120	0.2846	2.4360	0.4105
2	50	120	0.2530	2.7394	0.3651
3	80	120	-	-	-
4	20	180	0.2401	2.8873	0.3464
5	50	180	0.2473	2.8039	0.3568
6	80	180	0.0987	7.0350	0.1423
7	20	240	0.2517	2.7546	0.3631
8	50	240	0.2001	3.4636	0.2887
9	80	240	0.1412	4.9101	0.2037

Valores representativos para n=2

## 7.2.2 CONSUMO DE GLUCOSA Y PRODUCCIÓN DE ETANOL

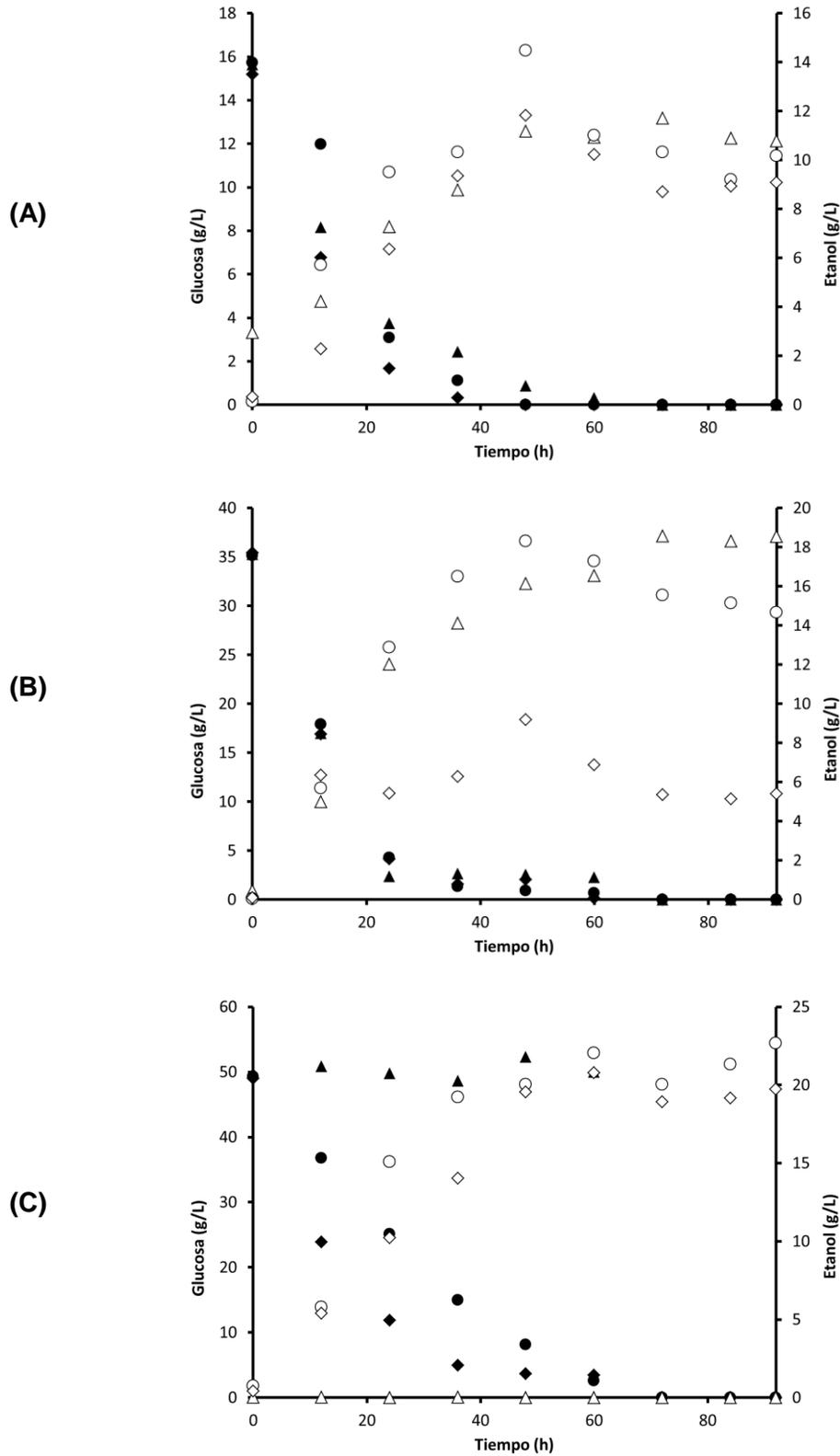
La producción de etanol no está asociada completamente al consumo de glucosa, ya que a partir de este azúcar se pueden producir otros compuestos, como glicerol o ácido acético; además, el etanol puede ser producido por el consumo de otros azúcares, como la xilosa. Sin embargo, la mayor producción de etanol se debe al consumo de la glucosa, y se analizan conjuntamente en este apartado.

La glucosa se agotó prácticamente en un 100% transcurridas 48 h de fermentación, cuando se utilizó un nivel bajo de concentración inicial de sustrato (20 g/L), independientemente de la variación entre los niveles de la agitación, como se observa en la Figura 8A. La diferencia entre cada valor de concentración de glucosa a través del tiempo, entre los distintos niveles de agitación, fue pequeña. Sin embargo, existieron variaciones en cuanto a la producción de etanol para este nivel de concentración inicial de sustrato: a un nivel bajo de agitación, se alcanzó una producción máxima de etanol aproximada de 12.09 g/L a las 72 h de fermentación; con una agitación de 180 rpm, se obtuvo una concentración máxima de etanol de 14.47 g/L transcurridas 48 h de fermentación; finalmente, a un nivel alto de agitación se logró obtener 11.91 g/L de etanol a las 48 h. De cualquier manera, la concentración de etanol fue similar al finalizar la fermentación, como se puede observar en el eje secundario Y de la Figura 8A.

El consumo de glucosa por *C. magnoliae* no fue distinto cuando se utilizaron diferentes niveles de agitación a un nivel medio de concentración inicial de sustrato (50 g/L), consumiéndose en totalmente a partir de las 60 h de fermentación (Figura 8B). A un nivel bajo de agitación (120 rpm), la mayor producción de etanol (19.11 g/L) se logró al final de la fermentación, e incluso fue el valor más alto alcanzado para este nivel de concentración inicial de sustrato. La mayor concentración de etanol generada para los niveles medio y alto de agitación, se dio a las 48 h de fermentación; sin embargo, la diferencia entre estos valores es amplia, siendo 18.30 g/L, cuando se utilizó agitación de 180 rpm, y de 9.18 g/L, a 240 rpm de agitación.

Como se mencionó en el apartado anterior, *C. magnoliae* no tuvo adaptación al medio cuando se utilizó un nivel alto de concentración de sustrato inicial (80 g/L), y un nivel bajo de agitación (120 rpm), traduciéndose en un consumo nulo de glucosa (Figura 8C). A pesar de que el consumo de glucosa fue más rápido a una agitación de 240 rpm durante las primeras horas, respecto a su consumo a 180 rpm, el azúcar se agotó en un 100 %, en ambos casos, después de 60 h de fermentación. La producción de etanol fue similar para estos tratamientos, con una producción máxima de 22.04 g/L, a 180 rpm, y de 20.91 g/L, a 240 rpm.

Las concentraciones máximas de etanol se analizan estadísticamente en los siguientes apartados.



**Figura 8. Consumo de glucosa y producción de etanol para los tratamientos del diseño 3<sup>2</sup>.** Agitación de (▲, △) 120 rpm, (●, ○) 180 rpm y (◆, ◇) 240 rpm, para distintas concentraciones iniciales de sustrato: (A) 20 g/L; (B) 50 g/L y; (C) 80 g/L. Datos representativos para n=2

### 7.2.3 CONSUMO DE XILOSA Y PRODUCCIÓN DE XILITOL

A un nivel bajo de concentración inicial de sustrato, 20 g/L, el consumo de xilosa entre los tratamientos a los distintos niveles de agitación, fue similar a través del tiempo, mostrando una tendencia lineal en la Figura 9A, y con un consumo aproximado del 90 % de la xilosa disponible, en todos los casos. La producción de xilitol fue la más afectada por la variación de la agitación, a esta concentración inicial de sustrato. A una agitación menor, de 120 rpm, la producción de xilitol se benefició, alcanzando la producción máxima entre estos tres tratamientos, de 1.57 g/L al finalizar la fermentación; por su parte, la generación del producto a 240 rpm fue la más perjudicada, logrando sólo un 0.81 g/L de xilitol. A un nivel intermedio de agitación, se alcanzó una concentración de xilitol de 1.15 g/L después de 92 h de fermentación.

El consumo total de xilosa por *C. magnoliae*, solo tuvo una pequeña disminución cuando se varió la concentración inicial de sustrato a un valor intermedio (50 g/L), con un consumo del 88 % aproximado para todos los tratamientos en este nivel; el consumo de xilosa fue similar entre los distintos niveles de agitación para esta concentración de sustrato, donde no se observan fluctuaciones significativas (Figura 9B). La producción máxima de xilitol para estos tres tratamientos se tuvo al finalizar la fermentación. Para este nivel de concentración inicial de sustrato también se observó el efecto ocasionado por la variación en los niveles de la agitación. A una agitación de 120 rpm, nuevamente se favoreció la producción de xilitol, alcanzando una concentración final de 4.36 g/L; caso contrario a un nivel alto de agitación, donde la concentración de producto se ve seriamente afectada, obteniendo 1.74 g/L de xilitol. A un nivel intermedio de agitación, de 180 rpm, se obtuvo una producción máxima de xilitol de 3.62 g/L a las 92 h de fermentación.

Los tratamientos a un nivel alto de concentración inicial de sustrato (80 g/L) fueron los que tuvieron un menor consumo de xilosa; los niveles intermedio y alto de agitación tuvieron un consumo de aproximadamente el 72 % de la xilosa disponible en el medio de fermentación (Figura 9C). Para este caso, no se observó un efecto significativo debido a los niveles intermedio y alto de agitación; al final de la fermentación se obtuvieron concentraciones de xilitol de 4.35 g/L y 4.44 g/L, respectivamente, siendo los valores más altos alcanzados entre todos los tratamientos (junto con el tratamiento a 50 g/L y 120 rpm).

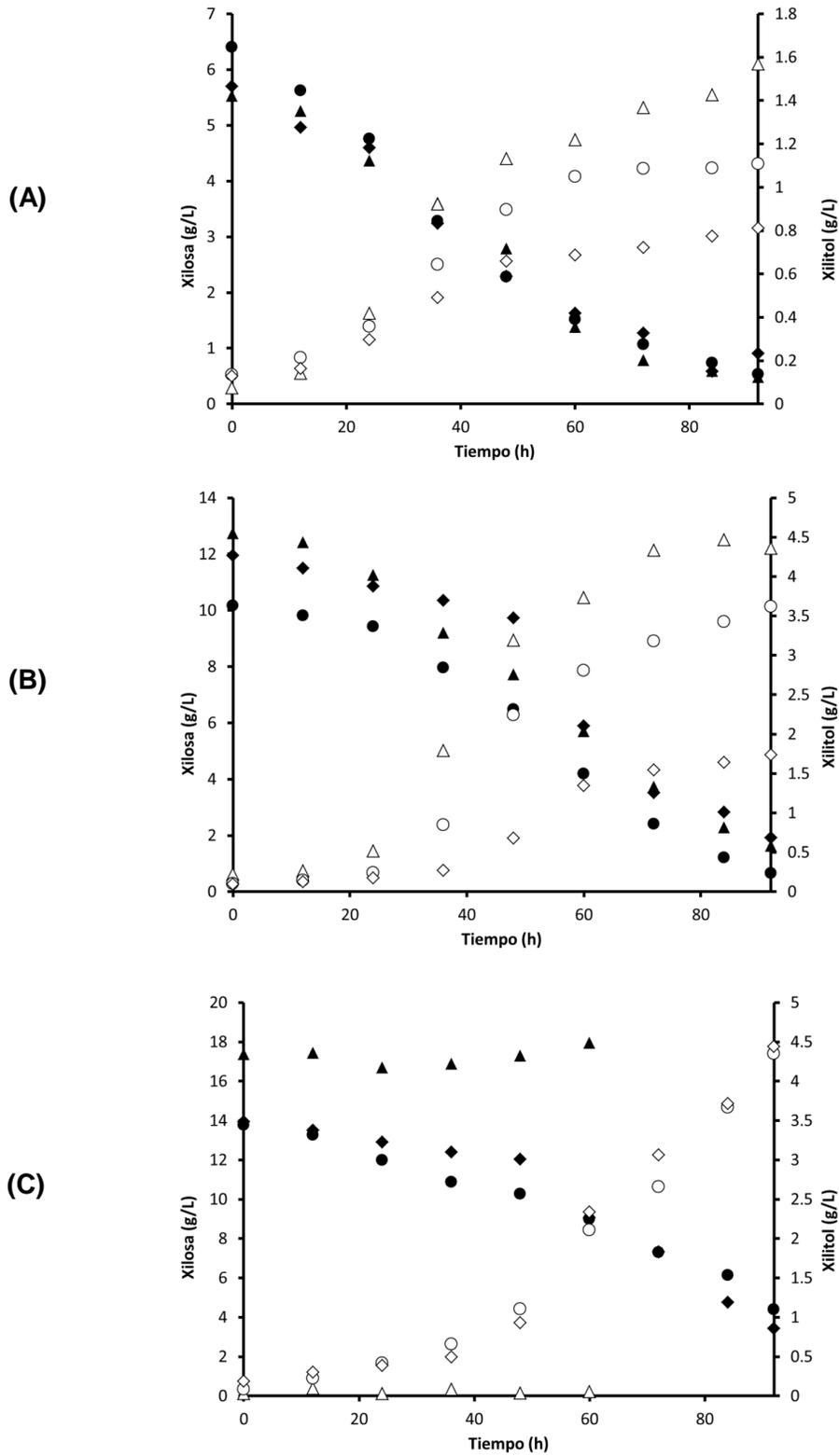


Figura 9. Consumo de xilosa y producción de xilitol en los tratamientos del diseño 3<sup>2</sup>. Agitación de (▲, △) 120 rpm, (●, ○) 180 rpm y (◆, ◇) 240 rpm, para distintas concentraciones iniciales de sustrato: (A) 20 g/L; (B) 50 g/L y; (C) 80 g/L. Datos representativos para n=2

El tratamiento con una concentración inicial de 80 g/L y una agitación de 120 rpm mostró una inhibición total del crecimiento de *C. magnoliae*, al no existir consumo de xilosa y, por tanto, la producción nula de xilitol, como se puede observar en la Figura 9C.

De acuerdo con los datos obtenidos de consumo de xilosa y producción de xilitol, se calculó el rendimiento producto-sustrato ( $Y_{p/s}$ ) (Tabla 16), que será analizado estadísticamente más adelante. Dicho parámetro permite determinar la capacidad productiva de *C. magnoliae*.

**Tabla 16. Rendimiento producto-sustrato ( $Y_{p/s}$ ) promedio para los distintos tratamientos del diseño experimental 3<sup>2</sup>**

Tratamiento	Concentración inicial de sustrato (g/L)	Agitación (rpm)	$Y_{p/s}$ (g de xilitol/g de xilosa)
1	20	120	0.4121
2	50	120	0.6354
3	80	120	0.0552
4	20	180	0.2183
5	50	180	0.6098
6	80	180	0.4445
7	20	240	0.2036
8	50	240	0.3043
9	80	240	0.5043

Datos representativos para n=2

#### 7.2.4 PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y GLICEROL

En la Tabla 17, se muestran los resultados de producción de biomasa y glicerol para los diferentes tratamientos del diseño experimental.

Los valores de biomasa presentados en la Tabla 17, representan la concentración máxima alcanzada al final de la fermentación. Estos valores son muy similares entre sí, destacando el tratamiento 8, donde se alcanzó una mayor concentración de biomasa, de 4.75 g/L, y que se comprobará más adelante con el análisis estadístico. La concentración de biomasa para el tratamiento 3 es nula, debido a que no hubo crecimiento de la levadura bajo dichas condiciones.

También se reportan los valores máximos alcanzados en concentración de glicerol, al final de la fermentación. Los valores más altos corresponden a los tratamientos 8 y 9; se determinará si existió diferencia significativa en producción de glicerol respecto a los demás mediante el análisis estadístico.

**Tabla 17. Producción máxima de biomasa y glicerol para los distintos tratamientos del diseño experimental 3<sup>2</sup>**

Tratamiento	Concentración inicial de sustrato (g/L)	Agitación (rpm)	Biomasa (g/L)	Glicerol (g/L)
1	20	120	3.15	1.468
2	50	120	3.05	1.793
3	80	120	0.05	0.000
4	20	180	3.05	1.584
5	50	180	3.3	1.669
6	80	180	2.9	1.690
7	20	240	2.5	1.846
8	50	240	4.75	2.863
9	80	240	3.05	2.384

Datos representativos para n=2

## 7.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DISEÑO EXPERIMENTAL A NIVEL MATRAZ

A continuación, se muestra el análisis estadístico las variables de respuesta que se consideraron más importantes en el propósito del presente estudio, estas son: tiempo de duplicación ( $t_d$ ), rendimiento producto-sustrato ( $Y_{p/s}$ ) y producción de xilitol, para los tratamientos correspondientes al diseño experimental 3<sup>2</sup> para. Además, en el análisis comparativo con la prueba Tukey-Kramer de los resultados promedio de cada tratamiento, se incluye la producción de etanol, glicerol y biomasa.

El análisis de varianza factorial 3<sup>2</sup> permite determinar el efecto de cada factor principal, de tipo lineal y cuadrático, así como la interacción entre dichos factores. Las hipótesis nulas a comprobar, por tanto, se presentan a continuación:

- $H_o : \gamma_i = 0$  (no hay efecto significativo del factor A sobre la variable de respuesta).
- $H_o : \delta_j = 0$  (no hay efecto significativo del factor B sobre la variable de respuesta).
- $H_o : (\gamma\delta)_{ij} = 0$  (no hay efecto significativo de interacción de los factores A y B sobre la variable de respuesta).

### 7.2.5.1 TIEMPO DE DUPLICACIÓN ( $t_d$ )

El tiempo de duplicación es una variable que permite describir la adaptación de *C. magnoliae* a los diferentes tratamientos utilizados en el diseño experimental para los

efectos principales: concentración inicial de sustrato y agitación. Un menor tiempo de duplicación, indica un crecimiento más acelerado de la levadura, sugiriendo una mayor adaptación al medio de fermentación.

En la Tabla 18 se muestra en análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ , descompuesto a efectos con un grado de libertad, lo cual permite determinar si los efectos cuadráticos de los factores principales son significativos, así como de interacción entre estos.

**Tabla 18. Análisis de varianza descompuesto a efectos con un grado de libertad para el tiempo de duplicación del diseño experimental  $3^2$**

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Concentración inicial de sustrato	4.98482	1	4.98482	2.56	0.1379
B:Agitación	11.8125	1	11.8125	6.07	0.0315
AA	0.448587	1	0.448587	0.23	0.6406
AB	10.5407	1	10.5407	5.41	0.0401
BB	9.29996	1	9.29996	4.78	0.0514
Bloques	0.00963272	1	0.00963272	0	0.9452
Error total	21.4133	11	1.94666		
Total	58.5096	17			

Las hipótesis nulas se rechazan cuando el Valor-P es menor al nivel de significancia establecido ( $\alpha=0.05$ )

De acuerdo al análisis de varianza, el factor B (agitación) fue el que tuvo un mayor efecto sobre la variable de respuesta, siendo significativos tanto su componente lineal, como cuadrático. Esto se puede constatar en la Figura 10 donde, al aumentar la agitación, aumenta considerablemente el tiempo de duplicación hasta alcanzar un punto máximo, después del cual este se empieza a reducir. La curvatura en esta parte correspondería al componente cuadrático del efecto.

Por otro lado, el efecto del factor A (concentración inicial de sustrato) no es significativo, a pesar de que se observa un ligero efecto lineal en la Figura 10. La interacción de este factor con la agitación, si es significativo a un nivel de confianza del 95 % ya que se puede reconocer fácilmente en la Figura 11.

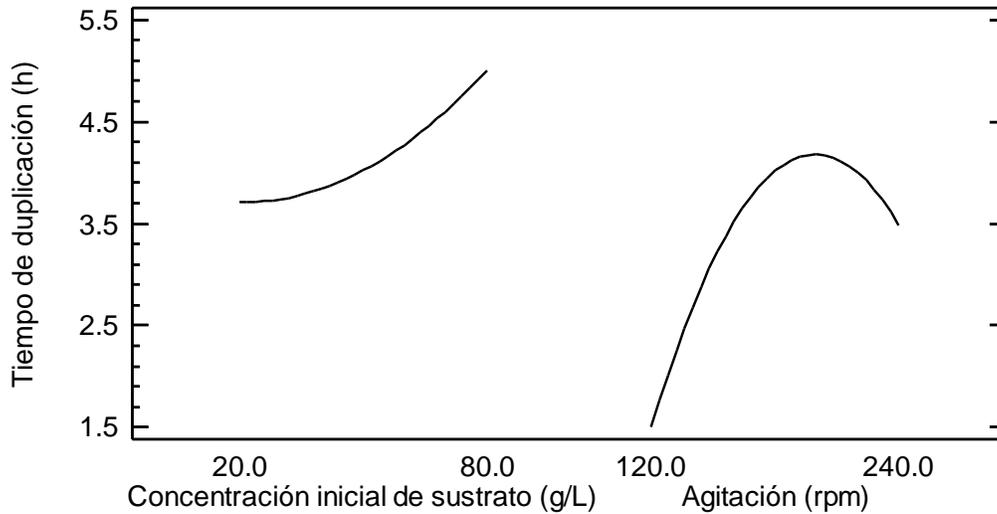


Figura 10. Efectos principales de los factores sobre el tiempo de duplicación (diseño experimental  $3^2$ )

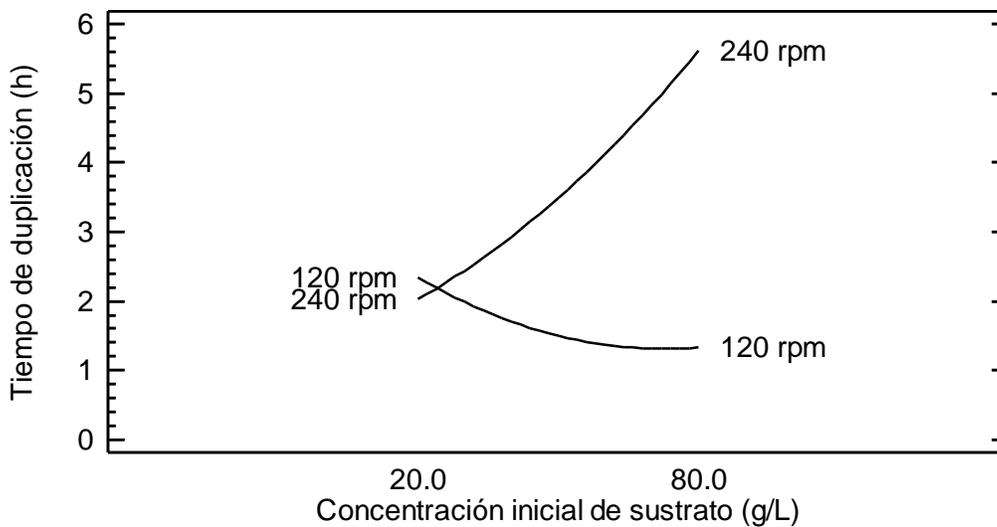


Figura 11. Efecto de interacción de factores para el tiempo de duplicación (diseño experimental  $3^2$ )

### 7.2.5.2 RENDIMIENTO PRODUCTO-SUSTRATO ( $Y_{p/s}$ )

El rendimiento  $Y_{p/s}$  es la variable de respuesta que mejor representa la capacidad productiva de xilitol por la levadura en los diferentes tratamientos experimentales. El análisis de varianza para esta variable descompuesto a efectos de un grado de libertad, se muestra en la Tabla 19.

**Tabla 19. Análisis de varianza descompuesto a efectos con un grado de libertad para el rendimiento producto-sustrato del diseño experimental 3<sup>2</sup>**

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Concentración inicial de sustrato	0.00962767	1	0.00962767	0.54	0.4779
B:Agitación	0.00272707	1	0.00272707	0.15	0.7033
AA	0.176666	1	0.176666	9.9	0.0093
AB	0.216186	1	0.216186	12.12	0.0051
BB	0.0205683	1	0.0205683	1.15	0.3059
Bloques	6.96889E-06	1	6.96889E-06	0	0.9846
Error total	0.196201	11	0.0178364		
Total	0.621983	17			

Las hipótesis nulas se rechazan cuando el Valor-P es menor al nivel de significancia establecido ( $\alpha=0.05$ )

De acuerdo a los estadísticos F calculados en la Tabla 19, no existen efectos significativos de ninguno de los factores principales, en su componente lineal. Como se observa en la Figura 12, los componentes cuadráticos de ambos factores son significativos debido a la curvatura generada en su comportamiento. El efecto cuadrático del factor A es significativo, como lo indica el análisis de varianza; sin embargo, el mismo análisis no manifiesta el efecto significativo del componente cuadrático del factor B, la agitación.

El rendimiento producto-sustrato, por tanto, fue favorecido en los puntos centrales de ambos factores, tratamiento que fue utilizado en el diseño experimental y que se comparará con los demás tratamientos mediante una prueba Tukey-Kramer.

El gráfico de efecto de interacción en la Figura 13 y el análisis de varianza manifiestan que el principal efecto de los factores, concentración inicial de sustrato y agitación, sobre la variable de respuesta ( $Y_{p/s}$ ) se debe a la interacción entre ambos.

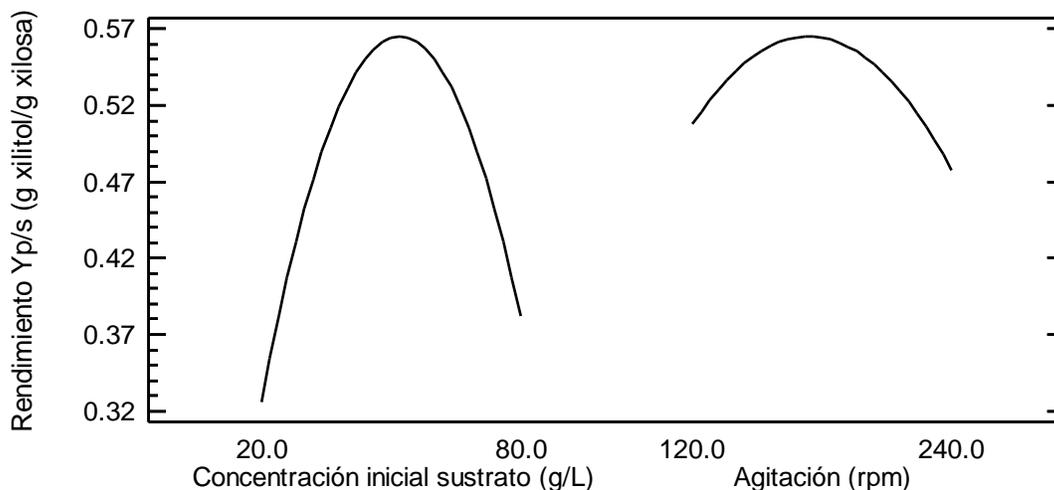


Figura 12. Efectos principales de los factores sobre el rendimiento producto-sustrato (diseño experimental  $3^2$ )

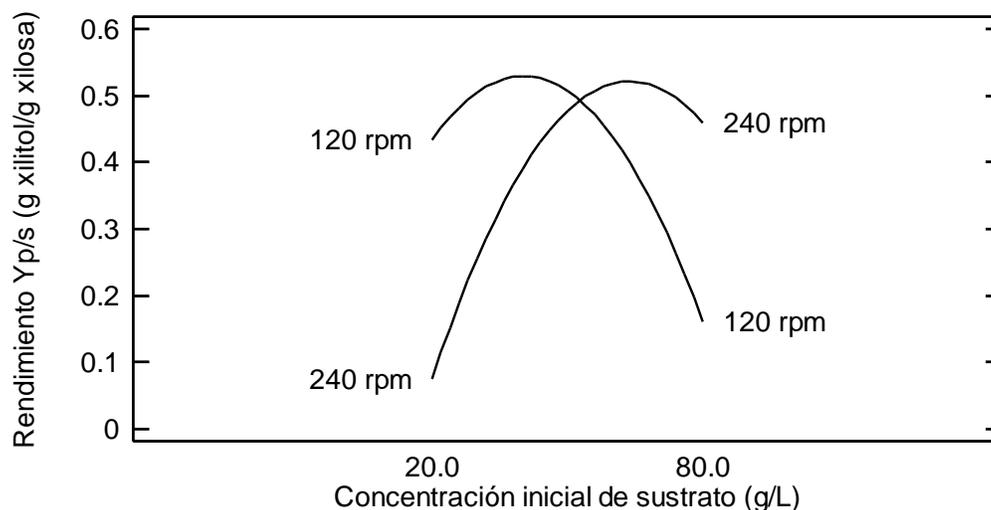


Figura 13. Efecto de interacción de factores para el rendimiento producto-sustrato (diseño experimental  $3^2$ )

### 7.2.5.3 PRODUCCIÓN DE XILITOL

El análisis de varianza, a un nivel de significancia de 0.05, para los efectos de la concentración inicial de sustrato y la agitación sobre la producción de xilitol, se muestran en la Tabla 20.

**Tabla 20. Análisis de varianza descompuesto a efectos con un grado de libertad para la producción de xilitol del diseño experimental 3<sup>2</sup>**

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Concentración inicial de sustrato	9.26115	1	9.26115	6.04	0.0318
B:Agitación	0.370095	1	0.370095	0.24	0.6329
AA	5.57952	1	5.57952	3.64	0.0829
AB	13.4753	1	13.4753	8.79	0.0129
BB	3.13007	1	3.13007	2.04	0.1809
Bloques	0.0356623	1	0.0356623	0.02	0.8816
Error total	16.8702	11	1.53365		
Total	48.722	17			

Las hipótesis nulas se rechazan cuando el Valor-P es menor al nivel de significancia establecido ( $\alpha=0.05$ )

La concentración inicial de sustrato, tanto en su componente lineal, como en su componente cuadrático, corresponden a los principales efectos sobre la producción de xilitol, debido solamente a los factores por separado, como lo indica el análisis de varianza. Estos efectos se pueden apreciar claramente en la Figura 14, donde existe un aumento lineal significativo debido al incremento de la concentración inicial de sustrato, hasta llegar a un punto máximo después del cual se genera un decremento, provocando curvatura (efecto cuadrático) en la variable de respuesta.

El gráfico de los efectos principales (Figura 14) sugiere un efecto cuadrático importante ocasionado por la agitación. Sin embargo, este efecto no demuestra ser significativo al observar el análisis de varianza de la Tabla 20.

El principal efecto sobre la variable de respuesta, la producción de xilitol, se debe una vez más a la interacción que existe entre los factores utilizados en el diseño experimental y que es apreciable en la Figura 15.

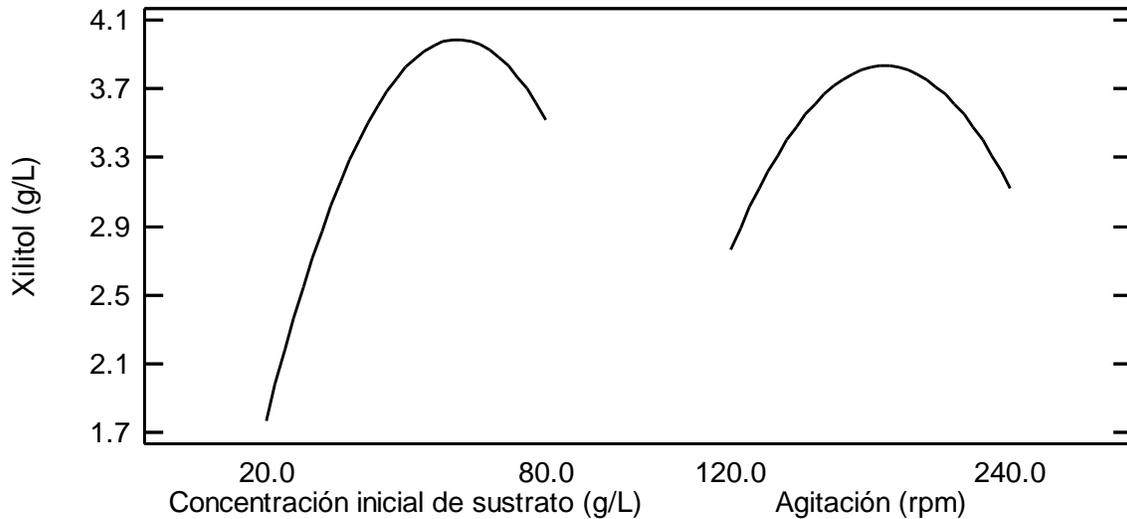


Figura 14. Efectos principales de los factores sobre la producción de xilitol (diseño experimental 3<sup>2</sup>)

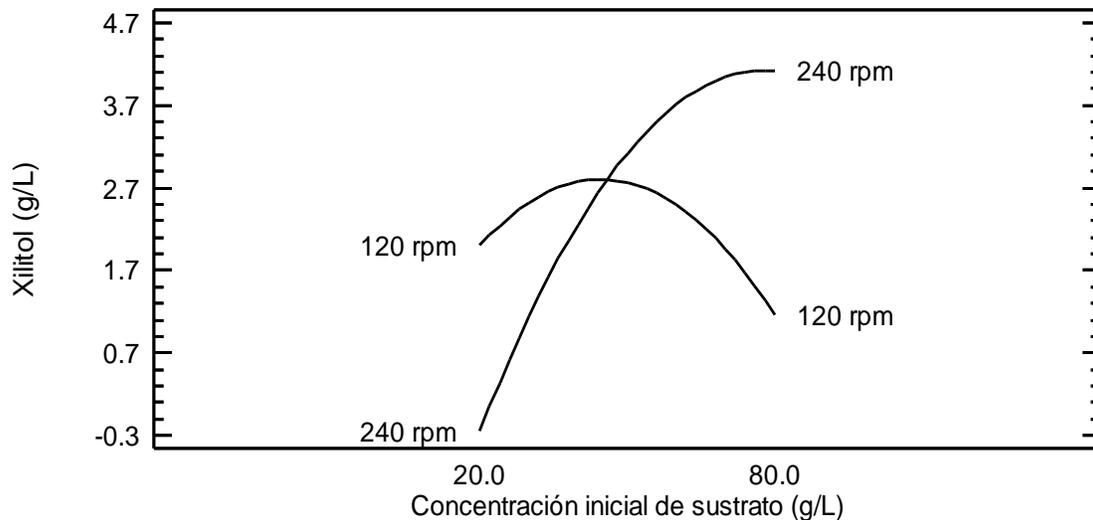


Figura 15. Efecto de interacción de factores para la producción de xilitol (diseño experimental 3<sup>2</sup>)

#### 7.2.5.4 PRUEBA ESTADÍSTICA DE TUKEY-KRAMER

Una vez conocidos los efectos de los factores principales y su interacción, es importante realizar un análisis comparativo sobre los valores puntuales obtenidos en los distintos tratamientos del diseño experimental. Esto nos permite conocer aquellos tratamientos que benefician o perjudican las variables de respuesta, para asociarlos a los efectos establecidos con el análisis de varianza.

Aunque no se presenta un análisis estadístico más profundo de la producción de etanol, glicerol y biomasa, el análisis comparativo nos permite conocer los tratamientos que favorecen la producción de los mismos.

La prueba estadística utilizada en la comparación de los resultados obtenidos para los diferentes tratamientos del diseño experimental, fue la de Tukey-Kramer a un nivel de significancia de 0.05. Los valores promedio de respuesta y diferencias significativas se muestran en la Tabla 21.

**Tabla 21. Resultados promedio del diseño experimental 3<sup>2</sup> para distintos parámetros comparados mediante la prueba estadística Tukey-Kramer**

Trat.	Factor A (g/L)	Factor B (rpm)	Y <sub>p/s</sub> (g xilitol/g xilosa)	t <sub>d</sub> (h)	Xilitol (g/L)	Etanol (g/L)	Glicero l (g/L)	Biomasa (g/L)
1	20	120	0.4121 <sup>CD</sup>	2.44 <sup>D</sup>	1.57 <sup>CD</sup>	12.09 <sup>E</sup>	1.47 <sup>A</sup>	3.15 <sup>B</sup>
2	50	120	0.6354 <sup>A</sup>	2.74 <sup>D</sup>	4.36 <sup>AB</sup>	19.11 <sup>BC</sup>	1.79 <sup>A</sup>	3.05 <sup>B</sup>
3	80	120	0.0552 <sup>F</sup>	-	0.01 <sup>E</sup>	0.01 <sup>G</sup>	0 <sup>B</sup>	0.05 <sup>C</sup>
4	20	180	0.2183 <sup>E</sup>	2.89 <sup>D</sup>	1.15 <sup>CD</sup>	14.47 <sup>D</sup>	1.58 <sup>A</sup>	3.05 <sup>B</sup>
5	50	180	0.6098 <sup>A</sup>	2.80 <sup>D</sup>	3.62 <sup>B</sup>	18.30 <sup>C</sup>	1.67 <sup>A</sup>	3.3 <sup>B</sup>
6	80	180	0.4445 <sup>C</sup>	7.04 <sup>A</sup>	4.35 <sup>AB</sup>	22.04 <sup>A</sup>	1.69 <sup>A</sup>	2.9 <sup>B</sup>
7	20	240	0.2036 <sup>E</sup>	2.76 <sup>D</sup>	0.81 <sup>D</sup>	11.92 <sup>E</sup>	1.85 <sup>A</sup>	2.5 <sup>B</sup>
8	50	240	0.3043 <sup>DE</sup>	3.46 <sup>C</sup>	1.74 <sup>C</sup>	9.18 <sup>F</sup>	2.86 <sup>A</sup>	4.75 <sup>A</sup>
9	80	240	0.5043 <sup>BC</sup>	4.91 <sup>B</sup>	4.44 <sup>A</sup>	20.91 <sup>AB</sup>	2.38 <sup>A</sup>	3.05 <sup>B</sup>

Las medias seguidas de la misma letra no difieren entre sí a un nivel de significancia  $\alpha=0.05$ . Tabla representativa para n=2

Factor A: Concentración inicial de sustrato

Factor B: Agitación

### 7.2.5.5 OPTIMIZACIÓN DEL RENDIMIENTO PRODUCTO-SUSTRATO

El diseño experimental factorial 3<sup>2</sup> tiene la ventaja de permitir una optimización de los factores estudiados, dentro de los niveles alto y bajo de cada uno de ellos. Así, se realizó la optimización sobre la principal variable de respuesta, el rendimiento producto-sustrato con el Software StatGraphics Centurion. El gráfico de los contornos de la superficie de respuesta estimada, se muestra en la Figura 16. De esta manera, se predice un valor máximo para la variable de respuesta de 0.5653 g de xilitol/g de xilosa, a una concentración inicial de sustrato de 51.43 g/L y agitación de 176.97 rpm.

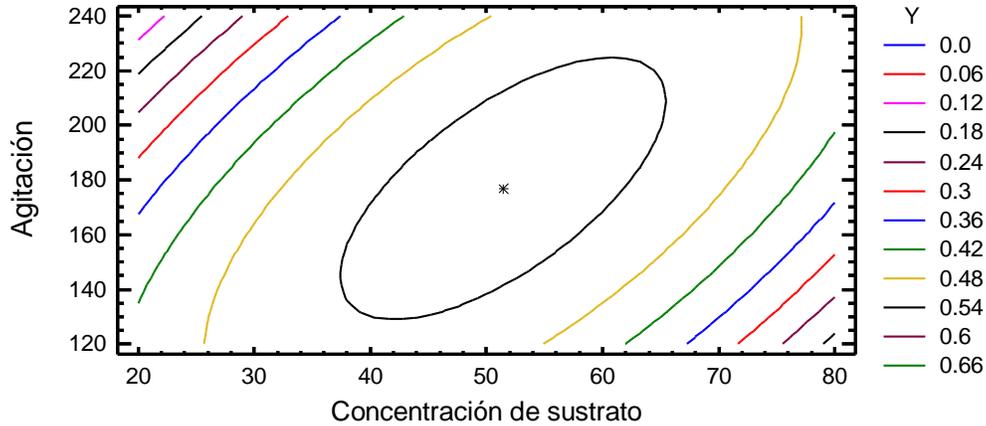


Figura 16. Contornos de la superficie de respuesta estimada para  $Y_{p/s}$  en el diseño  $3^2$

### 7.3 DISEÑO EXPERIMENTAL NIVEL BIORREACTOR

La composición promedio de los medios de fermentación utilizados para los distintos tratamientos del diseño experimental a nivel biorreactor se muestran en la Tabla 22. La concentración inicial de sustrato para todas las fermentaciones a nivel biorreactor, determinada a partir de los resultados obtenidos por el diseño experimental a nivel matraz, fue de 50 g/L de azúcares reductores.

Tabla 22. Composición del medio hidrolizado de semilla de tamarindo para tratamientos del diseño  $2^2$  con punto central

Concentración inicial de sustrato (g/L)	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Furfurales (g/L)
50	23.802 ± 3.398	12.795 ± 0.905	0.214 ± 0.014

Los datos muestran el promedio ± desviación estándar para n=10

A continuación se presentan los resultados obtenidos del diseño experimental, así como su análisis estadístico.

#### 7.3.1 CRECIMIENTO CELULAR

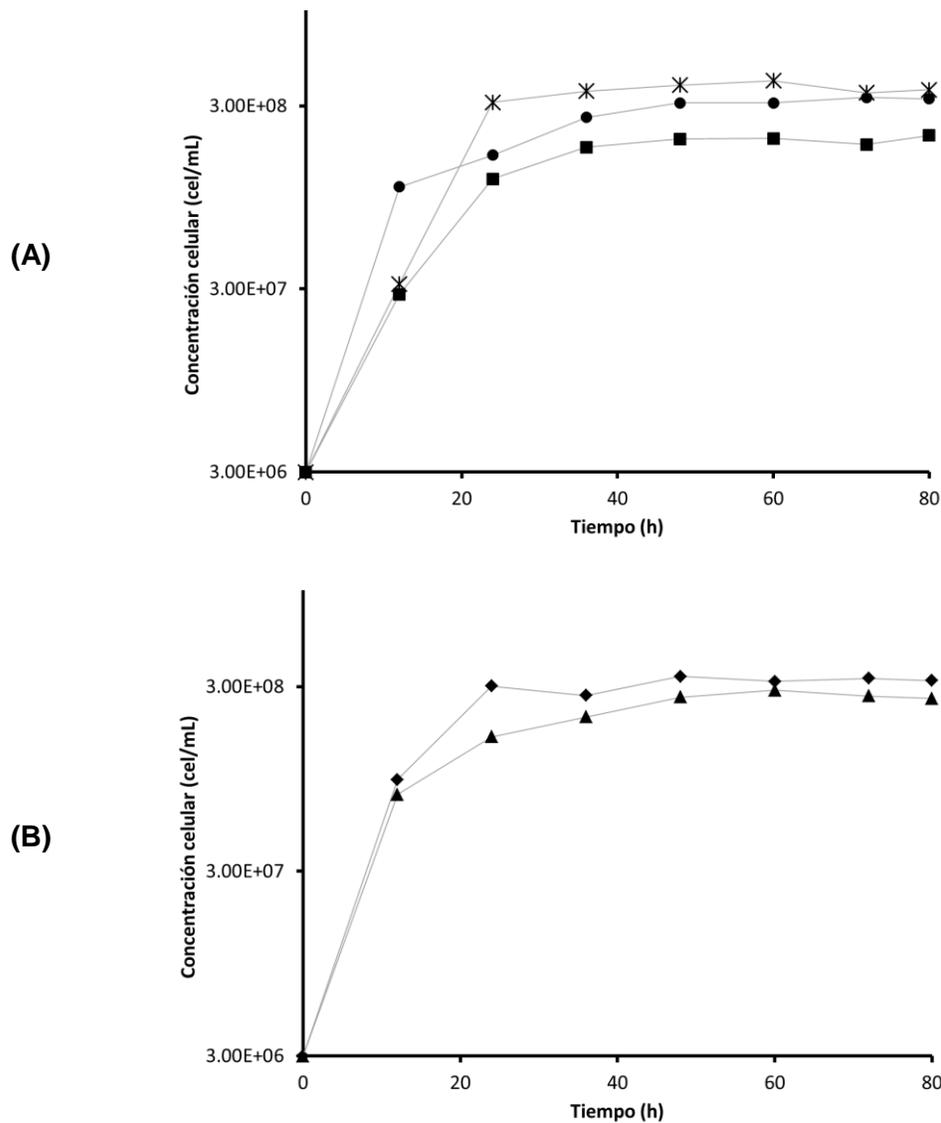
No se apreció una inhibición letal en ninguno de los tratamientos del diseño experimental sobre la levadura *C. magnoliae*.

Comparando los dos tratamientos a un nivel bajo de agitación (100 rpm), se encontraron comportamientos distintos en la levadura, a los diferentes niveles de

aireación. A un nivel alto de este factor (1 vvm), la fase exponencial de crecimiento duró 12 h aproximadamente; sin embargo, a un nivel bajo (0.1 vvm), esta tuvo una mayor duración, de 24 h (Figura 17A). Este efecto se analizará estadísticamente más adelante.

Similar a lo ocurrido con el tratamiento 5, a los niveles centrales de agitación (150 rpm) y aireación (0.55 vvm), se observó una fase exponencial de 24 h. La diferencia radica en una mayor concentración celular al final de dicha fase y durante la fase estacionaria (Figura 17A).

Por su parte, los tratamientos a un nivel alto de agitación (200 rpm), tuvieron un tiempo de fase exponencial corto, de 12 h, independientemente de la aireación (Figura 17B).



**Figura 17. Crecimiento celular para los tratamientos del diseño 2<sup>2</sup> con punto central.** (A) Agitación de 100 rpm y aireación de (■) 0.1 vvm, (●) 1vvm y (✕) 0.55 vvm, 150 rpm; (B) agitación de 200 rpm y aireación de (▲) 0.1 vvm, (◆)1 vvm. Datos representativos para n=2.

La velocidad específica de crecimiento, tiempo de duplicación y velocidad de división, calculados a partir de los datos obtenidos para crecimiento celular, se muestran en la Tabla 23.

**Tabla 23. Valores promedio de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), tiempo de duplicación ( $t_d$ ) y velocidad de división ( $\delta$ ) para el diseño experimental  $2^2$  con punto central**

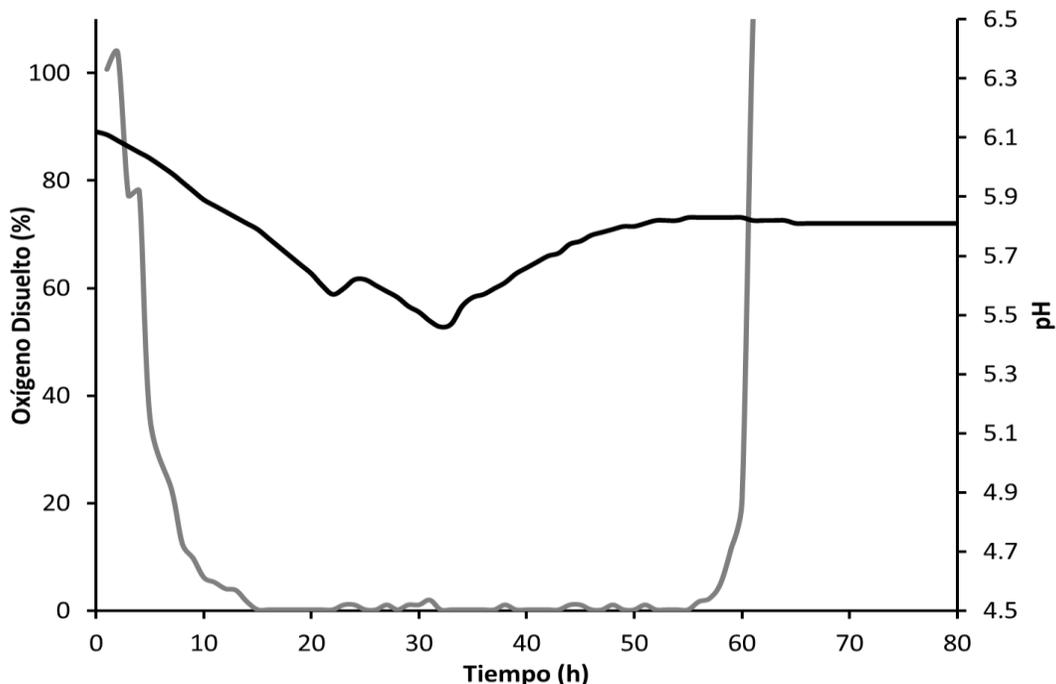
Tratamiento	Aireación (vvm)	Agitación (rpm)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$t_d$ (h)	$\delta$ ( $h^{-1}$ )
1	1	200	0.1907	3.6480	0.2751
2	0.1	200	0.2710	2.5626	0.3909
3	1	100	0.2974	2.3369	0.4291
4	0.55	150	0.1892	3.7024	0.2730
5	0.1	100	0.1534	4.5206	0.2214

Valores representativos para n=2

### 7.3.2 pH Y OXÍGENO DISUELTO

El pH inicial para todos los ensayos de fermentación a nivel biorreactor, fue de aproximadamente 6.3. Como se puede apreciar en la Figura 18, para el tratamiento a 100 rpm y 0.1 vvm, durante las primeras horas de fermentación existió una acidificación parcial del medio, hasta alcanzar un pH mínimo de 5.46 a las 32 h de fermentación, después del cual hubo un ligero incremento en el mismo y finalmente se mantuvo constante. La misma tendencia se observó para los otros tratamientos, sin observarse diferencias significativas.

El oxígeno disuelto para este tratamiento (0.1 vvm) y calibrado a un 100 % de saturación al inicio de la fermentación, disminuyó aceleradamente durante las primeras horas, hasta llegar al 0 % tras 14 h de fermentación; después de dicho tiempo se mantuvo constante. El oxígeno disuelto comienza a incrementarse a partir de las 56 h. Existieron pocas diferencias respecto a los otros tratamientos en relación al oxígeno consumido por las levaduras.



**Figura 18.** Oxígeno disuelto (—) y pH (—) a través del tiempo para un tratamiento del diseño experimental 2<sup>2</sup> con punto central: agitación de 100 rpm y aireación de 0.1 vvm (Datos obtenidos de Software BioXpert)

### 7.3.3 CONSUMO DE GLUCOSA Y PRODUCCIÓN DE ETANOL

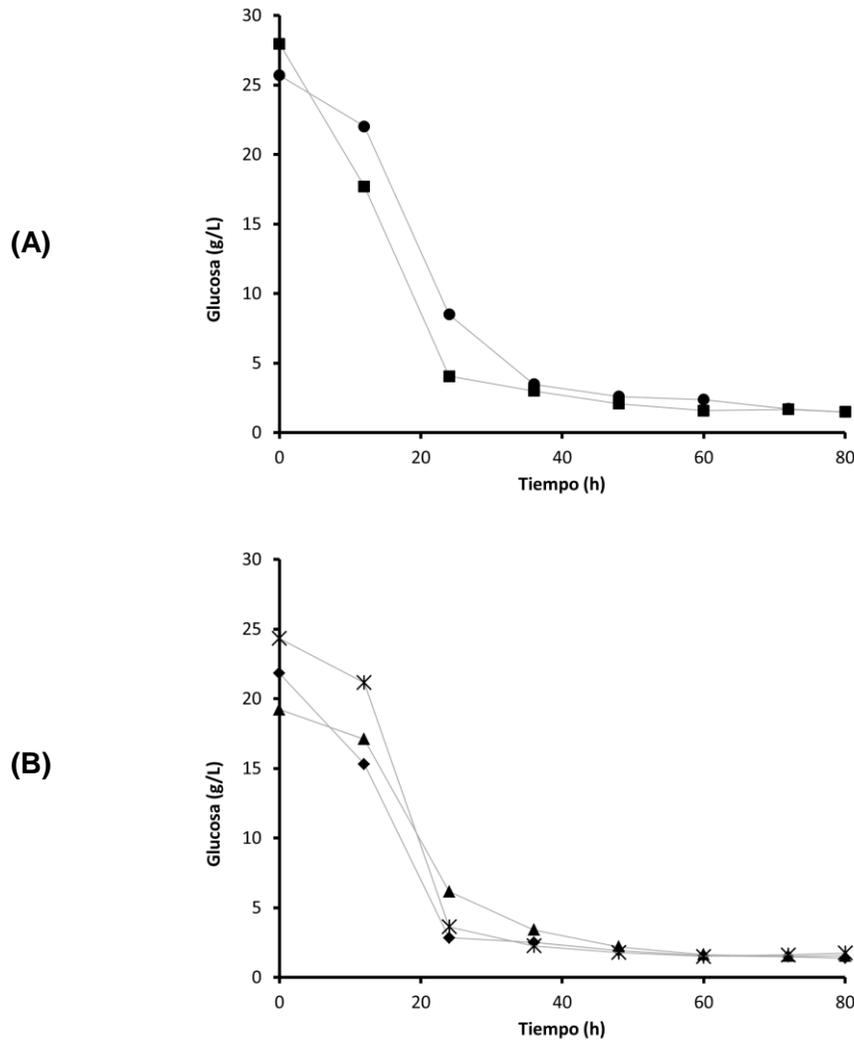
No se observaron diferencias significativas respecto al consumo de glucosa para los 5 tratamientos del diseño experimental (Figura 19). En todos los casos, el consumo de este sustrato fue acelerado durante las primeras 24 h de fermentación, a partir de las cuales se volvió lento (por debajo de los 5 g/L). El consumo total de glucosa disponible de la levadura en los diferentes tratamientos fue de entre el 92 y 94 %.

En cuanto a la producción de etanol, presentó diferentes comportamientos entre los distintos tratamientos. Con agitación de 100 rpm, la producción de etanol aumentó durante las primeras horas de fermentación a ambos niveles de aireación (Figura 20A). De estos dos tratamientos, el 5 (aireación de 0.1 vvm) fue el que tuvo una mayor generación de producto, la cual se mantuvo constante a partir de las 24 h aproximadamente. A un nivel alto de aireación (tratamiento 3), hubo ligeras variaciones a partir de las 12 h de fermentación, alcanzando la concentración máxima al finalizar esta.

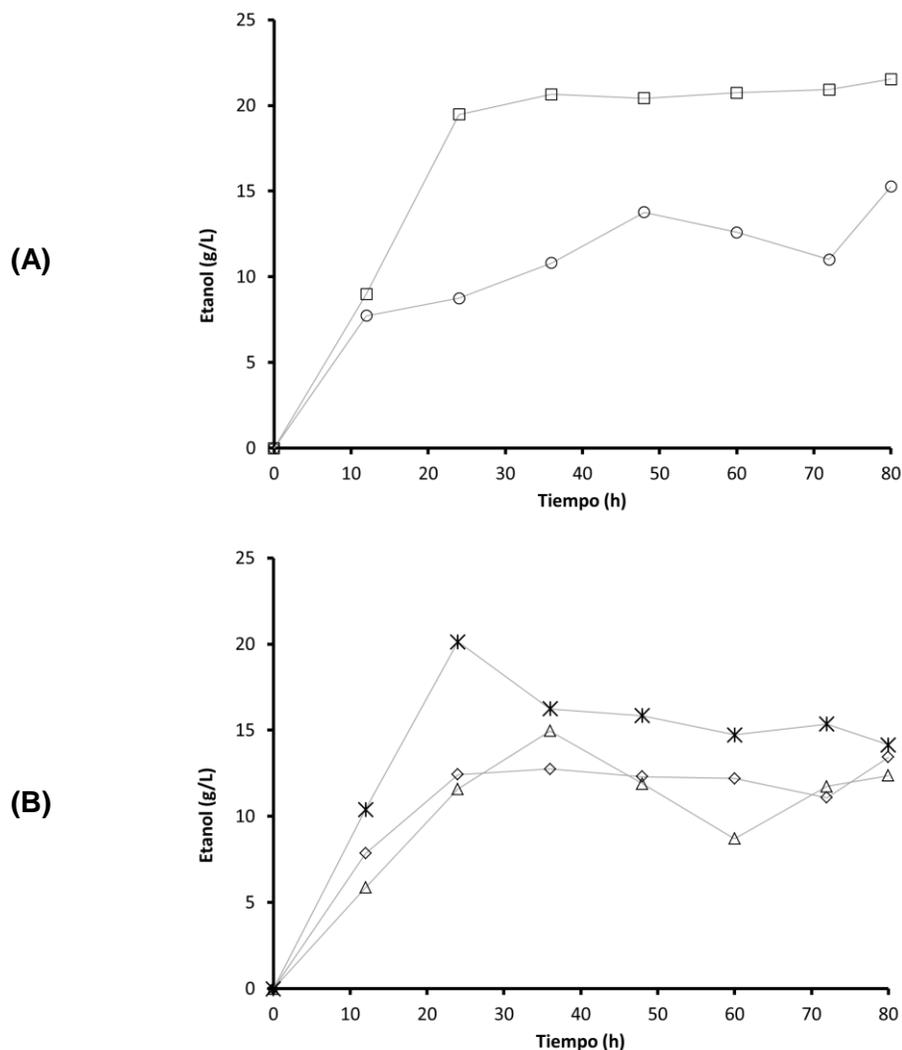
A un nivel alto de agitación, los tratamientos 1 y 2, tuvieron una producción de etanol similar tras 80 horas de fermentación. Al igual que a un nivel bajo de agitación, la mayor producción ocurrió durante las primeras horas (Figura 20B). Con una aireación de 1 vvm,

la concentración de etanol se mantuvo constante durante el resto de la cinética; mientras a un nivel bajo de aireación (0.1 vvm) se obtuvo un punto máximo a las 36 h, tras la cual hubo un descenso en la concentración de producto hasta las 48 h, después de la cual comenzó a incrementarse.

A diferencia de los tratamientos antes mencionados, en el punto central, la mayor producción de etanol ocurrió a las 24 h de fermentación (Figura 20B).



**Figura 19. Consumo de glucosa en los tratamientos del diseño  $2^2$  con punto central.** (A) Agitación de 100 rpm y aireación de (■) 0.1 vvm, (●) 1 vvm; (B) agitación de 200 rpm y aireación de (▲) 0.1 vvm, (◆) 1 vvm y (✱) 0.55 vvm, 150 rpm. Datos representativos para n=2.



**Figura 20. Producción de etanol en los tratamientos del diseño 2<sup>2</sup> con punto central.** (A) Agitación de 100 rpm y aireación de (□) 0.1 vvm, (○) 1 vvm; (B) agitación de 200 rpm y aireación de (Δ) 0.1 vvm, (◇) 1 vvm y (✕) 0.55 vvm, 150 rpm. Datos representativos para n=2

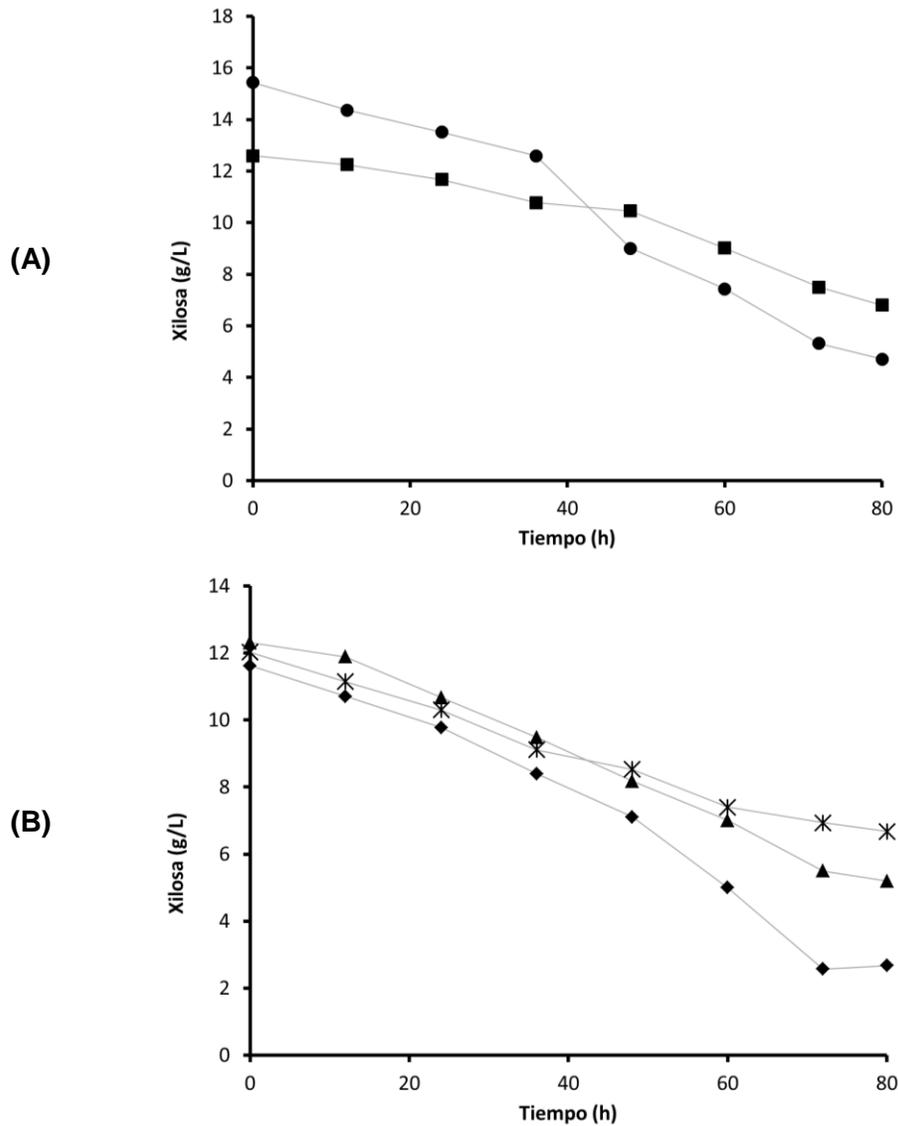
### 7.3.4 CONSUMO DE XILOSA Y PRODUCCIÓN DE XILITOL

En un nivel bajo de agitación (100 rpm), el consumo de xilosa para los niveles bajo y alto de aireación (0.1 y 1 vvm, respectivamente) fue distinto (Figura 21A). En el tratamiento 5 hubo un bajo aprovechamiento de la xilosa disponible en el medio de fermentación, consumiendo solo un 46 % al final de la misma.

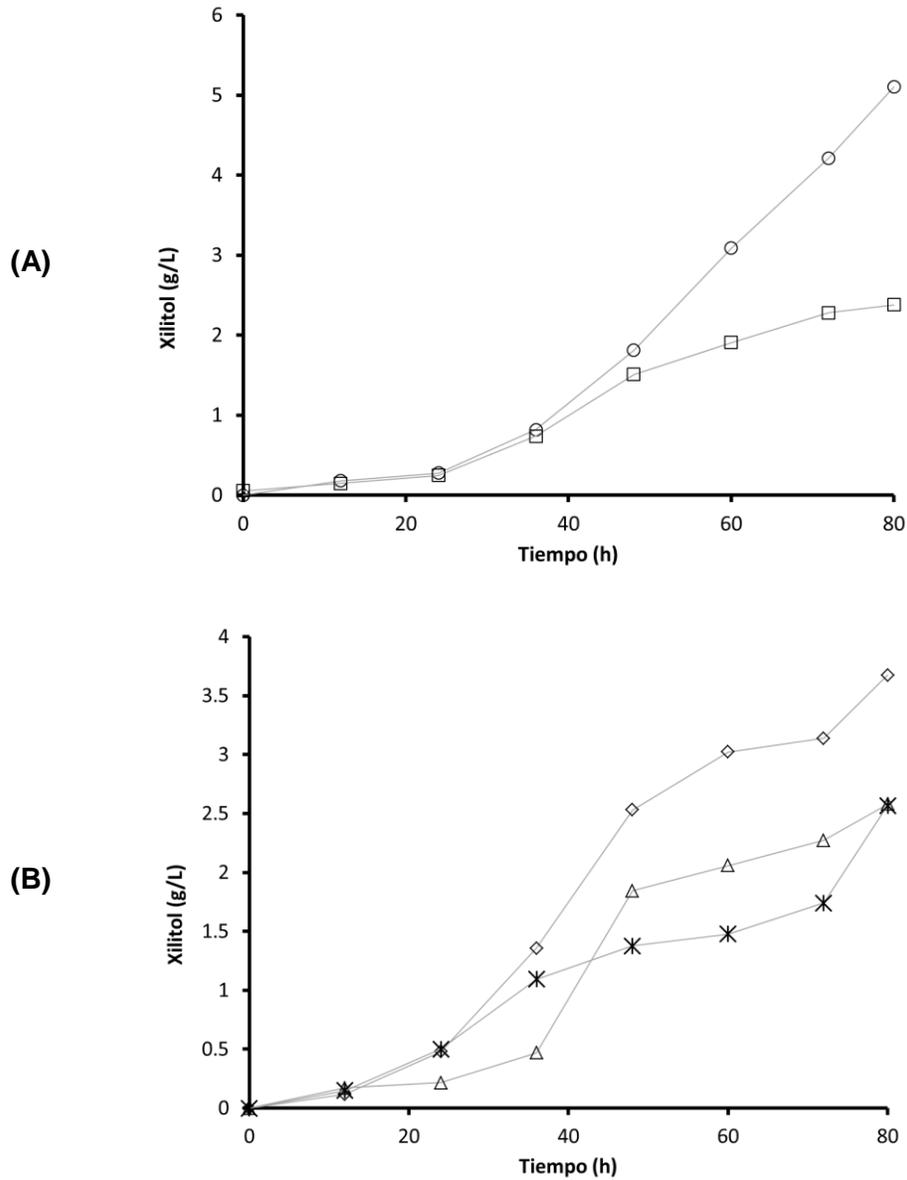
Por su parte, en el tratamiento 3, hubo un consumo acelerado de sustrato entre las 36 y 48 h de fermentación, agotando un 70 % de la xilosa total. Fue este último tratamiento, el que tuvo una mayor producción de xilitol al final de la cinética de fermentación, alcanzando en promedio 5.1 g/L de producto (Figura 22A).

A un nivel alto de agitación (200 rpm) el consumo de xilosa también se vio beneficiado a un nivel alto de aireación (1 vvm), logrando consumir el 79 % de esta, respecto al tratamiento 2 (aireación de 0.1 vvm), donde solo se consumió el 58 % de la xilosa disponible (Figura 21B). Esto se reflejó en la producción de xilitol, donde el tratamiento 1 alcanzó una concentración de producto de 3.43 g/L, mientras el tratamiento 2 de 2.58 g/L (Figura 22B).

El menor consumo de xilosa (45 %) ocurrió en el tratamiento 4, en los puntos centrales de ambos factores (Figura 21B). Sin embargo, la generación de xilitol al finalizar la fermentación fue similar a la del tratamiento 2, con 2.57 g/L (Figura 22B).



**Figura 21. Consumo de xilosa en los tratamientos del diseño  $2^2$  con punto central.** (A) Agitación de 100 rpm y aireación de (■) 0.1 vvm, (●) 1 vvm; (B) agitación de 200 rpm y aireación de (▲) 0.1 vvm, (◆) 1 vvm y (✕) 0.55 vvm, 150 rpm. Datos representativos para n=2.



**Figura 22. Producción de xilitol en los tratamientos del diseño  $2^2$  con punto central.** (a) Agitación de 100 rpm y aireación de ( $\square$ ) 0.1 vvm, ( $\circ$ ) 1 vvm; (b) agitación de 200 rpm y aireación de ( $\Delta$ ) 0.1 vvm, ( $\diamond$ ) 1 vvm y ( $\ast$ ) 0.55 vvm, 150 rpm. Datos representativos para n=2

De acuerdo con los datos obtenidos de consumo de xilosa y producción de xilitol, se calculó el rendimiento producto-sustrato ( $Y_{p/s}$ ) (Tabla 24), que será analizado estadísticamente más adelante.

**Tabla 24. Rendimiento producto-sustrato ( $Y_{p/s}$ ) promedio para los distintos tratamientos del diseño experimental  $2^2$  con punto central**

Tratamiento	Aireación (vvm)	Agitación (rpm)	$Y_{p/s}$ (g de xilitol/g de xilosa)
1	1	200	0.5609
2	0.1	200	0.4491
3	1	100	0.4805
4	0.55	150	0.3931
5	0.1	100	0.7092

Datos representativos para n=2

### 7.3.5 PRODUCCIÓN DE BIOMASA Y GLICEROL

La producción de biomasa y glicerol para los ensayos de fermentación a nivel biorreactor se muestran en la Tabla 25.

Las concentraciones de glicerol mostradas en la Tabla 25, son las máximas alcanzadas durante la fermentación en los diferentes tratamientos del diseño experimental. Sin embargo, estas concentraciones se dieron a diferentes horas de fermentación entre los tratamientos. Por ejemplo, la concentración más alta se obtuvo en el tratamiento 2, y corresponden a las 36 h de fermentación, mientras la producción más baja de las que se muestran en dicha tabla, con el tratamiento 1, ocurrió a las 24 h de fermentación.

Es justamente en el tratamiento 1, donde se hubo la mayor generación de biomasa, respecto a los demás tratamientos del diseño experimental. Sin embargo, estos datos (al igual que los de producción de glicerol) se compararán estadísticamente más adelante para conocer si existen diferencias significativas.

**Tabla 25. Producción máxima de biomasa y glicerol para los distintos tratamientos del diseño experimental  $2^2$  con punto central**

Tratamiento	Aireación (vvm)	Agitación (rpm)	Glicerol (g/L)	Biomasa (g/L)
1	1	200	1.63	3.50
2	0.1	200	3.79	2.30
3	1	100	1.83	2.95
4	0.55	150	2.01	3.20
5	0.1	100	2.78	2.55

Datos representativos para n=2

## 7.3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DISEÑO EXPERIMENTAL A NIVEL BIORREACTOR

Al igual que en el diseño experimental a nivel matraz, el análisis estadístico sobre el diseño experimental  $2^2$  en biorreactor se realizó sobre tres variables de respuesta: tiempo de duplicación ( $t_d$ ), rendimiento producto-sustrato ( $Y_{p/s}$ ) y producción de xilitol. Además, en el análisis comparativo con la prueba Tukey-Kramer también se incluye la producción de etanol, glicerol y biomasa.

El análisis de varianza factorial  $2^2$  permite establecer si existe un efecto de cada factor principal, así como la interacción entre dichos factores, sobre las variables de respuesta. Las hipótesis nulas a comprobar, por tanto, son:

- $H_o : \gamma_i = 0$  (no hay efecto significativo del factor A sobre la variable de respuesta).
- $H_o : \delta_j = 0$  (no hay efecto significativo del factor B sobre la variable de respuesta).
- $H_o : (\gamma\delta)_{ij} = 0$  (no hay efecto significativo de interacción de los factores A y B sobre la variable de respuesta).

### 7.3.6.1 TIEMPO DE DUPLICACIÓN ( $t_d$ )

De acuerdo al análisis de varianza para la variable de respuesta tiempo de duplicación, los dos factores principales, agitación y aireación, no ejercieron un efecto significativo sobre dicha variable. La interacción de los factores muestra significancia a un nivel de confiabilidad del 95 % (Tabla 26).

**Tabla 26. Análisis de varianza para el tiempo de duplicación del diseño factorial  $2^2$  con punto central**

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Agitación	0.20924	1	0.20924	1.64	0.2481
B:Aireación	0.603022	1	0.603022	4.72	0.0729
AB	5.34383	1	5.34383	41.79	0.0006
Error	0.767207	6	0.127868		
Total	6.9233	9			

Las hipótesis nulas se rechazan cuando el Valor-P es menor al nivel de significancia establecido ( $\alpha=0.05$ )

A pesar de no mostrar un efecto significativo por el análisis de varianza, en la Figura 23 se observa que los menores tiempos de duplicación se encontrarían a 200 rpm y 1 vvm. Sin embargo, la Figura 24 muestra nuevamente el fuerte efecto de interacción entre los factores. Dicho comportamiento se discutirá más adelante.

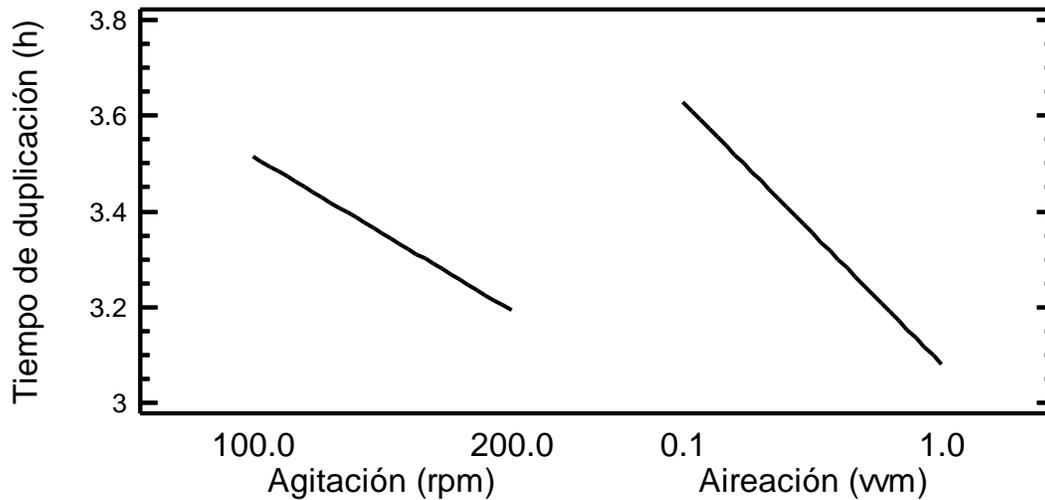


Figura 23. Efectos principales de los factores sobre el tiempo de duplicación (diseño experimental 2<sup>2</sup>)

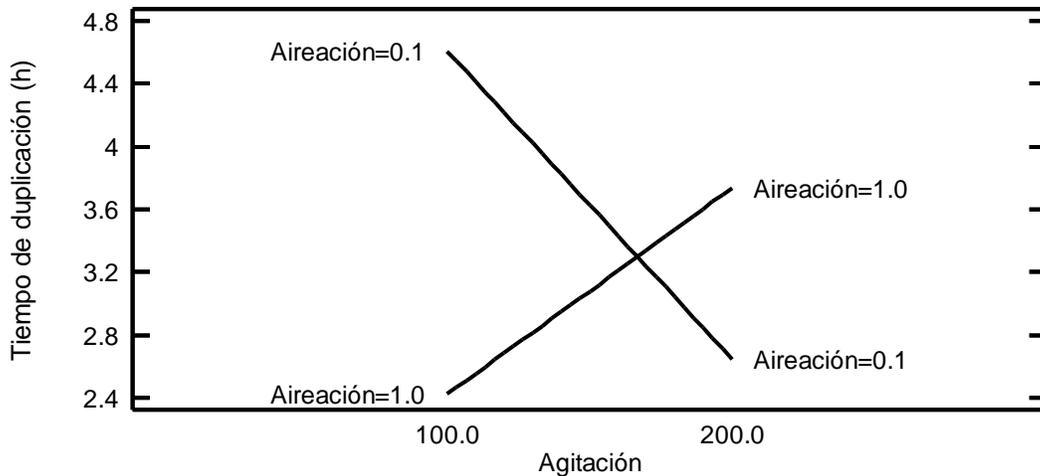


Figura 24. Efecto de interacción de factores para el tiempo de duplicación (diseño experimental 2<sup>2</sup>)

### 7.3.6.2 RENDIMIENTO PRODUCTO-SUSTRATO ( $Y_{p/s}$ )

En la Tabla 27 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) para el rendimiento producto-sustrato para el diseño experimental a nivel biorreactor. Se observa una

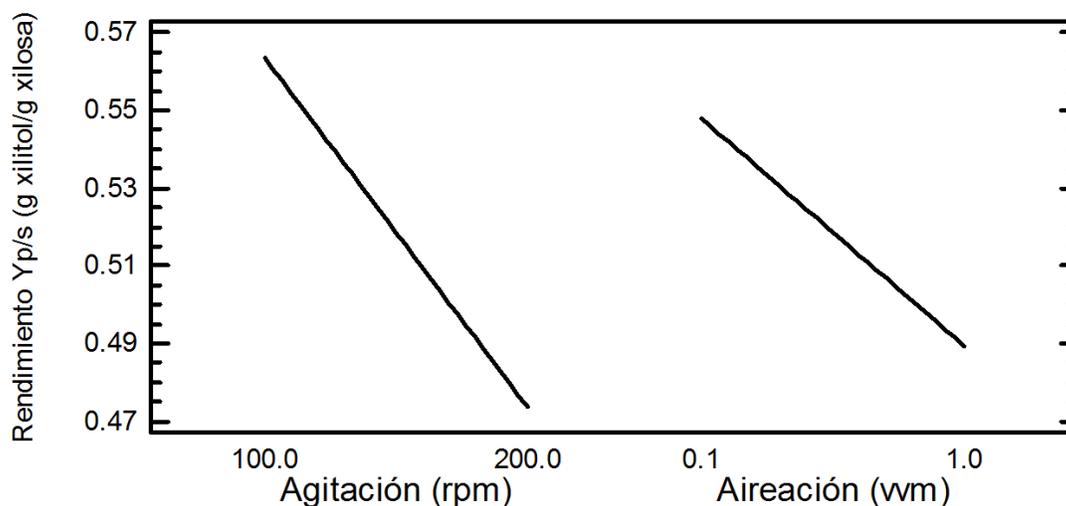
tendencia similar obtenida con el tiempo de duplicación, donde los factores principales no tuvieron un efecto significativo sobre el rendimiento producto-sustrato, pero sí existe un fuerte efecto debido a la interacción entre los factores, a un nivel de significancia de 0.05.

**Tabla 27. Análisis de varianza para el rendimiento producto-sustrato del diseño factorial 2<sup>2</sup> con punto central**

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Agitación	0.0161666	1	0.0161666	1.91	0.2161
B:Aireación	0.00683732	1	0.00683732	0.81	0.4032
AB	0.0579722	1	0.0579722	6.85	0.0397
Error	0.0507482	6	0.00845804		
Total	0.131724	9			

Las hipótesis nulas se rechazan cuando el Valor-P es menor al nivel de significancia establecido ( $\alpha=0.05$ )

En este caso, se esperaría un mayor rendimiento producto-sustrato ( $Y_{p/s}$ ) a niveles bajos de ambos factores (Figura 25), no obstante estos no resultaron ser significativos en el análisis estadístico. Esto se puede constatar con la interacción entre los factores (Figura 26), donde se comprueba un beneficio (mayor rendimiento) sobre la variable de respuesta, a una agitación de 100 rpm y una aireación de 0.1 vvm.



**Figura 25. Efectos principales de los factores sobre el rendimiento producto-sustrato (diseño experimental 2<sup>2</sup>)**

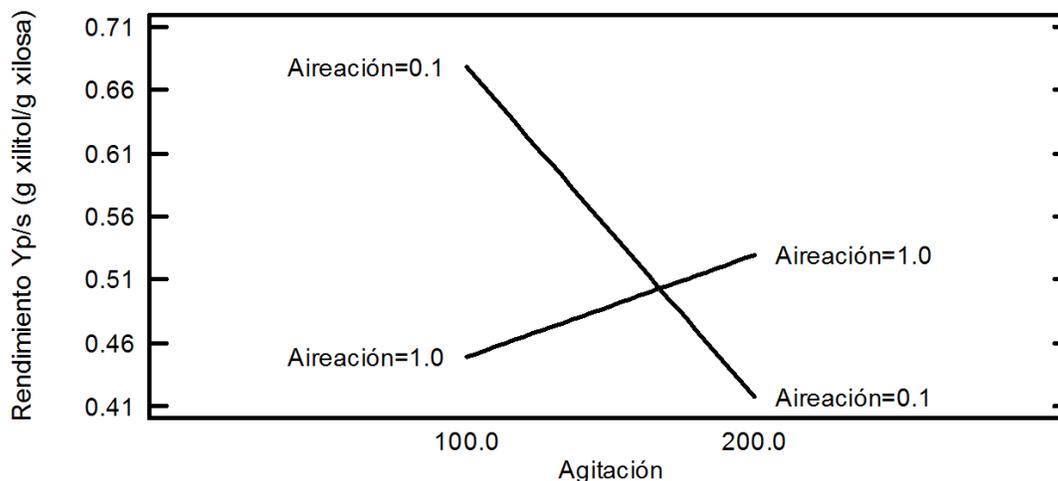


Figura 26. Efecto de interacción de factores para el rendimiento producto-sustrato (diseño experimental 2<sup>2</sup>)

### 7.3.6.3 PRODUCCIÓN DE XILITOL

A diferencia de las variables de respuesta analizadas anteriormente para el diseño experimental a nivel biorreactor 2<sup>2</sup>, en la producción de xilitol hubo un efecto significativo por uno de los factores principales, la aireación, a un nivel de confiabilidad del 95 %. El otro factor, la agitación, no tuvo un efecto importante sobre la producción de xilitol dentro de los niveles estudiados. La interacción entre los factores, en este caso, tampoco ejerció un efecto estadístico significativo al mismo nivel de confianza (Tabla 28).

Tabla 28. Análisis de varianza para la producción de xilitol del diseño factorial 2<sup>2</sup> con punto central

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Agitación	0.750068	1	0.750068	0.97	0.3637
B:Aireación	7.28894	1	7.28894	9.38	0.0221
AB	1.32243	1	1.32243	1.7	0.2398
Error	4.66054	6	0.776757		
Total	14.022	9			

Las hipótesis nulas se rechazan cuando el Valor-P es menor al nivel de significancia establecido ( $\alpha=0.05$ )

Así, la aireación fue el factor que tuvo un mayor impacto sobre la producción de xilitol por *C. magnoliae* en los medios hidrolizados de semilla de tamarindo, obteniéndose

mayores concentraciones de producto a niveles altos de dicho factor. A pesar de no mostrar significancia, la agitación muestra un ligero efecto sobre la variable de respuesta (Figura 27). En la Figura 28, se observa un efecto de interacción entre los factores, pero no suficiente como para resultar significativo.

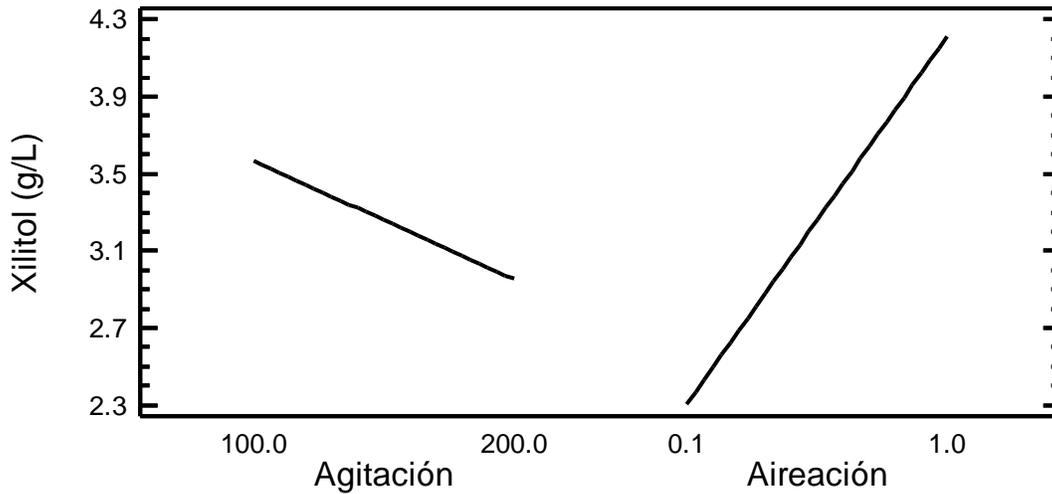


Figura 27. Efectos principales de los factores sobre la producción de xilitol (diseño experimental 2<sup>2</sup>)

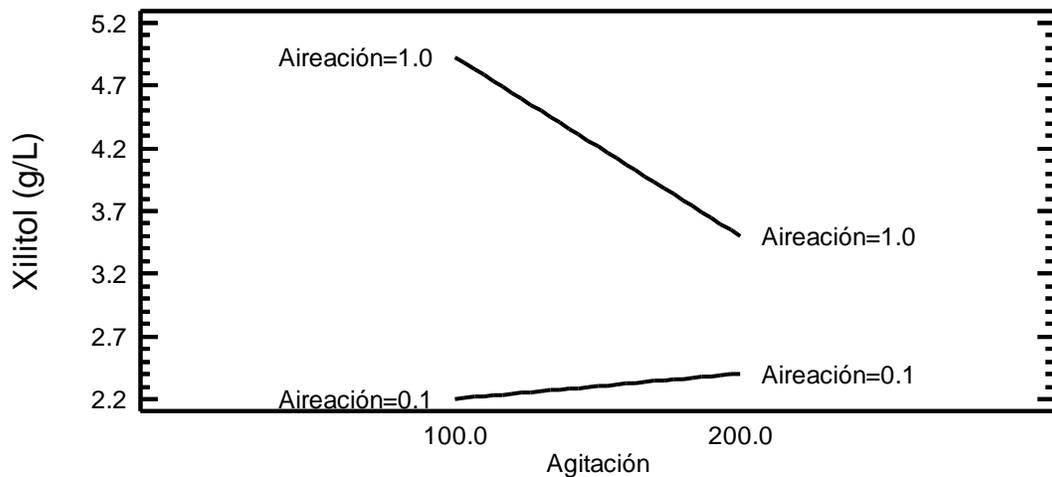


Figura 28. Efecto de interacción de factores para la producción de xilitol (diseño experimental 2<sup>2</sup>)

### 7.3.6.4 PRUEBA ESTADÍSTICA DE TUKEY-KRAMER

Además del análisis de varianza para las tres principales variables de respuesta, se llevó a cabo una prueba de comparación de medias pareadas Tukey-Kramer, para conocer diferencias significativas entre los valores puntuales obtenidos de los diferentes tratamientos del diseño experimental a nivel biorreactor.

Esta prueba también permite comparar la producción de otros compuestos y de biomasa. En el caso del etanol, se presentan las concentraciones obtenidas al final de la fermentación. Los resultados se muestran en la Tabla 29.

**Tabla 29. Resultados promedio del diseño experimental 2<sup>2</sup> para distintos parámetros comparados mediante la prueba estadística Tukey-Kramer.**

Trat.	Aireación (vvm)	Agitación (rpm)	Y <sub>p/s</sub> (g xilitol/g xilosa)	t <sub>d</sub> (h)	Xilitol (g/L)	Etanol (g/L)	Glicero l (g/L)	Biomasa (g/L)
1	1	200	0.5609 <sup>B</sup>	3.648 <sup>AB</sup>	3.675 <sup>A</sup>	13.442 <sup>B</sup>	1.627 <sup>B</sup>	3.5 <sup>A</sup>
2	0.1	200	0.4491 <sup>C</sup>	2.563 <sup>BC</sup>	2.579 <sup>A</sup>	12.366 <sup>B</sup>	3.79 <sup>A</sup>	2.3 <sup>A</sup>
3	1	100	0.4805 <sup>BC</sup>	2.337 <sup>C</sup>	5.101 <sup>A</sup>	15.270 <sup>B</sup>	1.834 <sup>B</sup>	2.95 <sup>A</sup>
4	0.55	150	0.3931 <sup>C</sup>	3.702 <sup>AB</sup>	2.566 <sup>A</sup>	14.152 <sup>B</sup>	2.011 <sup>B</sup>	3.2 <sup>A</sup>
5	0.1	100	0.7092 <sup>A</sup>	4.521 <sup>A</sup>	2.378 <sup>A</sup>	21.538 <sup>A</sup>	2.78 <sup>AB</sup>	2.55 <sup>A</sup>

Las medias seguidas de la misma letra no difieren entre sí a un nivel de significancia  $\alpha=0.05$ . Tabla representativa para n=2

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LA SEMILLA

Existen pocas diferencias entre la composición reportada por Kumar y Battacharya (2008), en la Tabla 1, y la expresada en la Tabla 13. La humedad reportada por el análisis bromatológico es menor al rango establecido por los autores antes mencionados. Esta diferencia puede deberse principalmente al estado en que la materia prima se analizó; como se mencionó, el análisis se realizó con semilla molida de cierto diámetro de partícula. Sin embargo, Kumar y Battacharya (2008) no reportan dicho factor.

Otros constituyentes, como proteína, grasas y fibra cruda, se encuentran en los límites inferiores de los reportados por estos autores. Otra importante diferencia radica en la fracción de carbohidratos en la semilla con testa. El valor reportado en la Tabla 1, es menor al obtenido del análisis bromatológico, en el cual, esta fracción es muy parecida a la de la semilla sin testa.

A pesar de que la proporción de fibra dietética es prácticamente la misma para la semilla con testa y sin testa, la principal diferencia radica en la fracción que es soluble e insoluble. La semilla con testa está compuesta principalmente por fibra insoluble, mientras la semilla sin testa, por fibra soluble.

### 8.2 HIDROLIZADO DE SEMILLA DE TAMARINDO

Como ya se mencionó, con el fin de eliminar un posible error debido a una diferencia en la concentración de los principales azúcares que forman parte del hidrolizado de tamarindo, se preparó un solo lote de hidrolizado, utilizado para las fermentaciones a las condiciones establecidas por los diferentes tratamientos de ambos diseños experimentales (a nivel matraz y biorreactor).

El hidrolizado de semilla de tamarindo preparado a las condiciones establecidas por González-Hernández *et al.* (2012) para los ensayos a nivel matraz, tuvo una composición (Tabla 14) con concentraciones altas de glucosa (49.271 g/L) y similares de xilosa (14.558 g/L), si es comparado con las concentraciones de estos monosacáridos en otros hidrolizados orgánicos que han sido utilizados como fuente de sustrato para la producción de xilitol. Martínez *et al.* (2002) reporta la composición de cuatro hidrolizados hemicelulósicos: bagazo de caña con concentraciones de glucosa y xilosa de 1.70 y 22.71

g/L, respectivamente; para paja de arroz de 3.29 y 18.33g/L; para hidrolizado de eucalipto de 1.53 y 24.32 g/L; y para paja de trigo 2.79 y 10.65 g/L.

La composición del medio hidrolizado de semilla de tamarindo utilizado para todos los ensayos de fermentación a nivel biorreactor, fue de aproximadamente 23.802 g/L de glucosa y 12.795 de xilosa, para una concentración de 50 g/L de azúcares reductores totales. Las concentraciones de dichos monosacáridos en el medio de fermentación, varía respecto al medio preparado para el diseño experimental a nivel matraz, donde disminuye considerablemente la presencia de glucosa (aproximadamente 13 g/L), mientras aumenta ligeramente la presencia de xilosa (aproximadamente 1 g/L). A pesar de ello, la concentración de xilosa es menor a la obtenida por Kiyoshi *et al.* (2004), autor que también utilizó a *C. magnoliae* en su estudio, en medios hidrolizados de mazorca de maíz, de aproximadamente 25 g/L.

El ácido acético en medios hidrolizados hemicelulósicos se deriva de la deacetilación de las cadenas laterales de xilano de las hemicelulosas (Davies *et al.*, 2011). La presencia de dicho compuesto en los medios hidrolizados de semilla de tamarindo es poco probable, no así la presencia de otros compuestos inhibitorios como el furfural y el hidroximetilfurfural.

La concentración de estos compuestos resultó ser similar en los medios preparados a partir de semilla de tamarindo, para los ensayos a nivel matraz y biorreactor (de 0.225 g/L y 0.214 g/L, respectivamente). Pocos autores reportan la concentración de furfurales en medios hidrolizados a partir de residuos orgánicos; las concentraciones generadas de furfurales, debido a las condiciones a las cuales se llevó la hidrólisis en el presente estudio, son ligeramente mayores a la reportada por Martínez *et al.* (2002) para bagazo de caña (0.19 g/L), pero menores a las obtenidas por el mismo autor para paja de arroz (0.27 g/L), madera de eucalipto (0.64 g/L) y paja de trigo (0.43 g/L).

El impacto de estos compuestos sobre el crecimiento de la levadura en los medios hidrolizados de semilla de tamarindo, se analizará más adelante.

## 8.3 DISEÑO EXPERIMENTAL NIVEL MATRAZ

### **Crecimiento celular**

En general, la levadura logró adaptarse al medio hidrolizado de semilla de tamarindo en los distintos tratamientos del diseño experimental. La excepción fue el tratamiento a una concentración inicial de 80 g/L y una agitación de 120 rpm, en la cual no se observó

crecimiento ni consumo de los sustratos presentes en el medio de fermentación. Esta inhibición pudo deberse a la interacción de los factores, como se verá mas adelante.

La adaptación y crecimiento en los distintos tratamientos del diseño experimental se puede analizar a partir de las pruebas estadísticas aplicadas para el tiempo de duplicación. Como se mencionó, un menor tiempo de duplicación, indica un tiempo reducido de la fase exponencial de crecimiento.

La agitación fue la que tuvo un mayor impacto sobre el tiempo de duplicación de la levadura (Tabla 18). En la Figura 10 se observa un incremento en el tiempo de duplicación debido al aumento en el nivel de la agitación, y una curvatura entre los niveles medio y alto de dicho factor. Si lo que se busca es un menor tiempo de duplicación, un nivel bajo de agitación (120 rpm) sería conveniente.

A pesar de que gráficamente se aprecia un efecto lineal de la concentración inicial de sustrato, el análisis de varianza demostró que este no fue significativo; esto pudo deberse a la poca variación que existe en el tiempo de duplicación entre los niveles de este factor. De cualquier forma, un nivel bajo de concentración inicial de sustrato, tendría como consecuencia un menor tiempo de duplicación.

Por supuesto, no se puede despreciar el efecto de la interacción entre ambos factores (Figura 11). Este efecto de interacción se puede verificar por la prueba comparativa Tukey-Kramer entre los resultados promedio de los tratamientos (Tabla 21). Los tratamientos a 120 rpm no difieren estadísticamente y representan los menores tiempos de duplicación (junto con los tratamientos 4, 5 y 7). Los tratamientos más afectados por su parte, son aquellos realizados a un nivel alto de concentración inicial de sustrato (80 g/L), cuyos valores son altos y estadísticamente distintos a los mencionados anteriormente (tratamientos 6 y 9); entre ellos se encuentran las condiciones que no favorecieron el crecimiento celular, correspondientes al tratamiento 3.

A un nivel alto de concentración inicial de sustrato, de 80 g/L, se encuentra la concentración más alta de sustancias inhibitorias en el medio de fermentación (Tabla 14), los furfurales, los cuales son generados durante el proceso de hidrólisis (Fernández *et al.*, 2007). Dichas concentraciones podrían resultar letales en condiciones de poca difusión de sustrato, como ocurre con el tratamiento 3 (a 120 rpm), donde no hubo crecimiento celular. Diversos métodos de purificación de medios hidrolizados hemicelulósicos se han utilizado para disminuir la concentración de estos compuestos, lo que podría ayudar a mejorar la adaptación de la levadura a concentraciones altas de azúcares; la exposición

del medio a carbón activado o resinas de intercambio iónico, han presentado los mejores resultados (Nápoles *et al.*, 2006; Viñals *et al.*, 2006).

Otro factor a considerar, sería el estrés osmótico generado por la alta concentración de sustrato en el medio de fermentación. La represión catabólica (o por glucosa) es un fenómeno que ha sido identificado en muchos microorganismos, incluyendo las levaduras. De acuerdo con este aspecto, la transcripción de genes cuyos productos son esenciales para el catabolismo de fuentes de carbono, que son lentamente fermentables, es reprimida en presencia de una fuente de carbono que es consumida más rápido, como lo es la glucosa. Esto ocurre con genes involucrados en la respiración, gluconeogénesis, y la utilización de fuentes de carbono alternas, como lo es la xilosa. La consecuencia de este fenómeno, es la inhibición de producción de compuestos que son útiles para la regulación de la presión osmótica por parte de la levadura, disminuyendo así su actividad (Gancedo, 2008; Santagelo, 2006).

### **Capacidad productora de xilitol**

El análisis de varianza aplicado sobre la variable de respuesta, rendimiento producto-sustrato ( $Y_{p/s}$ ), determina que los principales efectos de los factores se deben al componente cuadrático de la concentración inicial de sustrato y a la interacción de éste con la agitación. (Tabla 19).

El efecto cuadrático del factor concentración inicial de sustrato se muestra claramente en la Figura 12, donde el punto máximo se encuentra muy cercano al nivel medio utilizado en el diseño experimental (50 g/L). A pesar de que el ANOVA indica que la agitación no es significativa, gráficamente se observa un efecto cuadrático de este factor, alcanzando un punto máximo también en su nivel medio (150 rpm).

El principal efecto encontrado fue el de la interacción de factores (Figura 13), donde a un nivel bajo de agitación, la variable de respuesta se beneficia de una concentración de sustrato inicial de entre 20 y 50 g/L; mientras tanto, a un nivel alto de agitación, se deberían manejar concentraciones entre los 50 y 80 g/L. Sin embargo, en el gráfico no se observa la tendencia a un nivel medio de agitación, donde, como se mencionó, se encontrarían las condiciones más favorables para el rendimiento.

Con la prueba estadística Tukey-Kramer, de la Tabla 21, se comprueba que las condiciones con un mayor valor promedio de rendimiento  $Y_{p/s}$  fueron aquellas con un nivel medio de concentración inicial de sustrato (50 g/L) y niveles bajo y medio de agitación

(120 y 180 rpm), correspondientes a los tratamientos 2 y 5. Estos tratamientos son estadísticamente distintos a los demás a un nivel de significancia de 0.05.

Por otro lado, se esperaría que hubiera mayor producción de xilitol utilizando niveles altos de concentración inicial de xilosa en el medio de fermentación. De tal forma, este factor tiene un efecto significativo en su componente lineal, como lo indica el análisis de varianza de la Tabla 20. A pesar de observarse un ligero efecto cuadrático de este factor (Figura 14), este resultó no ser significativo.

La agitación no es significativa de acuerdo al ANOVA, pero gráficamente se observa un ligero efecto cuadrático, donde se favorece la producción de xilitol a un nivel medio de dicho factor (Figura 14).

Los tratamientos con mayor producción de xilitol fueron aquellos realizados a un nivel alto de concentración inicial de sustrato, a excepción de aquel a un nivel bajo de agitación, donde no hubo producción (Tabla 21). El tratamiento 9 fue el que tuvo mayor producción de xilitol, pero no difirió estadísticamente con los tratamientos 2 y 6. Estos últimos a su vez no fueron estadísticamente distintos al tratamiento 5, encontrando valores de producción altos de xilitol a concentraciones iniciales de sustrato de 50 g/L.

No obstante el tratamiento con niveles altos de ambos factores fue el que tuvo una mayor producción de xilitol, se debe tener en cuenta el largo tiempo de fermentación necesario para alcanzar estas concentraciones. Por ello, es necesario asociar la producción de xilitol al rendimiento producto-sustrato.

Relacionando el rendimiento  $Y_{p/s}$  y la producción de xilitol, se puede determinar que los tratamientos que resultaron favorables para ambas variables fueron a un nivel medio de concentración inicial de sustrato (50 g/L) y niveles bajo y medio de agitación (120 y 180 rpm). La optimización realizada con el software comprueba que en valores cercanos a los niveles intermedios de ambos factores, concentración inicial de sustrato 51.43 g/L y agitación de 177 rpm, se obtendrían los rendimientos más altos.

Los rendimientos más altos obtenidos experimentalmente, correspondientes a los tratamientos 2 y 5, de 0.64 y 0.61 g de xilitol/g de xilosa, respectivamente, utilizando *C. magnoliae* en fermentación de medios hidrolizados de semilla de tamarindo, son similares al rendimiento reportado por Martínez *et al.* (2002) utilizando como sustrato hidrolizado de bagazo de caña, que fue de 0.63 g de xilitol/g de xilosa. Además, dichos rendimientos obtenidos en el presente estudio, son mayores a otros reportados utilizando diferentes fuentes de sustrato orgánicas por fermentación a nivel matraz: 0.55 g de xilitol/g de xilosa a partir de paja de arroz con *C. guilliermondii* (Silva y Roberto, 2001), 0.57 g de xilitol/g de

xilosa a partir de madera de eucalipto con *D. hansenii* (Diz *et al.*, 2002), e incluso a partir de un medio sintético de xilosa, de 0.57 g de xilitol/g de xilosa, con *C. magnoliae* (Wannawilai *et al.*, 2007).

Sin embargo, los rendimientos más altos obtenidos para hidrolizados de semilla de tamarindo a nivel matraz con *C. magnoliae*, son menores al obtenido por Kiyoshi *et al.* (2004) utilizando la misma levadura y siendo de 0.75 g de xilitol/g de xilosa, utilizando hidrolizado de mazorca de maíz como sustrato.

### **Producción de etanol, glicerol y biomasa**

Debido a la alta concentración de glucosa en el medio hidrolizado de semilla de tamarindo, el principal producto generado fue el etanol. Por ello, es de esperarse que a mayor disponibilidad de glucosa, mayor sea la producción de etanol (recordando que este compuesto también es resultado del metabolismo de la xilosa en las levaduras).

Los tratamientos que tuvieron una mayor producción de etanol fueron, por tanto, aquellos realizados a una de concentración inicial de sustrato de 80 g/L y niveles medio y alto de agitación (Tabla 21). El tratamiento 9 tuvo la mayor cantidad de etanol producida, pero no fue estadísticamente distinta del tratamiento 6, la cual a su vez, no mostró diferencia significativa respecto a los tratamientos 2 y 5, condiciones con un nivel medio de concentración inicial de sustrato.

Otro de los productos generados durante la fermentación de *C. magnoliae* en medios hidrolizados de semilla de tamarindo fue el glicerol. De acuerdo a la Tabla 21, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos, a excepción del 3, donde no hubo crecimiento celular. A pesar de que se muestran valores mayores para los tratamientos a un nivel alto de agitación, y niveles medio y alto de concentración inicial de sustrato, la prueba estadística Tukey-Kramer no mostró diferencia significativa respecto a los otros tratamientos.

Finalmente, tampoco existieron diferencias significativas en la producción de biomasa al finalizar la fermentación, como se muestra en la Tabla 21. Sólo uno de los tratamientos tuvo la mayor producción de biomasa, a un nivel medio de concentración inicial de sustrato, y alto de agitación, siendo distinto estadísticamente a todos los demás.

## 8.4 DISEÑO EXPERIMENTAL NIVEL BIORREACTOR

### Crecimiento celular

*C. magnoliae*, no mostró una inhibición letal debida a las condiciones de los diferentes tratamientos del diseño experimental; sin embargo, si existieron diferencias en su crecimiento, donde los tiempos en alcanzar la fase estacionaria fueron diferentes. Los tratamientos a un nivel alto de agitación, de 200 rpm, tuvieron reducidos tiempos de fase exponencial, al igual que el tratamiento 3 (1 vvm, 100 rpm), fue 12 h, y se esperaría que estos fueran los tratamientos con una mejor adaptación de la levadura al medio de fermentación.

En los niveles altos de ambos factores, aireación y agitación, se encontraron los menores tiempos de duplicación, de acuerdo a la Figura 23. No obstante, el principal efecto de los factores sobre esta variable de respuesta se debió a la interacción de los factores, mostrándose significativo por análisis de varianza. Así, los menores tiempos de duplicación se encuentran tanto a un nivel bajo de agitación (100 rpm) y alto de aireación (1 vvm), como a un nivel alto de agitación (200 rpm) y bajo de aireación (0.1 vvm), como se muestra en la Figura 24.

Los tiempos de duplicación de estos tratamientos (2 y 3), fueron los que resultaron ser estadísticamente menores de acuerdo a la prueba estadística Tukey-Kramer (Tabla 29). El tratamiento más afectado por las condiciones a las que se llevaron los ensayos, fue a los niveles bajos de ambos factores (0.1 vvm, 100 rpm), donde se tuvo un tiempo de fase exponencial de 24 h.

El consumo de oxígeno disuelto en el medio de fermentación fue acelerado durante las primeras horas de fermentación (Figura 18) en todos los casos, por lo que se sugiere que está directamente relacionado con el crecimiento de la levadura en el medio. El consumo de oxígeno durante la fase estacionaria de *C. magnoliae*, se mantuvo en un valor máximo, hasta que se observó un decaimiento después de las 48 h, tiempo en el cual comenzó la mayor producción de xilitol.

### Capacidad productora de xilitol

Aunque no se demostró un efecto significativo de los factores principales sobre el rendimiento producto-sustrato ( $Y_{p/s}$ ), se pueden observar ligeros efectos lineales de ambos factores en la Figura 25. De esta forma, se esperaría un mayor rendimiento a niveles bajos tanto de agitación (100 rpm) como de aireación (0.1 vvm).

La interacción de los factores, resultó tener un fuerte impacto sobre el rendimiento producto-sustrato, siendo significativo de acuerdo al análisis de varianza. Dicha variable de respuesta se vio afectada cuando se utilizó un nivel alto de aireación (1 vvm). El mayor efecto de interacción se encuentra a un nivel bajo de este factor (0.1 vvm), donde a un nivel alto de agitación (200 rpm) se obtuvieron los menores rendimientos (Figura 26). Como era de esperarse, a un nivel bajo de agitación (100 rpm), para aireación de 0.1 vvm, el rendimiento aumentó considerablemente, y es en este punto donde se obtuvieron los mejores resultados acorde al diseño experimental.

El valor obtenido a dicha condición (0.7092 g de xilitol/g de xilosa) es estadísticamente mayor que el de los otros tratamientos del diseño experimental, por la prueba Tukey-Kramer. Aunque no se esperaba un elevado rendimiento en el tratamiento 1, a 200 rpm y 1 vvm, resultó ser el segundo más alto. Este aspecto retoma importancia más adelante cuando se discute la producción de xilitol (Tabla 29).

La presencia de oxígeno es uno de los factores de estudio que más afectan la producción de xilitol en un sistema fermentativo. Metabólicamente, bajo condiciones limitadas de oxígeno, se produce una acumulación de NADH generado durante la oxidación de xilitol a xilulosa, limitando dicha reacción, con la consecuente acumulación de xilitol (Deok-Kun *et al.*, 1997).

Fue precisamente la aireación la que tuvo un efecto significativo sobre la producción máxima de xilitol alcanzada al final de la fermentación. Sin embargo, el efecto de este factor no fue el que se esperaba, sino el opuesto. La producción de xilitol se vio afectada a un nivel bajo de 0.1 vvm, mientras se benefició a 1 vvm (Figura 27).

Se ha reportado que el metabolismo de la xilosa, en levaduras como *C. magnoliae*, no parece estar limitado por su transporte del medio extracelular al citoplasma. No obstante, el transporte de xilosa a través de la membrana celular puede limitar la utilización de la xilosa bajo condiciones aeróbicas y semianaeróbicas (Winkelhausen *et al.*, 2004)

En condiciones limitadas de oxígeno, encontrándose como único sustrato xilosa, ésta es reducida a xilitol, pero no puede oxidarse a xilulosa con el fin de incorporarse a la vía de las pentosas fosfato, cuyo fin es la generación de piruvato (Figura 5). Además de la acumulación de xilitol y NADH, esto se traduce en la nula producción de ATP, por la inhibición de la cadena de respiración, que es de vital importancia en el transporte del monosacárido (xilosa) del medio extracelular al citoplasma de la levadura (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2001). Por tanto, son necesarias condiciones semianaeróbicas para la producción de xilitol, encontrando un mayor equilibrio, en nuestro estudio, a una aireación de 1 vvm.

Aunque no tuvo un efecto significativo sobre la variable de respuesta, se puede observar un ligero efecto de la agitación, que podría beneficiar la producción de xilitol a niveles bajos. Aumentar el rango de prueba de este factor podría contribuir a distinguir si existe efecto significativo. Comparando los efectos de interacción, se observa nuevamente una mayor producción de xilitol a un nivel bajo de agitación (Figura 28).

No obstante el tratamiento 3 fue el que tuvo la mayor de producción de xilitol, este no difirió estadísticamente de los demás tratamientos del diseño experimental, comparados por la prueba Tukey-Kramer, probablemente debido a la variabilidad de los resultados obtenidos en el duplicado del ensayo de fermentación.

Como se mencionó, el rendimiento más alto alcanzado en los ensayos a nivel biorreactor con *C. magnoliae* en fermentación de medios hidrolizados de semilla de tamarindo, fue en los niveles bajos de agitación (100 rpm) y aireación (0.1 vvm), siendo de 0.71 g de xilitol/g de xilosa. Este es mucho mayor que el obtenido por Wannawilai *et al.* (2007) que utilizaron la misma levadura en biorreactor (volumen de fermentación de 1 L), en fermentación de medio sintético de xilosa, el cual fue de 0.39 g de xilitol/g de xilosa; además, también es mayor al obtenido por Furlan y de Castro (2001) utilizando *C. parapsilosis* en fermentación a nivel biorreactor de medio sintético mixto xilosa-glucosa, que fue de 0.63 g de xilitol/g de xilosa. Estos resultados hacen destacar al hidrolizado de semilla de tamarindo como una buena fuente de sustrato para la producción de xilitol.

Uno de los rendimientos más altos obtenidos a nivel biorreactor para la producción de xilitol, fue el de Ojamo *et al.* (1994) que fue de 0.78 g de xilitol/g de xilosa en fermentación de medio sintético de xilosa, utilizando *C. guilliermondii* (Tabla 4). También se han reportado altos rendimientos a partir de la fermentación de diferentes fuentes de hidrolizados hemicelulósicos utilizando *C. guilliermondii* a nivel biorreactor: Roberto *et al.* (1999) alcanzaron un rendimiento de 0.73 g de xilitol/g de xilosa, utilizando como sustrato medio hidrolizado de paja de arroz; por su parte, Acosta *et al.* (2005) reportaron un rendimiento de 0.75 g de xilitol/g de xilosa por fermentación de hidrolizado de bagazo de caña. El rendimiento alcanzado en nuestro estudio, no difiere mucho de los reportes antes mencionados con una levadura ampliamente utilizada en la obtención de xilitol, *C. guilliermondii*, a nivel biorreactor, postulando a *C. magnoliae* como una levadura con rendimientos aceptables en la producción de xilitol.

### **Producción de etanol, glicerol y biomasa**

Según las tendencias observadas en la Figura 20, la mayor producción de etanol en todos los tratamientos del diseño experimental sucedió en las primeras horas de fermentación. Después de la generación de producto (a partir de las 24 h aproximadamente), la producción fue constante, por lo que no se observaron grandes variaciones en la concentración de etanol hasta el final de la fermentación en la mayoría de los tratamientos; sólo en el tratamiento 4, en los niveles centrales de los factores (0.55 vvm, 150 rpm), se observó una disminución en la concentración de producto después de alcanzar un punto máximo en las 24 h (Figura 20B).

Dicha tendencia en todos los tratamientos, sugiere que la producción de etanol está ligada principalmente a la fase de crecimiento exponencial de la levadura y, por tanto, al consumo de glucosa en el medio de fermentación.

El consumo de xilosa y producción de xilitol durante la fase estacionaria limitan la producción de etanol, razón por la cual la concentración de dicho producto se mantiene constante durante dicha etapa de crecimiento de *C. magnoliae*. En efecto, en el tratamiento 5 (0.1 vvm, 100 rpm), donde la producción de etanol fue alta (Figura 20A), se tuvo baja producción de xilitol (Figura 22A) si se compara con el tratamiento 3 (1 vvm, 100 rpm), donde las condiciones del tratamiento beneficiaron la producción de xilitol y perjudicaron la de etanol.

Fue en los niveles bajos de ambos factores (tratamiento 5) donde se dio la mayor producción de etanol, de acuerdo al análisis estadístico con la prueba Tukey-Kramer (Tabla 29). Los demás tratamientos tuvieron una producción menor de etanol al finalizar la fermentación, y no difieren estadísticamente a un nivel de confianza del 95%.

En cuanto a la producción de glicerol, a niveles bajos de aireación (tratamiento 2 y 5) se obtuvo la mayor concentración de tal producto (Tabla 29). El tratamiento 5, a su vez, no difiere estadísticamente a la producción del glicerol respecto a los tratamientos restantes, según la prueba Tukey-Kramer. Sin embargo, estos resultados representan las concentraciones máximas de glicerol durante la fermentación, donde no se observan tendencias específicas (datos no mostrados), por lo que es complicado predecir el comportamiento de la levadura respecto a la generación de este producto.

La generación de biomasa, por su parte, fue estadísticamente similar independientemente del nivel de los factores al que se llevaron a cabo los ensayos de fermentación del diseño experimental.

## 9. CONCLUSIONES

Se encontraron ligeras diferencias en la composición de la semilla de tamarindo utilizada en el presente estudio, respecto a las reportadas por otros autores. Los componentes mayoritarios en la semilla de tamarindo fueron los carbohidratos.

Se obtuvieron concentraciones significativas de azúcares fermentables (49.27 g/L de glucosa y 14.56 g/L de xilosa) por hidrólisis de la semilla de tamarindo, las cuales resultaron ser mayores a las reportadas para hidrolizados preparados a partir de otras fuentes orgánicas. La semilla de tamarindo, un residuo orgánico producto de la actividad agroindustrial, se postula como una importante fuente de sustrato para la obtención de productos de interés como lo son etanol y xilitol.

Sin duda, los factores elegidos para ser estudiados, tanto en el diseño experimental a nivel matraz (agitación y concentración de sustrato) como en biorreactor (agitación y aireación), tuvieron una influencia significativa sobre la producción de xilitol por fermentación del medio hidrolizado de semilla de tamarindo con *C. magnoliae*.

*C. magnoliae* tuvo reducidos tiempos de duplicación en la mayoría de los tratamientos del diseño experimental a nivel matraz, principalmente aquellos a un nivel bajo de agitación (120 rpm). Una concentración alta de sustrato afectó considerablemente el crecimiento y productividad de la levadura en fermentación de medios hidrolizados de semilla de tamarindo, debido ya sea al alto contenido de compuestos inhibitorios a dicha concentración, o a la misma presión osmótica que este azúcar ejerce sobre la levadura.

De acuerdo al análisis estadístico del diseño experimental factorial  $3^2$ , para los factores estudiados, las condiciones óptimas para la productividad de xilitol, dan como resultado un rendimiento producto-sustrato de 0.5653 g de xilitol/g de xilosa, a una concentración inicial de sustrato de 51.43 g/L y agitación de 177 rpm.

No existió inhibición en el crecimiento de la levadura a las condiciones a las cuales se llevaron a cabo los tratamientos del diseño experimental a nivel biorreactor  $2^2$  con un punto central. El efecto de cada factor fue bajo, prevaleciendo la interacción entre ambos sobre el crecimiento de la levadura. La mayor adaptación (menor tiempo de duplicación) se observó a una agitación de 100 rpm y una aireación de 1 vvm.

Los factores principales tampoco afectaron el rendimiento producto-sustrato, pero sí la interacción entre ambos. El mayor rendimiento alcanzado se obtuvo en los niveles bajos de ambos, a 100 rpm y 0.1 vvm, siendo de 0.71 g de xilitol/g de xilosa.

El rendimiento más alto alcanzado a nivel matraz (0.63 g de xilitol/g de xilosa), fue mayor a los rendimientos alcanzados por otros autores a partir de hidrolizados

hemicelulósicos de diversas fuentes orgánicas. Por su parte, el rendimiento mencionado anteriormente a nivel biorreactor, es alto y similar, en algunos casos, a lo reportado por algunos autores.

De esta manera, *C. magnoliae*, una levadura de la cual existen pocos reportes de su uso en la producción de xilitol, se postula como un microorganismo con alta productividad y rendimiento para la obtención de este metabolito de interés, debido a su buen nivel de adaptación a un medio preparado a partir de la hidrólisis de la semilla de tamarindo.

La producción de xilitol por síntesis biotecnológica es una alternativa de alto interés sobre la generación de este compuesto por hidrogenación catalítica, ya que es un proceso sustentable, que permitiría el aprovechamiento de residuos orgánicos, como la semilla de tamarindo, y que además, como se demostró en el presente trabajo, a partir del estudio de factores que afectan la obtención de este metabolito, podría ser mejorado, obteniendo mayores rendimientos, mediante fermentación con levaduras productoras, como *C. magnoliae*.

## 10. REFERENCIAS CONSULTADAS

- Acosta E.**, Batista de A. J., Giulietti M., Frade J. A., Nápoles A. I., Manganelly E. 2005. *Producción de Xilitol en Fermentador de 15 Litros*. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar [en línea], Vol. 39. Disponible en Internet: <http://www.redalyc.org/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=223120688008>
- Ahmed Z.** 2001. *Production of Natural and Rare Pentoses Using Microorganisms and Their Enzymes*. Electronic Journal of Biotechnology. Vol. 4, No. 2. 1-9.
- Almeida J. R.**, Modig T., Petersson A., Hähn-Hägerdal B., Lidén G., Gorwa-Grauslund M. F. 2007. *Increased Tolerance and Conversion of Inhibitors in Lignocellulosic Hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae**. Journal of Chemical Technology. Vol. 82. 340-349.
- Arrizon J.**, Mateos J. C., Sandoval G., Aguilar B., Solís J., Aguilar M. G. 2011. *Bioethanol and Xilytol Production from Different Lignocellulosic Hydrolysates by Secquential Fermentation*. Journal of Food Process Engineering. Vol. 35. 437-454.
- Bahador A.**, Lesan S., Kashi N. 2012. *Effect of Xylitol on Cariogenic and Beneficial Oral Streptococci: a Randomized, Double-Blind Crossover Trial*. Iranian Journal of Microbiology. Vol. 4, No. 2. 75-81.
- Boris U. S.**, Mary Ann F., Arjun S., Min Z. 2003. *D-Xylose Transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus**. Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 106, No. 1. 255-263.
- Carvalho W.**, Canilha L, Silvério da S. S. 2007. *Semi-continous Xylitol Bioproduction in Sugarcane Bagasse Hydrolysate: Effect of Nutritional Supplementation*. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 43, No. 1. 47-53.
- Davies S. M.**, Linforth R. S., Wilkinson S. J., Smart K. A., Cook D. J. 2011. *Rapid Analysis of Formic Acid, Acetic Acid, and Furfural in Pretreated Wheat Straw Hydrolysates and Ethanol in a Bioethanol Fermentation Using Atmospheric Pressure Chemical Ionisation Mass Spectrometry*. Biotechnology for Biofuels. Vol. 4, No. 28. 1-8.
- Deok-Kun Oh**, Sang-Yong K., Jung-Hoe K. 1997. *Increase of Xylitol Production Rate by Controlling Redox Potential in *Candida parapsilosis**. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 58, No. 4. 440-444.
- Diz J.**, Cruz J. M., Domínguez H., Parajó J. C. 2002. *Xylitol Production from Eucalyptus Woos Hydrolysates in Low-Cost Fermentation Media*. Food Technology and Biotechnology. Vol. 40, No. 3. 191-197.

- Does A. L. y Bisson L. F.** 1989. *Characterization of Xylose Uptake in the Yeasts Pichia heedii and Pichia stipitis*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 55, No. 1. 159-164.
- El-Batal A. I. y Khalaf S. A.** 2004. *Xylitol Production from Corn Cobs Hemicellulosic Hydrolysate by Candida tropicalis Immobilized Cells in Hydrogel Copolymer Carrier*. International Journal of Agriculture & Biology. Vol. 6, No. 6. 1066-1073.
- El-Siddig K., Gunasena H. P. M., Prasad B. A., Pushpakumara D. K. N. G., Ramana K. V. R., Vijayanand P., Williams J. T.** 2006. *Tamarind Tamarindus indica L.* Southampton Centre for Underutilised Crops, Southampton, UK.
- Faustino P. A. F., Cruvinel da S. T., Caldana M. de L., Moreira M. M. A. de A., Rabelo B. M. A.** 2009. *Use of Xylitol for Prevention of Acute Otitis Media*. International Archives of Otorhinolaryngology. Vol. 13, No. 1. 87-92.
- Fernández T.; Martin, C.; Marcet, M.; Thomsen, A. B.** 2007. *Fermentabilidad de Prehidrolizados de Residuos Lignocelulósicos para la Producción de Etanol*. Valoración de Residuos, Ingeniería Química. Vol. 455. 190-197.
- Fry S., York W., Albersheim P.** 1993. *An Unambiguous Nomenclature for Xyloglucan-derived Oligosaccharides*. Plant Physiology. Vol. 89, No. 1. 1-3.
- Fundación Michoacán Produce.** 2008. *Diagnóstico, Análisis y Diseño Estratégico Para el Desarrollo Del Sector Orgánico De Michoacán*. BioNexos, A. C.
- Furlan S. A. y de Castro H. F.** 2001. *Xylitol Production by Candida parapsilosis under Fed-Batch Culture*. Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol. 44, No. 2. 125-128.
- Gancedo J. M.** 2008. *The Early Steps of Glucose Signalling in Yeast*. FEMS Microbiology Reviews. Vol. 32, No. 4. 673-704.
- Ghindea R., Csutak O., Stoica I., Tanase A. M., Vassu T.** 2010. *Production of Xylitol by Yeasts*. Romanian Biotechnological Letters, Vol. 15 No. 3. 5217-5222.
- González-Hernández J. C., Jiménez-Estrada M., Peña A.** 2005. *Comparative Analysis of Trehalose Production by Debaryomyces hansenii and Saccharomyces cerevisiae Under Saline Stress*. Extremophiles. Vol. 9, No. 1. 7-16.
- González-Hernández J. C., Farías R. L., Vera V. J. C., Martínez C. R., Alvarez-Navarrete M., Zamudio J. M. A., Chávez P. M. C., Peña A.** 2012. *Chemical Hydrolysis of the Polysaccharides of the Tamarind Seed*. Journal of the Mexican Chemical Society. Vol. 56, No. 4. 395-401.

- Granström T.** 2002. *Biotechnological Production of Xylitol With Candida Yeasts*. Helsinki University of Technology, Department of Chemical Technology. Technical Report 2.
- Guo C., Zhao C., He P., Lu D., Shen A., Jiang N.** 2006. *Screening and Characterization of Yeasts for Xylitol Production*. Journal of Applied Microbiology. Vol. 101, No. 1. 1096-1104.
- Hahn-Hägerdal B., Fredrik W. C., Gárdonyi M., H. van Zyl W., Cordero O. R. R., Jönsson L. J.** 2001. *Metabolic Engineering of Saccharomyces cerevisiae for Xylose Utilization*. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol. 73. 53-84.
- Herazo I. C., Ruiz D., Arrazola G. S.** 2009. *Bioconversión de Xilosa a Xilitol por Candida guilliermondii empleando cascarilla de arroz (Oriza sativa)*. Revista de Temas Agrarios. Vol. 14, No. 2. 1-18.
- Kadam K. L., Chin C. Y., Brown L. W.** 2008. *Flexible Biorefinery for Producing Fermentation Sugars, Lignin and Pulp from Corn Stover*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. Vol. 35, No. 5. 331-341.
- Kaur G., Nagpal A., Kaur B.** 2006. *Tamarind*. Science Tech Entrepreneur, c/o Shri. I.S. Sandhu (Comdt BSF Retd.). House No. 1, Bye-Pass, Amritsar Road, Tarn Taran. Dist.: Tarntaran, Punjab.
- Kiyoshi T., Jun-Ichi H., Tohru K., Masayoshi K.** 2004. *Microbial Xylitol Production from Corn Cobs Using Candida magnoliae*. Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 98, No. 3. 228-230.
- Kumar C. S. y Bhattacharya S.** 2008. *Tamarind Seed: Properties, Processing and Utilization*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Vol. 48. 1–20.
- Larosa R.**, 2002. [On-line]. Disponible:  
[http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/biodie\\_lab/xilitol.htm](http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/biodie_lab/xilitol.htm).  
Consultada: 20 de Junio de 2011.
- Latina C. F., Rubio M. C., Navarro A. R.** 2006. *Producción de Xilitol a Partir de Xilosa Extraída del Hidrolizado de Marlo de Maíz*. Instituto de Biotecnología – Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán. Tucumán, Argentina. Reporte Técnico.
- Martínez A., Rodríguez M. E., York S. W., Preston J. F., Ingram L. O.** 2000. *Use of UV Absorbance to Monitor Furans in Dilute Acid Hydrolysates of Biomass*. Biotechnology Progress. Vol. 16, No. 4. 637-641.

- Martínez E. A.**, Villarreal L. M., Almeida e Silva J. B., Solenzal A. I. N., Canilha L., Mussatto S. I. 2002. *Uso de las Diferentes Materias Primas para la Producción Biotecnológica de Xilitol*. Ciencia y Tecnología Alimentaria. Vol. 3, No. 5. 295-301.
- Meinander N. Q.**, Boels I., Hahn-Hägerdal B. 1999. *Fermentation of Xylose/Glucose Mixtures by Metabolically Engineered Saccharomyces cerevisiae Strains Expressing XYL1 and XYL2 from Pichia stipitis With and Without Overexpression of TAL1*. Bioresource Technology. Vol. 68, No. 1. 79-87.
- Modig T.** 2001. *Kinetics and Inhibition of Furfural and Hydroxymethyl Furfural on Enzymes in Yeast*. Department of Chemical Engineering II.
- Mushtaq Z.**, Salim-ur-Rehman, Zahoor T., Jamil A. 2010. *Impact of Xylitol Replacement on Physicochemical Sensory and Microbial Quality of Cookies*. Pakistan Journal of Nutrition. Vol. 9, No. 6. 605-610.
- Nápoles A. I. S.**; Ortiz, Y. A.; Viñals, M. V.; Manganelly, E. S.; Acosta E. M. 2006. *Purificación de Hidrolizado de Bagazo de Caña de Azúcar con Carbón Activado y Resinas de Intercambio Iónico*. Ciencia y Tecnología Alimentaria. Vol. 5, No. 2. 124-128.
- Ojamo H.** 1994. *Yeast Xylose Metabolism and Xylitol Production*. Tesis para obtener el grado de Doctor, Universidad de Tecnología de Helsinki, Finlandia.
- Palmqvist E.** y **Hahn-Hägerdal B.** 2000. *Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates. II: Inhibitors and Mechanisms of Inhibition*. Bioresource Technology. Vol. 74, No. 1. 25-33.
- Parrota J. A.** 1990. *Tamarindus indica L. Tamarind*. SO-ITF-SM-30. New Orleans, LA: U. S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 5 p.
- Prakasham R. S.**, Rao R. S., Hobbs P. J. 2009. *Current Trends in Biotechnological Production of Xylitol*. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy. Vol. 3, No. 1. 8-36.
- Rao Y. S.** y **Mathew K. M.** 2001. *Tamarind*. Handbook of Herbs and Species, Cap. 25. Woodhead Publishing Limited. England.
- Roberto I. C.**, de Mancilha I. M., Sato S. 1999. *Influence of  $kLa$  on Bioconversion of Rice Straw Hemicellulose Hydrolysate to Xylitol*. Bioprocess Engineering. Vol. 21, No. 6. 505-508.
- Santagelo G. M.** 2006. *Glucose Signaling in Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 70, No. 1. 253-282.

- Santos** J. C., **Carvalho** W., **Silva** S. S., **Converti** A. 2003. *Xylitol Production from Sugarcane Bagasse Hydrolyzate in Fluidized Bed Reactor. Effect of Air Flowrate*. Biotechnology Progress. Vol. 19, No. 4. 1210-1215.
- Silva** C. J. S. M. y **Roberto** I. C. 2001. *Improvement of Xylitol Production by Candida guilliermondii FTI 20037 Previously Adapted to Rice Straw Hemicellulosic Hydrolysate*. Letters in Applied Microbiology, Vol. 32, No. 4. 248-252.
- Silva** D. D. V., **Felipe** M. G. A., **Mancilha** I. M., **Luchese** R. H., **Silva** S. S. 2004. *Inhibitory Effect of Acetic Acid in Bioconversion of Xylose in Xylitol by Candida guilliermondii in Sugarcane Bagasse Hydrolysate*. Brazilian Journal of Microbiology. Vol. 35, No. 3. 248-254.
- Silva** E. R. y **Lucatero** C. S. E. 2006. *Diagnóstico de la Cadena del Sistema Producto Tamarindo (Tamarindos indica L.) en el Estado de Colima*. Consejo Estatal de Productores de Tamarindo del Estado de Colima, A. C. Universidad de Colima.
- Skoog** K. y **Hahn-Hägerdal** B. 1990. *Effect of Oxygenation on Xylose Fermentation by Pichia stipitis*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 56, No. 11. 3389-3394.
- Solange** I. M. e **Inês** C. R. 2005. *Acid Hydrolysis and Fermentation of Brewer's Spent Grain to Produce Xylitol*. Journal of the Science of Food and Agriculture. Vol. 85, No. 14. 2453-2460.
- Sone** Y. y **Sato** K. 1994. *Measurement of Oligosaccharide Derived from Tamarind Xyloglucan by Competitive ELISA Assay*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. Vol. 58, No. 12. 2295-2296
- Srivani** K. y **Pydi** S Y. 2011. *Effect of Yeast Extract Concentration on Microbial Production of Xylitol*. International Journal of Biotechnology Applications. Vol. 3, No. 3. 110-113.
- Taherzadeh** M. J., **Gustafsson** J. L. **Niklasson** C., **Liden** G. 2000. *Physiological Effects of 5-Hydroxymethylfurfural on Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 53, No. 6. 701-708.
- Vandeska** E., **Amartey** S., **Kuzmanova** S., **Jeffries** T. 1995. *Effects of Environmental Conditions in Production of Xylitol by Candida boidinii*. World Journal of Microbiology & Biotechnology. Vol. 11, No. 2. 213-218.
- Vanegas** I. A., **Yepes** M. S., **Ruiz** O. S. 2004. *Producción de Xilitol a Partir de Levaduras Nativas Colombianas*. Revista Colombiana de Biotecnología. Vol. 6, No.2. 31-36.
- Vargas** B. G. J. y **Pereira** Jr. N. 2010. *Sugar Cane Bagasse as Feedstock for Second Generation Ethanol Production. Part II: Hemicellulose Hydrolysate Fermentability*. Electronic Journal of Biotechnology. Vol. 13, No. 5. 1-11.

- Villalba** C. M., Vélez U. T., Arias Z. M., Arrázola P. G. 2009. *Producción de Xilitol a partir de Cascarilla de Arroz utilizando Candida guilliermondii*. Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín. Vol. 62, No. 1. 4897-4905.
- Viñals** V. M., Maciel de M. I., Batista de A. e S. J., Nápoles S. A. I. 2006. *Métodos de Purificación de Hidrolizados de Bagazo de Caña de Azúcar para la Obtención de Xilitol*. Ciencia y Tecnología Alimentaria. Vol. 5, No. 2. 129-134.
- Virgínio** da S. D. D., Maciel de M. I., Silvério da S. S., Gracias de A. A. M. 2007. *Improvement of Biotechnological Xylitol Production by Glucose During Cultive of Candida guilliermondii in Sugarcane Bagasse Hydrolysate*. Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol. 50, No. 2. 207-215.
- Wannawilai** S., Sirisansaneeyakul S., Vanichsiratana W., Prakulsuksatid P. 2007. *Optimization for the Production of Xylitol Using Candida magnoliae* TISTR 5663. TSB: A Solution to the Global Economic Crisis.
- Weusthuis** R. A., Pronk J. T., van den Broek P. J., van Dijken J. P. 1994. *Chemostat Cultivation as a Tool for Studies on Sugar Transport in Yeasts*. Microbiological Reviews. Vol. 58, No. 4. 616-630.
- Winkelhausen** E., Amartey S. A., Kuzmanova S. 2004. *Xylitol Production from D-Xylose at Different Oxygen Transfer Coefficients in a Batch Bioreactor*. Engineering in Life Sciences. Vol. 4, No. 2. 150-154.
- Xi** C., Zi-Hua J., Sanfeng C., Wensheng Q. 2010. *Microbial and Bioconversion Production of D-Xylitol and Its Detection and Application*. International Journal of Biological Sciences. Vol. 6, No. 7. 834-844.

## 11. ANEXOS

### 11.1 SELECCIÓN DE LA LEVADURA UTILIZADA EN LOS DISEÑOS EXPERIMENTALES

Con el fin de elegir una levadura con alta adaptación se realizaron fermentaciones preliminares a nivel matraz. Las levaduras comparadas fueron: *C. guilliermondii*, *C. magnoliae* y *D. hansenii*.

Las fermentaciones preliminares se efectuaron de acuerdo a las estrategias experimentales descritas en el apartado 6 de este trabajo. Se prepararon los medios hidrolizados de semilla de tamarindo de acuerdo a las condiciones de tratamiento ácido y térmico. La concentración de azúcares reductores iniciales se ajustó a 50 g/L. La composición del hidrolizado obtenido se muestra en la Tabla 30, condiciones de sustrato inicial para las levaduras.

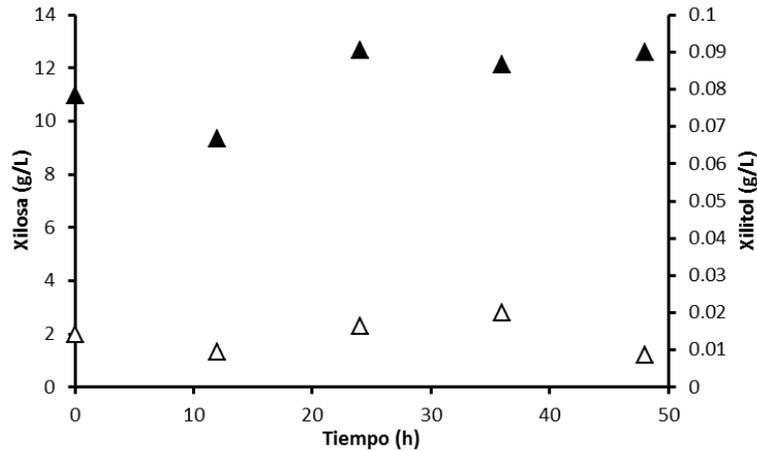
Las tres se incubaron en el medio de fermentación a 180 rpm y temperatura de 30°C, durante un tiempo total de 92 h. Los resultados fueron analizados estadísticamente, a fin de determinar la levadura que alcanzara mayores rendimientos producto-sustrato y productividad del metabolito esperado, xilitol.

**Tabla 30. Composición del hidrolizado de semilla de tamarindo para fermentaciones preliminares**

Medio	Concentración de azúcares reductores (g/L)	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)
Hidrolizado	86.15	33.53	21.28
Hidrolizado diluido	51.65	18.23	12.84

#### ***Debaryomyces hansenii***

A pesar de que se ha reportado el uso de *D. hansenii* en la obtención de xilitol a partir de hidrolizados hemicelulósicos, esta levadura no logró una adaptación al medio hidrolizado de semilla de tamarindo, traducido en un nulo consumo de glucosa (Figura 32) y xilosa (Figura 29).



**Figura 29.** Consumo de xilosa (▲), y producción de xilitol (△), con *D. hansenii*. Gráfico representativo para n=2.

### ***Candida guilliermondii***

Contrario a lo ocurrido con *D. hansenii*, *C. guilliermondii* si se adaptó al medio hidrolizado de semilla de tamarindo. La fase estacionaria se alcanzó prácticamente después de 16 h de fermentación transcurridas (Figura 30A). El tiempo de duplicación obtenido para esta levadura se muestra en la Tabla 31. Aunado a ello, hubo una producción de biomasa, que asegura el crecimiento celular de *C. guilliermondii* en los medios hidrolizados de semilla de tamarindo, como lo indica la Figura 30B, alcanzando un valor final de aproximadamente 4 g/L de células (valor en peso seco). El pH se redujo durante las primeras horas de la fermentación, hasta alcanzar un valor aproximado a 5.1, después del cual se mantuvo constante (Figura 30C).

Sin embargo, el consumo del sustrato glucosa fue muy lento, lo que tuvo una consecuente en el consumo de xilosa, del cual sólo consumió el 23.67 %. La máxima concentración de producto, xilitol, se alcanzó transcurridas las 92 h, con una concentración de 0.41 g/L, resultando en un bajo rendimiento producto-sustrato ( $Y_{p/s}$ ) de 0.14 g/g. El consumo de glucosa por parte de *C. guilliermondii* se observa en la Figura 32, mientras el consumo de xilosa y producción de xilitol en la Figura 31.

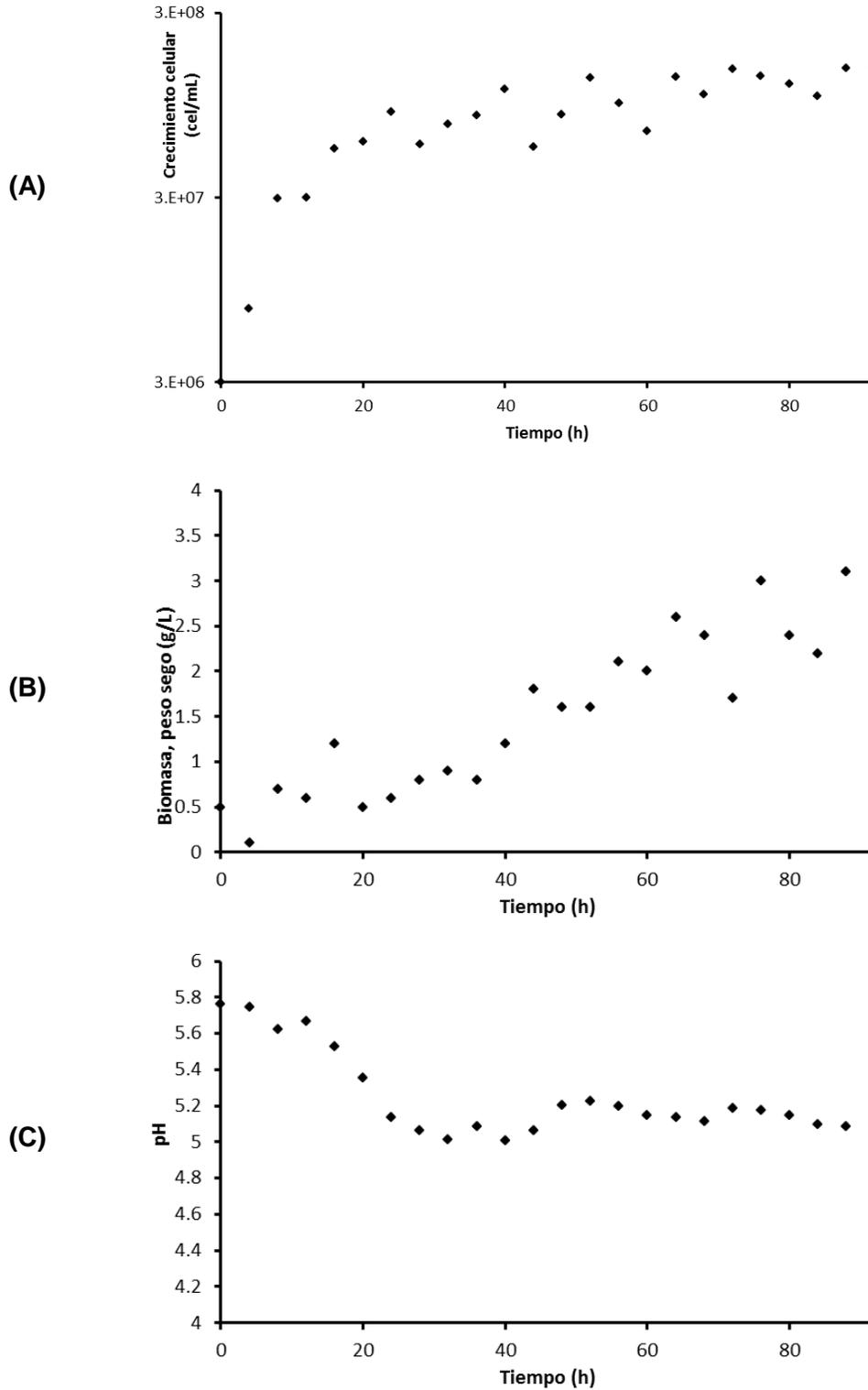


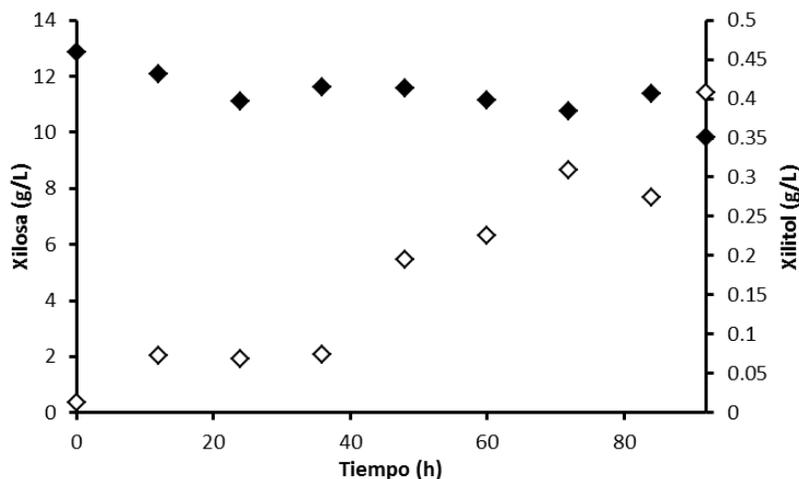
Figura 30. Crecimiento celular (A), producción de biomasa (B) y comportamiento del pH (C) durante la fermentación de *C. guilliermondii*. Las gráficas son representativas para n=2

El rendimiento máximo alcanzado por *C. guilliermondii* se dio transcurridas las 48 h de fermentación, alcanzando un rendimiento  $Y_{p/s}$  de 0.20 g de xilitol/g de xilosa, y un rendimiento de concentración celular con respecto a sustrato  $Y_{x/s}$  de 0.61g de biomasa/g de xilosa (Tabla 31).

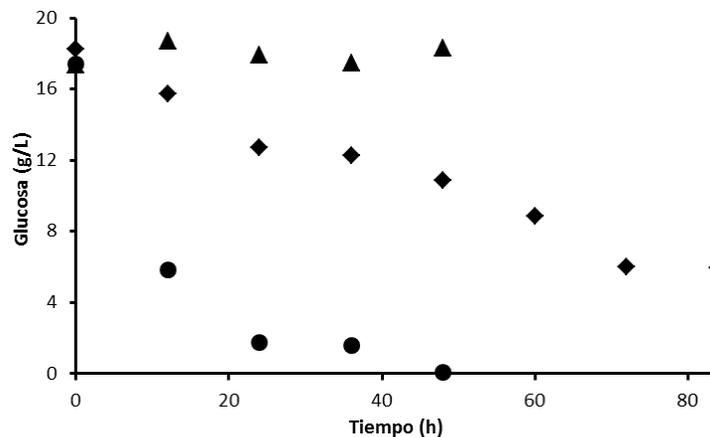
**Tabla 31. Comparación de medias por la prueba t de Student para los parámetros en la hora 48 de las fermentaciones preliminares**

Levadura	Tiempo de duplicación (h)	Productividad (g/Lh)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$Y_{x/s}$ (g/g)	Consumo Xilosa (%)
<i>Candida guilliermondii</i>	3.96 <sup>A</sup>	0.005 <sup>A</sup>	0.1961 <sup>A</sup>	0.6057 <sup>A</sup>	10 <sup>A</sup>
<i>Candida magnoliae</i>	1.87 <sup>B</sup>	0.056 <sup>B</sup>	0.5903 <sup>B</sup>	0.6866 <sup>A</sup>	36.08 <sup>B</sup>

Las medias seguidas de la misma letra no difieren entre sí a un nivel de significancia  $\alpha=0.05$ . Tabla representativa para n=2



**Figura 31. Consumo de xilosa (♦), y producción de xilitol (◇), con *C. guilliermondii*.** Gráfico representativo para n=2.



**Figura 32. Consumo de glucosa durante las fermentaciones en el medio hidrolizado de semilla de tamarindo.** (◆) *Candida guilliermondii*; (●) *Candida magnoliae*; (▲) *Debaryomyces hansenii*

### ***Candida magnoliae***

*C. magnoliae*, fue la levadura que mejor se adaptó al hidrolizado de semilla de tamarindo. La fase exponencial duró un reducido intervalo de tiempo, ya que se alcanzó la fase estacionaria a las 12 h, aproximadamente (Figura 33A), y teniendo un tiempo de duplicación menor con respecto al obtenido con *C. guilliermondii* (Tabla 31). También existió una constante producción de biomasa, como se observa en la Figura 33B, alcanzando un máximo de 6 g/L al final de la fermentación. Este valor fue mayor al generado por *C. guilliermondii*. El comportamiento de pH fue similar al de esta levadura, disminuyendo hasta 5.1 y manteniéndose constante durante la fermentación (Figura 33C). La reducción durante las primeras horas puede deberse a compuestos producidos por las células durante su fase exponencial.

El consumo del sustrato glucosa fue de prácticamente el 100 % transcurridas las 48 h, y de xilosa un 94.18 % al concluir la fermentación (92 h). El consumo de glucosa de *C. magnoliae* se muestra en la Figura 32, mientras el consumo de xilosa y producción de xilitol en la Figura 34. Además, fue la que alcanzó una concentración mayor de producto, de 3.57 g/L, al finalizar la fermentación, con un rendimiento final producto-sustrato ( $Y_{p/s}$ ) de 0.35 g de xilitol/g de xilosa. Sin embargo, el rendimiento máximo alcanzado por *C. magnoliae*, se dio a la hora 48, caso similar al ocurrido con *C. guilliermondii*. En este tiempo, se alcanzó un rendimiento producto-sustrato  $Y_{p/s}$  de 0.59 g de xilitol/g de xilosa, y un rendimiento concentración celular-sustrato  $Y_{x/s}$  de 0.69 g de biomasa/g de xilosa, siendo el primero significativamente distinto al obtenido por *C. guilliermondii*, si se analizan con la prueba estadística t de Student. La productividad de *C. magnoliae*, de

0.056 g/Lh, también es significativamente superior al 0.005 g/Lh lograda por *C. guilliermondii*, a las mismas condiciones de fermentación (Tabla 31).

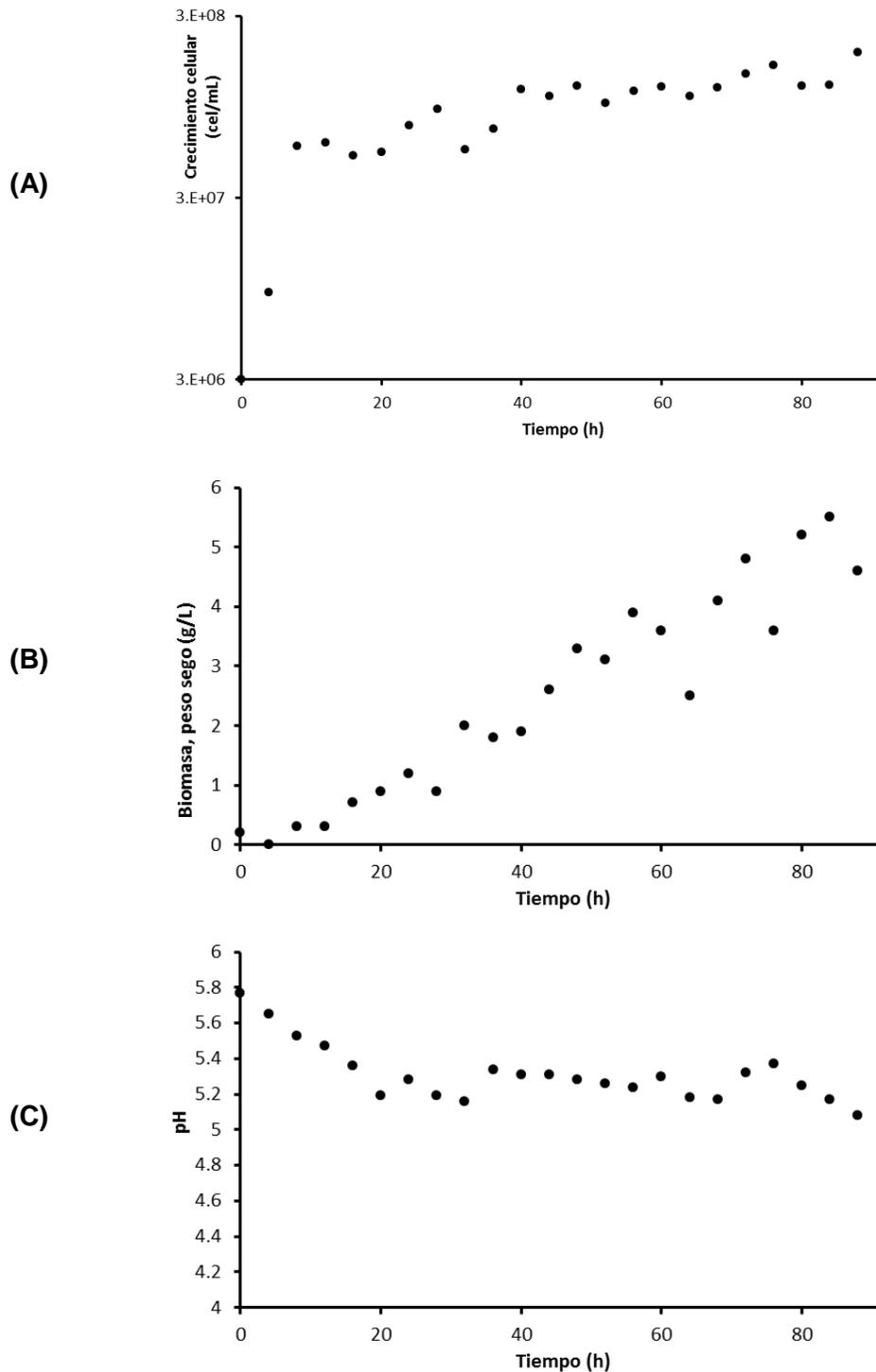


Figura 33. Crecimiento celular (A), producción de biomasa (B) y comportamiento del pH (C) durante la fermentación de *C. magnoliae*. Las gráficas son representativas para n=2

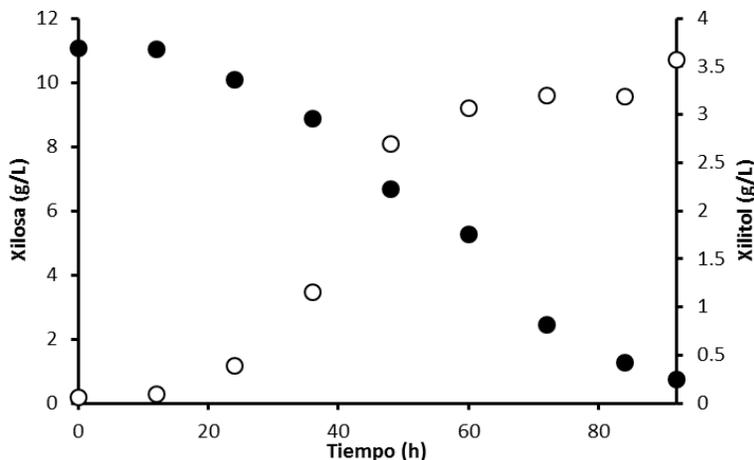


Figura 34. Consumo de xilosa (●), y producción de xilitol (○), con *C. magnoliae*. Gráfico representativo para n=2

### ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD FERMENTATIVA DE *Debaryomyces hansenii*, *Candida guilliermondii* y *Candida magnoliae*

Se ha reportado el uso de *D. hansenii* para la obtención de xilitol a partir de hidrolizados hemicelulósicos, específicamente madera de eucalipto (Diz *et al.*, 2002), alcanzando un rendimiento ( $Y_{p/s}$ ) de 0.57g de xilitol/g de xilosa. Sin embargo, ésta levadura no logró una adaptación al medio hidrolizado de semilla de tamarindo. Su inhibición pudo deberse a la probable presencia de furfurales, generados durante los procesos de hidrólisis ácida (Modig, 2001; Fernández *et al.*, 2007). Diversos métodos de purificación de medios orgánicos hidrolizados se han utilizado para disminuir la concentración de estos compuestos, y que podrían resultar mejorar la adaptabilidad de *D. hansenii* al medio hidrolizado de semilla de tamarindo; exposición a carbón activado y resinas de intercambio iónico se pueden destacar (Nápoles *et al.*, 2006).

Por su parte, *C. guilliermondii* y *C. magnoliae* si se adaptaron al medio hidrolizado de semilla de tamarindo. Sus tiempos de duplicación se muestran en la Tabla 31 y son comparados estadísticamente mediante una prueba t de Student a un nivel de significancia del 0.05. De acuerdo a dicho análisis, el tiempo de duplicación es distinto estadísticamente, siendo menor para *C. magnoliae* (1.87h), lo que habla de una mejor adaptación de esta levadura al medio hidrolizado de semilla de tamarindo.

A pesar de que *C. guilliermondii* y *C. magnoliae* se adaptaron al medio hidrolizado, su comportamiento durante la fermentación presentó diferencias significativas. *C. guilliermondii* llevó a cabo un consumo gradual tanto de glucosa como de xilosa, lo que se

trajo en una baja productividad comparada con la alcanzada por *C. magnoliae*, y comprobada por una prueba t de Student (Tabla 31). Así, el rendimiento producto-sustrato ( $Y_{p/s}$ ) también fue estadísticamente diferente con respecto al obtenido en la fermentación de *C. magnoliae*.

*C. guilliermondii* es quizá la levadura más utilizada en la obtención de xilitol a partir de medios hidrolizados de fuentes orgánicas. El rendimiento máximo obtenido por esta levadura en medio hidrolizado de semilla de tamarindo (0.1961 g de xilitol/g de xilosa) es mucho menor a los obtenidos para hidrolizados de bagazo de caña con 0.63 g de xilitol/g de xilosa (Martínez *et al.*, 2002) y paja de arroz con 0.73 g de xilitol/g de xilosa (Roberto *et al.*, 1999), sólo por mencionar algunos.

A pesar de obtener baja productividad y rendimiento producto-sustrato con *C. guilliermondii*, el rendimiento de sustrato en obtención de biomasa ( $Y_{x/s}$ ) fue alto, contrario a lo que podría esperarse, e incluso no difirió estadísticamente con el alcanzado con *C. magnoliae*.

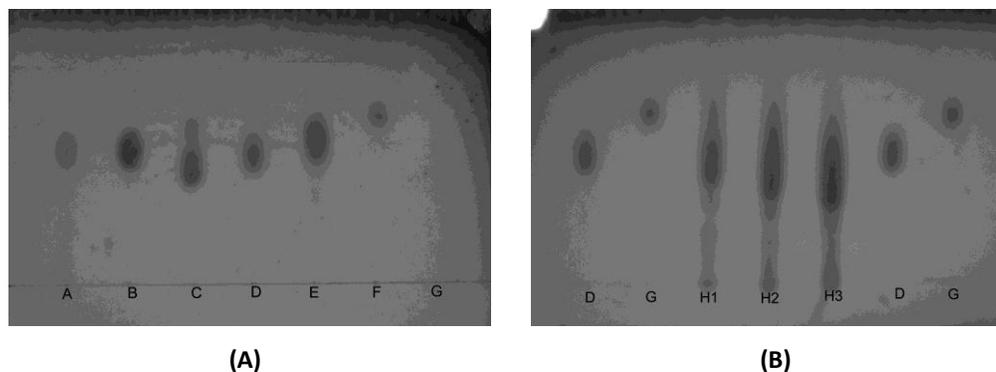
Como se mencionó anteriormente, la levadura que alcanzó mayor productividad y rendimiento fue *C. magnoliae*, que consumió prácticamente toda la glucosa, y un 94.18% de xilosa. La producción de xilitol, comenzó durante la fase estacionaria de crecimiento celular, coincidiendo en el punto donde la glucosa se agotó. El rendimiento de producto-sustrato alcanzado en este medio de fermentación, es similar al 0.57 g de xilitol/g de xilosa obtenido por Wannawilai *et al.* (2007), en medios puros de fermentación, lo que indica una adecuada adaptación al medio hidrolizado de semilla de tamarindo.

## 11.2 IDENTIFICACIÓN DE AZÚCARES EN EL MEDIO HIDROLIZADO DE SEMILLA DE TAMARINDO

Se determinó y cuantificó la presencia de los principales azúcares presentes en el medio hidrolizado de semilla de tamarindo, preparado bajo las condiciones establecidas, los cuales fueron glucosa y xilosa. Con el fin de identificar cualitativamente la presencia de otros azúcares en el hidrolizado, se llevó a cabo una cromatografía de capa fina, de acuerdo a la metodología establecida por González-Hernández *et al.* (2005).

Se preparó una solución estándar 0.1 M de cada uno de los siguientes carbohidratos: arabinosa (A), fructosa (B), galactosa (C), glucosa (D), manosa (E), xilosa (F) y xilitol (G). De los estándares preparados se tomaron 40  $\mu$ L y se diluyeron con 10  $\mu$ L de piridina. Además, se prepararon 3 muestras de hidrolizado de semilla de tamarindo; la primera se preparó diluyendo 40  $\mu$ L de hidrolizado con 60  $\mu$ L de piridina ( $H_1$ ), la segunda diluyendo

60  $\mu\text{L}$  de hidrolizado en 40  $\mu\text{L}$  de piridina ( $\text{H}_2$ ) y la tercera diluyendo 80  $\mu\text{L}$  del medio en 20  $\mu\text{L}$  de piridina ( $\text{H}_3$ ). De estas mezclas se tomó 1  $\mu\text{L}$  y se colocó sobre una placa de Silica Gel 60 y se reveló en una cámara cerrada con 1-butanol-isopropanol-agua (10:5:4 v/v) como fase móvil. Los puntos fueron revelados por rocío de una solución de vainillina 5 mg/mL en ácido sulfúrico 10 % y etanol 5 %, y calentado a 80 °C (Figura 35).



**Figura 35. Cromatografía de capa fina.** (A) Estándares; (B) Muestras de hidrolizado de semilla de tamarindo. A=Arabinosa, B=Fructosa, C=Galactosa, D=Glucosa, E=Manosa, F=Xilosa, G=Xilitol, H=Hidrolizado de semilla de tamarindo

Cada carbohidrato mantiene una particular distancia recorrida por acción de la fase móvil en la placa, la cual se observa claramente en la Figura 35. A partir de la cromatografía de capa fina para los estándares (Figura 35A) se calcularon los factores de retención de la Tabla 32. Por su parte, a partir de la cromatografía para las muestras de hidrolizados de semilla de tamarindo (Figura 35B), se identificaron y calcularon diferentes factores de retención que se muestran en la Tabla 33.

**Tabla 32. Factores de retención de cromatografía de capa fina en estándares**

Carbohidrato	Factor de retención ( $R_F$ )
Arabinosa	0.474
Fructosa	0.482
Galactosa	0.404
Glucosa	0.456
Manosa	0.509
Xilosa	0.614
Xilitol	---

**Tabla 33. Factores de retención identificados en las muestras de hidrolizado de semilla de tamarindo**

Factor de Retención	H <sub>1</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>3</sub>
R <sub>F1</sub>	0.404	0.410	0.410
R <sub>F2</sub>	0.439	0.455	0.455
R <sub>F3</sub>	0.482	0.474	0.474
R <sub>F4</sub>	0.631	0.614	0.614

De las muestras de hidrolizado de semilla de tamarindo, a diferentes diluciones, se calcularon cuatro factores de retención, los cuales son similares entre sí, como se muestra en la Tabla 33. Dichos factores de retención permiten la identificación de los carbohidratos presentes en el medio hidrolizado, mediante su comparación con los factores de retención obtenidos para las muestras de estándares (Tabla 32).

El valor del primero de ellos (R<sub>F1</sub>), varía entre la muestra de hidrolizado H<sub>1</sub> con respecto a las demás; sin embargo, dichos valores permiten determinar la presencia de galactosa (R<sub>F</sub>=0.404) en el medio hidrolizado de semilla de tamarindo. Comparando los demás factores de retención apreciados en las muestras de hidrolizado, se puede identificar también la presencia de otros monosacáridos, tales como glucosa (R<sub>F</sub>=0.456), arabinosa (R<sub>F</sub>=0.474) y xilosa (R<sub>F</sub>=0.614).

El factor de retención R<sub>F3</sub>=0.482 de la muestra de hidrolizado H<sub>1</sub> coincide con el factor de retención de la fructosa. Sin embargo, no se ha reportado la presencia de este disacárido en la composición de la semilla de tamarindo, por lo que se puede rechazar su presencia en las muestras utilizadas. Los azúcares identificados en el medio hidrolizado de semilla de tamarindo coinciden con los expuestos por Kaur *et al.* (2006).

## 11.3 ARTÍCULOS

### ARTÍCULO PUBLICADO

González-Hernández Juan Carlos, Farías Rosales Lorena, Vera Villa Juan Carlos, Martínez Corona Ricardo, Alvarez-Navarrete Mariana, Zamudio Jaramillo Miguel Ángel, Chávez Parga Ma.del Carmen, Peña Antonio. 2012. *Chemical Hydrolysis of the Polysaccharides of the Tamarind Seed*. Journal of the Mexican Chemical Society. Vol. 56, No. 4. 395-401

Descripción: En este artículo se presenta el efecto de diferentes tratamientos en la liberación de azúcares reductores (RS) de las semillas. Se probaron tres factores:

temperatura (86-130 °C), concentración de ácido (0.32-3.68%) y tiempo de exposición (13.2-40 min). Se probaron dos ácidos. La temperatura y el tiempo fueron los factores que tuvieron más efecto significativo en la liberación de RS. Las mejores condiciones para la liberación de los RS fueron 130.2 °C, 2% de ácido v/v, and 30 min, alcanzando un valor de aproximadamente 110 g/L. Los resultados sugieren que las semillas de tamarindo son una opción viable para la producción de xilitol.

### ARTÍCULOS POR PUBLICAR

a) Análisis Comparativo de la Producción de Xilitol por Fermentación de Levaduras No-Convencionales en Medios Hidrolizados de Semilla de Tamarindo.

Descripción: Se mostrarán los resultados de las fermentaciones en matraz de tres levaduras productoras de xilitol en medios hidrolizados de semilla de tamarindo: *C. guilliermondii*, *D. hansenii* y *C. magnoliae*, en agitación a 180 rpm y 30°C, donde *D. hansenii* no mostró adaptación al medio hidrolizado de semilla de tamarindo y tuvo una nula producción de xilitol. Por su parte, *C. guilliermondii* y *C. magnoliae* alcanzaron un rendimiento producto-sustrato máximo de 0.20 y 0.59 g de xilitol/g de xilosa, respectivamente.

b) Estudio del efecto de la concentración inicial de sustrato y agitación sobre la producción de xilitol por fermentación de medio hidrolizado de semilla de tamarindo con *Candida magnoliae*.

Descripción: Se presentarán los resultados de la evaluación del efecto de la concentración inicial de sustrato y agitación, a nivel matraz, el cual se realizó a partir del planteamiento de un diseño experimental factorial 3<sup>2</sup>. El componente cuadrático de la concentración inicial de sustrato y la interacción entre los factores influyeron estadísticamente sobre la producción de xilitol de *C. magnoliae*, donde la optimización del diseño experimental predijo un rendimiento de 0.57 g de xilitol/g de xilosa, a una concentración inicial de sustrato de 50 g/L y una agitación de 177 rpm.

c) Análisis del efecto de la agitación y aireación sobre la producción de xilitol por fermentación en biorreactor con *Candida magnoliae* utilizando como sustrato hidrolizado de semilla de tamarindo.

Descripción: En este trabajo se mostrarán los resultados del diseño experimental 2<sup>2</sup> con un punto central, con el cual se evaluó el efecto de la agitación y aireación sobre la síntesis de xilitol por fermentación de medios hidrolizados de semilla de tamarindo utilizando *C. magnoliae*. De acuerdo a estos resultados, la aireación y la interacción entre

los factores fueron las que tuvieron un efecto significativo sobre la producción de xilitol. El mayor rendimiento alcanzado fue de 0.71 g de xilitol/g de xilosa, a una agitación de 100 rpm y una aireación de 0.1 vvm.

## 11.4 PRESENTACIONES EN CONGRESOS

- a) Nombre: 2do. Foro Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas y Agropecuarias.  
Título: Obtención de xilitol a partir de medios hidrolizados de semilla de tamarindo.  
Modalidad: Cartel.  
Lugar y fecha: Morelia, Michoacán. Del 18 al 20 de mayo de 2011.
- b) Nombre: 1er. Congreso de la Facultad de Químico Farmacobiología.  
Título: Obtención de xilitol a partir de medios hidrolizados de semilla de tamarindo.  
Modalidad: Cartel.  
Lugar y fecha: Morelia, Michoacán. Del 24 al 26 de noviembre de 2011.
- c) Nombre: 2do. Symposium en Biotecnología Alimentaria y Ambiental.  
Título: Análisis Comparativo de la Producción de Xilitol por Fermentación de Levaduras No Convencionales en Medios Hidrolizados de Semilla de Tamarindo.  
Modalidad: Ponencia Oral.  
Lugar y Fecha: Morelia, Michoacán. 17 de marzo de 2012.
- d) Nombre: VII Congreso Internacional XVIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, X Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular.  
Título: Análisis comparativo de la producción de xilitol por fermentación con levaduras no convencionales.  
Modalidad: Cartel.  
Lugar y Fecha: Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero. Del 28 al 30 de marzo de 2012.
- e) Nombre: 3er. Foro Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas y Agropecuarias.  
Título: Análisis de los factores que afectan la producción de xilitol por fermentación de medios hidrolizados de semilla de tamarindo.  
Modalidad: Ponencia oral.  
Lugar y Fecha: Morelia, Michoacán. Del 29 al 31 de mayo de 2012.
- f) Nombre: 2do. Congreso Nacional en Ciencia y Tecnología en Ingeniería Bioquímica y Congreso Multidisciplinario en Ingeniería y Tecnologías para la Innovación.

Título: Efecto de la concentración de sustrato y agitación sobre la producción de xilitol por fermentación de *Candida magnoliae* en hidrolizados de semilla de tamarindo.

Modalidad: Ponencia oral.

Lugar y Fecha: Morelia, Michoacán. Del 15 al 19 de octubre de 2012.

- g) Nombre: 3er. Simposium Nacional y I Congreso Internacional en Biotecnología Alimentaria y Ambiental.

Título: Efecto de la aireación y agitación en la producción de xilitol por fermentación con *Candida magnoliae* en medios hidrolizados de semilla de tamarindo.

Modalidad: Ponencia oral.

Lugar y Fecha: Morelia, Michoacán. Del 27 de febrero al 1 de marzo de 2013.



del Posgrado  
en ciencias  
Biológicas y  
Agropecuarias  
de la  
Universidad  
Michoacana



Universidad Michoacana de  
San Nicolás de Hidalgo  
Programas institucionales  
de Doctorado y Maestría  
en Ciencias Biológicas

Otorga la presente:

# CONSTANCIA

Martínez-Corona Ricardo, Cortés-Penagos Carlos; González-Hernández Juan Carlos

Por su participación en la modalidad de Cartel con la ponencia:

**OBTENCIÓN DE XILITOL A PARTIR DE MEDIOS HIDROLIZADOS DE SEMILLA DE TAMARINDO**

Centro de información, Arte y Cultura - Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, del 18 al 20 de Mayo de 2011,  
Morelia, Michoacán, México

Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores  
Coordinador General del Programa  
Institucional de Maestría  
en Ciencias Biológicas

Dr. Edgardo Serna González  
Coordinador General de  
Estudios de Posgrado de la  
Universidad Michoacana

Dr. Javier Ponce Saavedra  
Coordinador General del Programa  
Institucional de Doctorado  
en Ciencias Biológicas



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
Facultad de Químico Farmacobiología  
LIII Aniversario de la Facultad de Químico Farmacobiología y  
Día del Químico.



OTORGA LA PRESENTE  
**CONSTANCIA**

A: **C. RICARDO MARTÍNEZ CORONA.**

POR PARTICIPAR COMO PONENTE EN LA EXPOSICION DE CARTELES CON EL TEMA:  
"OBTENCIÓN DE XILITOL A PARTIR DE MEDIOS HIDROLIZADOS DE SEMILLA DE TAMARINDO"  
EN EL 1er. CONGRESO DE LA FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA,  
REALIZADO DEL 24 AL 26 DE NOVIEMBRE DEL 2011.

MORELIA MICH. A 26 DE NOVIEMBRE DEL 2011

M.C. ULISES HUERTA SILVA.  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE  
QUIMICO FARMACOBIOLOGIA

M.C. MARIA DEL ROCIO LARA MADRIGAL.  
SUBDIRECTORA DE LA FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA  
Y COORDINACION GENERAL DEL EVENTO.



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



II SIMPOSIUM EN  
**BIOTECNOLOGÍA**  
ALIMENTARIA Y AMBIENTAL



Constancia

a

**Ricardo Martínez Corona, Carlos Cortés Penagos,  
Ma. del Carmen Chávez Parga, Juan Carlos González Hernández**

por su participación en la ponencia titulada:

"Análisis comparativo de la producción de xilitol por  
fermentación de levaduras no convencionales en medios  
hidrolizados de semilla de tamarindo"

Morelia, Michoacán, 17 de marzo de 2012

D. C. CONSUELO DE JESÚS CORTÉS PENAGOS  
Coordinadora del CA Biotecnología  
alimentaria y ambiental UMSNH

D. C. JOSÉ GERARDO TINOCO RUIZ  
Secretario académico  
de la UMSNH

M. EN E. ULISES HUERTA SILVA  
Director de la Facultad de  
Químico - Farmacobiología



COLEGIO MEXICANO DE INGENIEROS BIOQUÍMICOS, A.C.

EXTIENDE LA PRESENTE

FER285JCG20120130

# Constancia

A:

*Ricardo Martínez Corona; Carlos Cortés Penagos; María del Carmen Chávez Parga; Juan Carlos González-Hernández.*

POR SU VALIOSA PARTICIPACIÓN EN LA EXPOSICIÓN DEL TRABAJO LIBRE  
ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA PRODUCCIÓN DE XILITOL POR FERMENTACIÓN CON LEVADURAS NO CONVENCIONALES

VII CONGRESO INTERNACIONAL DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA  
INTERNATIONAL CONGRESS XVIII NATIONAL CONGRESS OF BIOCHEMICAL ENGINEERING

X JORNADAS CIENTÍFICAS DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR  
BIOMEDICINE AND MOLECULAR BIOTECHNOLOGY SCIENTIFIC MEETING

IXTAPA ZIHUATANEJO,  
GUERRERO, MEXICO  
28. 29 Y 30 de MARZO 2012

*IBQ. R. Alejandro Romo Méxía Gutiérrez*  
Presidente del C.M.I.B.Q., A.C.

*Dra. Elsa Irma Quiñones Ramírez*  
Presidenta del Comité Científico del Congreso

*En C. Ricardo Monterrubio López*  
Organizador General del Congreso



Foro Académico del Posgrado  
en Ciencias Biológicas  
y Agropecuarias



La Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
a través del Programa Institucional de Doctorado  
en Ciencias Biológicas y del Programa Institucional  
de Maestría en Ciencias Biológicas,  
otorgan la presente

# Constancia

a

Ricardo Martínez Corona, Carlos Cortés Penagos y Juan Carlos González Hernández.

Por su participación como ponente oral con el trabajo:

**ANÁLISIS DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE XILITOL POR FERMENTACIÓN DE MEDIOS HIDROLIZADOS DE SEMILLA DE TAMARINDO**

en el marco del 3er Foro Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas y Agropecuarias realizado del 29 al 31 de Mayo de 2012 en el Centro de Información, Arte y Cultura en la ciudad de Morelia, Michoacán

*Dr. José López Bucio*  
Coordinador General  
PIDCB

*Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores*  
Coordinador General  
PIMCB



# TEKNI 2012

Congreso Multidisciplinario en Ingeniería y Tecnologías para la Innovación  
El Instituto Tecnológico de Morelia  
Otorga el presente

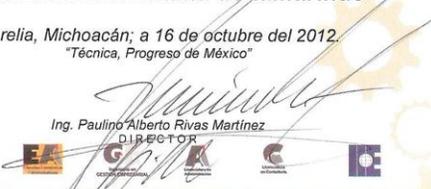
## RECONOCIMIENTO

A: **Ricardo Martínez Corona**

Por haber impartido la conferencia:

**Efecto de la concentración de sustrato y agitación sobre la producción de xilitol por fermentación de *Candida magnoliae* en hidrolizados de semilla de tamarindo**

Morelia, Michoacán; a 16 de octubre del 2012.  
"Técnica, Progreso de México"



Ing. Paulino Alberto Rivas Martínez  
DIRECTOR



15 al 19 de octubre



La Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo a través de la Facultad de Químico - Farmacobiología y el Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación

Organan la presente:

## CONSTANCIA

A: **Martínez Corona R., González-Hernández J.C., Chávez Parga M.C., Cortés Penagos C.**

Efecto de la aireación y agitación en la producción de xilitol por fermentación con *Candida magnoliae* en medios hidrolizados de semilla de tamarindo.

Por su participación en las actividades académicas realizadas en el marco del 3er. Simposium Nacional y I Congreso Internacional en Biotecnología Alimentaria y Ambiental, celebrado del 27 de Febrero al 1 de Marzo de 2013.

Morelia, Michoacán, a 1 de Marzo de 2013.



Dr. José Gerardo Tinoco Ruiz  
Secretario Académico de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



M.C. Vilma Huerta Silva  
Directora de la Facultad de Químico - Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Dra. Esthela Cecilia Garibay  
Directora General del Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación



Simposium Nacional y I Congreso Internacional en  
**Biotecnología Alimentaria y Ambiental**

27 de febrero al  
1º de marzo del 2013

Universidad Nova Spania  
Morelia, Michoacán, México