# UNIVERSIDAD NACIONAL
# "SANTIAGO ANTÚNEZ DE MAYOLO"

## FACULTAD DE CIENCIAS

# UTILIZACIÓN DE LA CORONTA DE MAÍZ AMILÁCEO PARA LA OBTENCIÓN DE PRODUCTOS DE ALTO VALOR AGREGADO (XILITOL Y ETANOL)


**INVESTIGADOR RESPONSABLE**

**BARRA ZEGARRA, ROSARIO TRINIDAD**

**MANDUJANO AYLAS IRMA**

**BENITES PARDILLO TALHITA**

**MESA GARRIGA LAYANIS**

**GONZALES SUÁREZ ERENIO**

**ENCISO PINEDA JUAN**



Huaraz – Perú

2016

# RESUMEN

La producción biotecnológica de xilitol y etanol mediante el cultivo de bacterias o levaduras en hidrolizados hemicelulósicos obtenidos a partir de residuos agroindustriales reviste gran interés económico y ecológico, ya que dicho proceso puede dar valor agregado a los residuos agroindustriales a la par de mitigar los impactos ambientales producidos por los combustibles fósiles y por la disposición de residuos agrícolas.

En tal consideración el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar las posibilidades de utilización de los hidrolizados de residuos de maíz (coronta o mazorca) para la obtención de etanol y xilitol a efecto de lo cual se aislaron y seleccionaron cepas nativas con potencial fermentativo para la producción de etanol y xilitol, se comparó la producción de etanol y xilitol por levaduras nativa y estándar (*Candida kefyr)* y evaluó la influencia de diferentes condiciones operacionales para la obtención de etanol por *Pichia stipitis* en medio sintético.

Los resultados obtenidos en la presente investigación revelan que el hidrolizado de coronta de maíz amiláceo presenta potencial para su aplicación biotecnológica en la producción de etanol y xilitol.



**Palabras clave**: Coronta de maíz, etanol, xilitol, *Candida kefyr, Pichia stipitis*

# ÍNDICE

**1 INTRODUCCIÓN ..... 5**

**2 ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO ..... 7**

2.1 ANTECEDENTES ..... 7

2.2 MARCO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN ..... 8

**3 RESULTADOS ..... 10**

3.1 OBJETIVO 1 - AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE LEVADURAS NATIVAS CON POTENCIAL PARA LA PRODUCCIÓN DE XILITOL Y ETANOL ..... 11

*RESUMEN ..... 11*

*INTRODUCCIÓN ..... 11*

*METODOLOGÍA ..... 13*

*RESULTADOS Y DISCUSIÓN.- ..... 17*

*Conclusiones ..... 22*

*Recomendaciones: ..... 22*

*REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 22*

*ANEXOS ..... 24*

3.2 OBJETIVO 2 - OBTENCIÓN DE XILITOL A PARTIR DEL HIDROLIZADO DE CORONTA DE MAÍZ AMILÁCEO ..... 30

*RESUMEN ..... 30*

*INTRODUCCIÓN ..... 31*

*MATERIALES Y MÉTODOS ..... 33*

*RESULTADOS Y DISCUSIÓN ..... 36*

*CONCLUSIONES ..... 44*

*REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 45*

*ANEXOS ..... 48*

ANEXO A. RESULTADOS COMPARATIVOS DEL PROCESO FERMENTATIVO DE C. KEFYR Y *CANDIDA* (S.P) NATIVA EN LA PRODUCCIÓN DE XILITOL ..... 48

3.3 EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE HIDRÓLISIS Y FERMENTACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE RESIDUOS DE MAÍZ ..... 50

*RESUMEN ..... 50*

*INTRODUCCIÓN ..... 51*

*MATERIALES Y MÉTODOS ..... 52*

*RESULTADOS Y DISCUSIÓN ..... 57*

*Conclusiones: ..... 63*

*REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 64*

*ANEXOS ..... 66*

# 1 INTRODUCCIÓN

Es evidente que en la actualidad los países, en un intento de mitigar los daños ocasionados al planeta, muestran soluciones y propuestas innovadoras para dar un mejor uso de los recursos naturales renovables. El uso desmesurado de combustibles fósiles en distintos sectores de la economía ha ido año tras año generando un efecto nocivo sobre el planeta. La solución en el cambio de tipo de combustible ha sido una de las propuestas más innovadoras planteándose el reemplazo de los combustibles de origen fósil por los obtenidos a partir de procesos de transformación biológica como el etanol o biogás y transformación química como el biodiesel, logrando disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero (Balat, 2011).

El excesivo consumo de combustibles fósiles, sobre todo en áreas urbanas, ha tenido como consecuencia el incremento en las emisiones de gases de efecto invernadero (GHG) a la atmósfera (Sarkar *et al.*, 2012). La gran demanda de energía, unido a la inestabilidad económica del petróleo han sido detonantes fundamentales en el incentivo de las investigaciones para la producción de etanol a partir de fuentes renovables y la consiguiente utilización de residuos agrícolas para tal fin.

No solo los combustibles alternativos, presentan ventajas sobre los tradicionales, al usar materia prima renovable, otorgándoles la categoría de sostenibles y biodegradables, sino que también, hoy en día el uso de materias primas habitualmente reconocidas como desechos agrícolas, tienen varias oportunidades de ser reutilizadas y convertidas en productos de alto valor agregado.

Brasil y EEUU fueron los primeros países en empezar a producir etanol convencional a partir de caña de azúcar y maíz, respectivamente, para reducir su dependencia de los recursos fósiles y hoy en día, son dos de los países que más producen y exportan este alcohol. A partir del año 2000, la producción de bioetanol tuvo una gran expansión en el resto del mundo, cuando Europa y otros países se unieron a la búsqueda de biocombustibles alternativos (Bellido**,** 2013).

Para cumplir con el volumen de etanol previsto en la actualidad se precisa de la contribución de innovaciones biotecnológicas, que permitan lograr una utilización más eficiente del maíz a partir del uso de híbridos, maíces de alta fermentación o

ampliar la gama de materiales de los cuales se extrae el etanol, incorporando a este proceso los tallos, hojas u otros desechos vegetales para lograr un uso más racional y eficiente de la biomasa lignocelulósica proveniente de residuos agroindustriales del maíz (Pezoa, 2010).

Uno de los azúcares que se puede obtener a partir de los residuos del maíz (específicamente de la coronta o mazorca) es la xilosa, la cual puede ser utilizada para la producción de etanol con la combinación de esta y otros azúcares y en un proceso biotecnológico también es posible utilizarla para producir xilitol (alcohol pentahidroxilado de gran valor debido a sus usos en las industrias alimenticia, farmacéutica y odontológica) (Zu *et al.,* 2013).

El xilitol tiene características útiles, incluyendo su uso para la prevención de la caries dental, como sustituto del azúcar para los diabéticos y como edulcorante de alimentos naturales (Kiyoshi *et al.,* 2004).

El presente trabajo tuvo por objetivo determinar alternativas tecnológicas para la obtención por vía microbiana de xilitol y etanol a partir del hidrolizado de la coronta de maíz amiláceo.

# 2 ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

## 2.1 ANTECEDENTES

Rojas *et al.* (s.f) han determinado las mejores condiciones de hidrólisis ácida para el coronta de maíz con el objeto de obtener xilosa. Se utilizó ácido sulfúrico diluido a concentraciones de: 1,006, 1,606 y 2,202 % p/v; temperatura de 110 y 123°C; tiempo de hidrólisis de 15, 30 y 45 min. y una relación sólido: líquido de 1 g: 6,25 mL y de 1 g: 8.75 mL.

Los resultados mostraron una producción de xilosa entre 10 a 30 $gL^{-1}$, no detectándose la presencia de furfural (FH) y de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) en ninguno de los tratamientos, mientras que la concentración máxima de ácido acético en el hidrolizado fue 3,91 $gL^{-1}$. Así mismo se encontró que los factores de mayor influencia en la hidrólisis de coronta de maíz fueron la relación sólido: líquido (1 g de coronta por 6,25 mL de $H_2SO_4$), la temperatura (123 °C) y el tiempo de hidrólisis (45 min.).

En dicha investigación se concluye que el hidrolizado de coronta de maíz a las condiciones seleccionadas es apto para emplearlo como medio de cultivo por su bajo contenido de inhibidores de crecimiento (ácido acético, FH y HMF).

A su vez Pezoa (2010) ha comparado distintos tratamientos con ácido diluido y líquidos iónicos en residuos de maíz y trigo para la producción de bioetanol de segunda generación. Se probaron 3 tratamientos: hidrólisis ácida diluida, hidrólisis ácida seguida hidrólisis alcalina e hidrólisis con el líquido iónico (cloruro dr 1-metil-3-metilmidazolio). Del mencionado estudio se estima que la producción de etanol a partir de residuos de maíz (209 L de etanol/ton de residuos) fruto de la extracción de un 57% de los azúcares teóricamente disponibles se obtiene en el material con un pre tratamiento con líquidos iónicos por 60 min. A 150 °C seguido de una hidrólisis enzimática con un rendimiento de 0.42 g de etanol/g de azúcar liberado. En tanto que los residuos de trigo se estima que la mayor producción es de 242 L de etanol/ton de residuo, utilizando un pre tratamiento con 1% v/v de $H_2SO_4$ por 60 min. Esta investigación permite tener un marco de referencia para el estudio de pre tratamiento ácido de la coronta de maíz.

De otro lado Martínez *et al.* (2002) estudiaron la producción biotecnológica de xilitol a partir de xilosa proveniente de hidrolizados de hemicelulosa de bagazo de caña de azúcar, eucalipto, paja de arroz y paja de trigo, utilizando la levadura *Cándida guillermondii* FTI 200037. El proceso de fermentación de los hidrolizados fue realizado a pH 5,0 y a 30 °C durante 80 horas con el objetivo de analizar la influencia de las características de los hidrolizados sobre los parámetros fermentativos obtenidos en la producción de xilitol a partir de los hidrolizados hemicelulósicos de los mencionados residuos lignocelulósicos.

Los resultados indican que el mejor valor de eficiencia del proceso de fermentación fue obtenido con el hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (Murthy *et al.*, 2005), el cual es diferente a los obtenidos con los demás hidrolizados en un nivel de 5%. Los menores resultados de eficiencia corresponden al hidrolizado de paja de trigo. Los valores de los parámetros fermentativos obtenidos en éste estudio para el hidrolizado del bagazo de caña de azúcar son: productividad 0.47 g/Lh y un rendimiento de 0.79 g/g de conversión de xilosa en xilitol.

En el caso de los hidrolizados de paja de trigo se obtuvo una productividad de 0,24 g/Lh y un rendimiento de conversión de xilosa en xilitol de 0,329 g/g. En tanto que para el hidrolizado hemicelulósico de eucalipto la productividad es de 0.28 g/Lh. Este trabajo aporta importante información sobre los parámetros fermentativos (productividad y rendimiento) de la conversión de xilosa en xilitol de diferentes materiales lignocelulósicos.

## 2.2 MARCO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN

El xilitol es obtenido por hidrogenación catalítica a partir de xilosa comercial, lo cual implica un proceso de alto costo y bajo rendimiento pero también puede ser producido por fermentación por medio de microorganismos como bacterias, mohos y levaduras.

Este proceso es altamente específico y económico debido a que un 80 % del azúcar es transformado en xilitol, y se puede aumentar el rendimiento, ya sea modificando la célula por ingeniería genética u optimizando las condiciones culturales de producción del microorganismo seleccionado.

Se ha demostrado que las levaduras son las mejores productoras de xilitol, especialmente aquellas del género Candida ya que reducen la xilosa a xilitol bajo la acción de una enzima denominada xilosa reductasa, la cual es NADP-dependiente. La cantidad de xilitol y la productividad del mismo dependerán de las condiciones de cultivo y del tipo de cepa que se utilice (Martínez *et al.,* 2002).

La literatura refiere que dentro de los principales géneros de levaduras podemos encontrar:

- *Candida guilliermondii*
- *Candida shehatae* NRRL Y-1285
- *Pichia stipitis* NRRL Y-11545
- *Pachyssolen tannophilus*

Muchos han sido los métodos descritos para la producción del xilitol:

A través de la llamada ingeniería metabólica, mediante nuevas levaduras capaces de metabolizar la xilosa transformándola en xilitol, el que se acumula en el medio de cultivo del que será luego recuperado.

Con la tecnología de DNA para dotar a algunos microorganismos de la propiedad de fermentar azúcares de cinco carbonos con alta eficiencia. Un ejemplo de ello es la cepa bacteriana de la especie *Escherichia coli*, desarrollada por la Universidad de Florida (EUA), que puede fermentar azúcares de seis y cinco carbonos al mismo tiempo, el que ha sido registrado bajo la patente US 5.000.000 (Ethanol production by Escherichia coli strains co-expressing Zymomonas PDC and ADH genes).

Por otro lado, partiendo del ácido glucónico el procedimiento consiste en la transformación del mismo en arabinosa, hidrogenación de la misma formándose arabitol, isomerización de este último a una mezcla de pentitoles y posterior separación de los mismos.

Además, empleando como materia prima los licores al sulfito provenientes de la elaboración de pulpa de celulosa. Dichos licores contienen xilosa y ácido xilónico

los cuales se separan del material original para ser refinados y mediante posterior hidrogenación se obtiene el xilitol. (Patente de Invención de Xyrofin Oy – Finlandia).

Según la materia prima empleada, la D-xilosa presente en la solución puede estar acompañada por otras pentosas (arabinosa, ribosa), las que son necesarias eliminar. Esta separación se efectúa por separación cromatográfica. (patentes de invención: US 3.748.408, 4.008.285).

A escala industrial, el xilitol es producido generalmente por reducción química de la D-xilosa derivada de residuos de plantas, que han sido hidrolizadas (Canilha, 2002), los cuales son ricos en xilosa, también por hidrogenación catalítica a partir de xilosa comercial, lo cual implica un proceso de alto costo y bajo rendimiento. También es posible producirlo por fermentación por medio de microorganismos como bacterias, mohos y levaduras lo cual es un proceso altamente específico y económico debido a que un 80 % del azúcar es transformado en xilitol, y se puede aumentar el rendimiento, ya sea modificando la célula por ingeniería genética u optimizando las condiciones de cultivo del microorganismo seleccionado (Johansson, 2001).

# 3 RESULTADOS

Los resultados del presente trabajo están presentados en concordancia con los objetivos planteados y están presentados en forma de artículos científicos.

## 3.1 Objetivo 1 - Aislamiento y selección de levaduras nativas con potencial para la producción de xilitol y etanol


### RESUMEN

Se evaluó la capacidad fermentativa de 22 levaduras nativas con capacidad de degradar D-xilosa y D-glucosa con el objetivo de encontrar cepas eficientes que puedan ser utilizadas en la producción de xilitol y etanol a partir de hidrolizados hemicelulósicos de coronta de Maíz amiláceo (*Zea mays)*. Los microorganismos fueron aislados a partir de muestras de suero lácteo (quesillo), melón fermentado y jugo de caña de azúcar de la ciudad de Huaraz - Ancash. La fermentación se realizó en medio Verduyn modificado, con xilosa o glucosa (30 g/L) como única fuente de carbono, bajo las siguientes condiciones: temperatura 30 °C por 24 horas a 120 rpm, los experimentos fueron realizados por duplicado. Los resultados muestran que un total de cinco cepas etanolgénicas alcanzan relativamente alta productividad volumétrica ($Q_p$> 0.4g de etanol /Lh) destacando las cepas codificadas como LX3G, CX3G, CX2G y CG2G provenientes del jugo de caña de azúcar y suero de lácteo lo que las convierte en potenciales candidatas para su aplicación en la producción de etanol, la concentración máxima producida de etanol fue de 10,2 g/L obtenida a las 24 h de fermentación con una productividad volumétrica de 0.4252 g/Lh y un rendimiento de 0.34 g de etanol. Solo una levadura (MX1X) mostró capacidad para metabolizar xilosa y producir xilitol, aunque su rendimiento y productividad son bajos. Estos resultados sugieren la existencia de levaduras nativas con capacidad para ser utilizadas en la obtención de etanol y xilitol.



**Palabras clave**: etanol; fermentación; levaduras; método del dicromato de potasio


### INTRODUCCIÓN

Las especies microbianas, en particular las levaduras, son de gran importancia para la producción biotecnológica de insumos industriales como xilitol y etanol. La producción microbiana es una alternativa al proceso químico, con la ventaja de que

se lleva a cabo en condiciones suaves de presión y temperatura y en consecuencia con menor gasto de energía.

Por lo que la selección de microorganismos que fermentan xilosa y glucosa a xilitol o etanol es el primer paso para el desarrollo de un proceso de bioconversión. Dentro de las especies microbianas las levaduras son reconocidas como las mejores productoras de etanol y xilitol, en particular los géneros *Pichia, Hansenula, Kluyveromyces, Pachysolen, Debaryomyces, Schizosaccharomyces, Saccharomyces y Candida,* este último es considerado como el patrón de referencia para la obtención de xilitol a partir de xilosa (Granström, 2002).

La mayoría de las investigaciones sobre producción microbiana de xilitol y etanol utilizan cepas estandarizadas, siendo necesario la búsqueda y evaluación de cultivos autóctonos de levaduras ya que se encuentran adaptadas a las condiciones climáticas de la zona y a la materia prima a fermentar.

En tal consideración, y siendo importante contar con un germoplasma de levaduras nativas con capacidad de degradar D-xilosa y D- glucosa que puedan ser utilizadas en la producción de xilitol y etanol respectivamente a partir de hidrolizados hemicelulosicos de coronta de Maíz, el presente estudio, tuvo como objetivo el aislamiento y selección de levaduras capaces de fermentar D- xilosa y D-glucosa para lo cual se evaluó su producción de etanol y xilitol en un medio sintético.

## OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la biodiversidad de levaduras con capacidad de degradar D-xilosa y D-glucosa que puedan ser utilizadas en la producción de xilitol y etanol a partir de hidrolizados hemicelulósicos de coronta de Maíz

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar Levaduras nativas degradadores de D- Xilosa a partir de muestras de suero lácteo (quesillo), melón fermentado y jugo de caña de azúcar de la ciudad de Huaraz - Ancash.

- Aislar Levaduras nativas degradadores de D- glucosa a partir de muestras de suero de queso fresco, melón fermentado y jugo de caña de azúcar de la ciudad de Huaraz - Ancash.

- Seleccionar los microorganismos que presentan mayor actividad fermentativa de D- Xilosa para destinarlos a bioprocesos de producción de Xilitol.

- Seleccionar los microorganismos que presentan mayor actividad fermentativa de D- glucosa para destinarlos a bioprocesos de producción de etanol

## METODOLOGÍA

El procedimiento experimental se dividió en dos fases:

**A.** Aislamiento, purificación y caracterización morfológica de cepas nativas degradadoras de D- glucosa y D- xilosa para la obtención de etanol y xilitol.

**B.** Pruebas de fermentación de microorganismos utilizando un medio sintético.

### A.1. Procedencia de las muestras para el aislamiento de levaduras que utilizan Xilosa y glucosa.-

Para el aislamiento y selección de cepas de levaduras nativas productoras de xilitol y etanol se escogieron diversas fuentes naturales como: suero lácteo proveniente de queso fresco (quesillo), jugo de caña de azúcar y melón fermentado bajo refrigeración, las mismas que se caracterizan por su alto contenido de carbohidratos (azúcares fermentables) y proteínas. Dichas muestras fueron obtenidas del mercado local de la ciudad de Huaraz.

### A.2. Tratamiento de las muestras.-

Muestra de suero lácteo procedente de queso fresco (quesillo): se preparó una solución madre al 10% en agua peptonada estéril, de esta solución se tomó 2 ml y se sembró en tubos de ensayo estériles que contenían Caldo Y.P. Xilosa (YPX) (Xilosa 20 g/L, Peptona 10 g/L y Extracto de levadura 5g/L en 1000 ml de Agua

destilada, pH 5.5) y caldo Y.P Glucosa (glucosa 20 g/L, Peptona 10 g/L y Extracto de levadura 5g/L en 1000 ml de Agua destilada, pH 5.5) los tubos de ensayo fueron incubados a $30^0$C por 48 hrs.

Muestra de jugo de caña de azúcar: Se tomaron dos mL de jugo de caña de azúcar y se sembraron directamente en tubos de ensayo estériles que contenían los medios de cultivo YPX y YPG, siendo incubados por 24 horas a 30°C.

Muestra de melón: Se tomaron dos gramos de melón hervido en descomposición y se sembró directamente en tubos de ensayo conteniendo caldo YPX y YPG, e incubados a 30 °C por 24 horas.

**A.3. Aislamiento de levaduras.-**

Para el aislamiento de las colonias se utilizó el agar YPX y YPG con verde de bromotimol y 100 µg/mL de Cloranfenicol con el fin de evitar el crecimiento bacteriano.

Se tomó una alícuota de 0.1ml de cada una de las muestras y se sembró por duplicado en placas Petri con Agar YPX y YPG, siguiendo el método de siembra en superficie. Las placas Petri fueron incubadas a 30 °C por 48 horas.

**A.4. Pre-selección y purificación de levaduras aisladas.-**

La pre-selección de las cepas se efectuó teniendo en cuenta el crecimiento cultural y la morfología microscópica. Se separó aquellas cepas aisladas que manifestaron mayor densidad de colonias en el medio de cultivo selectivo y que presentaron una morfología típica de levadura. Dichas cepas fueron purificadas mediante repiques sucesivos y codificados para su conservación en ceparios con Agar Sabouraud en plano inclinado. Las codificaciones se separaron según su procedencia: cepas YPG y YPX respectivamente.

**B. Evaluación de la capacidad fermentativa de xilosa y glucosa.-**

Para la evaluación de la capacidad fermentativa de xilosa y glucosa de las cepas seleccionadas y su potencial para la producción de etanol y xilitol; se seleccionaron 22 cepas y se preparó el inoculo de cada una de ellas a partir de un cultivo de 24

horas, tomándose una asada de cada cepa para sembrar en 50 ml caldo de caldo Verduyn modificado, YPX y YPG y se incubó a 30°C por 18 horas. Luego se centrifugó este volumen a 4000 rpm por 15 min., descartándose el sobrenadante y resuspendiéndose en 25 ml de solución salina peptonada; colocándolos en 2 matraces Erlenmeyer conteniendo 150 mL de medio Verduyn modificado en cada uno, con xilosa o glucosa (20 g/L) respectivamente, como única fuente de carbono.

La composición del medio fue: 5,0 g/L de $K_2HPO_4$, 5,0 g/L de $KH_2PO_4$, 0,1 g/L de $CaCl_2.2H_2O$, 0,10 g/L de Mg $SO_4$ 5 g/L extracto de levadura, 3 g/L extracto de carne o peptona, 0.1 mg. /L de verde de bromotimol.

La fermentación se efectuó en frascos Erlenmeyer de 250 mL agitados en un shaker orbital GFL a 30 °C por 24 horas a 120 rpm. Los experimentos fueron realizados por duplicado.

**B.1. Métodos analíticos.-**

Se realizó un monitoreo de las corridas experimentales a las 18 y 24 horas para evaluar la concentración de etanol y xilitol. Las muestras fueron microfiltradas a través de membranas de 0,45 µm. Las concentraciones de xilitol y etanol se determinaron por HPLC, utilizando un Cromatografo liquido AGILENT, modelo 1260 con una columna cromatográfica HI-PLEX H, 300 X 7,7 mm, 8 µm, bajo las siguientes condiciones de operación: eluyente, Ac. Sulfúrico 0,005 M; temperatura del detector 55 ºC; volumen de muestra, 20 µL; flujo, 0,7 mL/min; presión en la columna, 4,6 MPa (46 bar, 670 psi); sistema de detección, índice de refracción (IR), como estándares xilitol (Sigma ®) y etanol absoluto (ACS, ρ= 0.7876).

La identificación del metabolito se efectúa mediante los tiempos de retención, y la cuantificación se realiza mediante la integración de las áreas de los picos referidas al valor correspondiente de la solución estándar, para lo cual se creó una curva de calibración mediante análisis de correlación lineal para etanol y xilitol. A partir de esta curva se determinó la concentración de etanol y xilitol en g/L. en el anexo 1 figuran las curvas de calibración correspondiente y en el anexo A figuran los resultados cuantitativos de las evaluaciones.

**B.2. Determinación de parámetros fermentativos.-**

Se determinaron los siguientes parámetros fermentativos:

- La productividad volumétrica de xilitol/etanol ($Q_p$) se determina por:

$$Qp = \frac{\text{Concentración de xilitol/etanol}}{\text{Tiempo}} \quad (1)$$

- Factor de conversión de D- xilosa en xilitol (**$Y_{P/S}$**) o de D- glucosa en etanol

  El rendimiento del xilitol/etanol a partir de xilosa/glucosa consumida (**$Y_{P/S}$**) se calcula por:

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S_T} (g/g) \quad (2)$$

  Donde $\Delta P$ es la masa de xilitol/etanol presente y $\Delta S_T$ es la masa total de xilosa/glucosa consumida.

- Rendimiento con respecto al teórico ($R_T$) o eficiencia de la conversión (**η**)

  El rendimiento teórico de la producción de xilitol desde xilosa se calculó según Barbosa *et al*. (1988) considerando 0.917 g de xilitol/g de xilosa

  El porcentaje de eficiencia alcanzado o rendimiento de etanol fue calculado de acuerdo con la relación estequiométrica de la ecuación 3 de conversión de glucosa en etanol (51,1 g de etanol por cada 100 g de glucosa consumida)

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ C_2H_5OH + 2CO_2 \quad (3)$$

  Así el porcentaje de rendimiento o eficiencia de conversión (% E) rendimiento observado se calcula según la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de conversión} = \frac{Y_{p/s}}{\text{Rendimiento teórico}} 100\% \quad (4)$$

**B.3. Diseño experimental.-**

Los cultivos se desarrollaron de acuerdo a diseño experimental completamente aleatorizado con dos factores: el tipo de cepa (22 cepas) y tiempo con dos niveles (18 y 24 horas) y cuatro variables de respuesta: producción de xilitol o etanol, productividad volumétrica ($Q_p$), y factor de conversión ($Y_{p/s}$)

**B.4. Análisis estadístico.-**

Los resultados fueron analizados utilizando el paquete estadístico STATISTIX 8. El análisis estadístico de los datos obtenidos durante el proceso de fermentación incluyó la correlación entre las variables y fueron analizados estadísticamente realizando un análisis de varianza y el Test de Tukey,

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.-

Para el aislamiento primario de levaduras xilanoliticas presuntivas, se utilizó el medio de crecimiento selectivo YPX, con xilosa cristalina como única fuente de carbono, con ello fue posible limitar el crecimiento a los microorganismos capaces de degradar este sustrato, esto significa un avance en los esfuerzos por aumentar el número de candidatos capaces de producir las enzimas necesarias para degradar xilosa.

Aunque la tinción de gram es específica para bacterias, también permite identificar levaduras de acuerdo con su tamaño y forma; las cuales ante dicha tinción presentan un gran tamaño en comparación a las bacterias (Brock, 2005)

Las levaduras nativas aisladas  a partir de las muestras procesadas; ante la tinción de gram se observaron de color morado intenso, grandes, globosas y alargadas.

De un total de tres muestras fueron aisladas y purificadas 22 cepas,  el mayor porcentaje de levaduras aisladas 54,5% (12) se obtuvo del jugo de caña de azúcar, un 27% (6) del suero lácteo del queso fresco (quesillo) y el 22% (4) provienen del melón hervido fermentado. Similares resultados fueron obtenidos por Vanegas *et al*. (2004) el mayor porcentaje (44%) de levaduras aisladas procedían del bagazo de caña de azúcar, confirmando que la caña de azúcar es una fuente rica de azúcares disponibles para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos entre ellos levaduras, hongos y bacterias.

Asimismo, los componentes del suero lácteo (lactosa, proteínas y minerales) aseguran la persistencia de levaduras fermentadoras de azúcares como la lactosa, dentro de las cuales se encuentran especies de *Candida* y *Kluyveromices* (Quintero *et al*. 2001). A partir del suero lácteo; se pudo aislar un número de levaduras con potencial para producir etanol mediante procesos biotecnológicos.

La proporción de levaduras nativas aisladas según la fuente de aislamiento se muestra en la Figura 1.

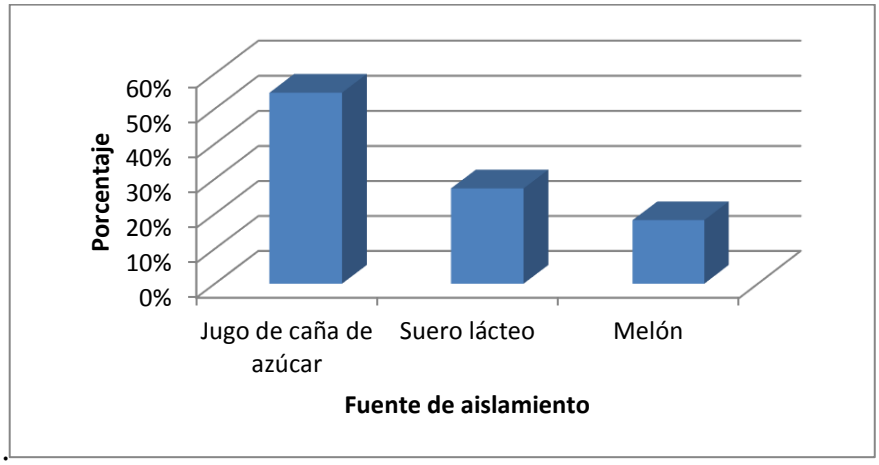



Figura 1 Proporción de levaduras nativas según la fuente de aislamiento

De las cepas aisladas en caldo YPG 11 (50%) de ellas fueron capaces de fermentar glucosa a etanol en medio mineral enriquecido propuesto por Verduyn *et al*. (1992) a una temperatura de 28 °C con una eficiencia de conversión en un rango amplio desde 0.52 a 67% , destacando las cepas LX3G, CX3G y CX2G. Asimismo, la cepa aislada de caña de azúcar codificada como **CG1G** muestra interesantes propiedades que hacen de ella también una potencial candidata para su aplicación en la producción de etanol, la concentración máxima producida de etanol fue de 10,2 g/L obtenida a las 24 h de fermentación con una productividad volumétrica de 0.4252 g/Lh y un rendimiento de 0.34 g de etanol por cada gramo de glucosa, asimismo el rendimiento de la producción de etanol con respecto al teórico fue de 66.56% lo cual demuestra una adecuada adaptación del microorganismo en el medio definido (Pena, *et al*. 2009). No obstante, es necesario un estudio más detallado sobre la cinética de fermentación y su caracterización morfológica.

Cabe señalar que un total de cinco cepas etanolgénicas alcanzan relativamente alta productividad volumétrica ($Q_p$> 0.4g de etanol /Lh)

En la Tabla 1 se muestra los valores de los parámetros fermentativos de siete de las cepas productoras de etanol aisladas de jugo de caña de azúcar y suero de queso

fresco: productividad volumétrica ($Q_p$), factor de conversión de glucosa en etanol ($Y_{p/s}$), y eficiencia de la conversión (η), asumiendo un valor teórico de 0.511 g/g (García, J.F., Sánchez S. y Bravo, V., 2010).

Tabla 1

**Parámetros fermentativos de cepas nativas productoras de etanol en medio sintético**

| Tiempo | CEPA | P etanol (g/L) | $Q_p$ (g/l*h) | $Y_{p/s}$ (g/g) | η (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 24 | CG1G | 10.2038 | 0.4252 | 0.340 | 66.56% |
| 18 | CX3G | 9.9789 | 0.5544 | 0.333 | 65.09% |
| 24 | LX1G | 9.9789 | 0.4158 | 0.333 | 65.09% |
| 24 | LX3G | 9.8661 | 0.4111 | 0.329 | 64.36% |
| 18 | CX1G | 9.4910 | 0.5273 | 0.316 | 61.91% |
| 18 | LX3G | 9.4746 | 0.5264 | 0.316 | 61.80% |
| 24 | CX2G | 9.3171 | 0.3882 | 0.311 | 60.78% |

Del total de cepas un 45% (10) es degradadora de xilosa. Es destacable además el hecho de que tres cepas (CG1X, CG2X y MG1X) aisladas en agar YPG, fueron capaces de producir etanol a partir de xilosa, lo que las convierte en potenciales cepas a ser utilizados en la degradación de residuos hemicelulósicos para la obtención de etanol. Además, siete cepas aisladas en agar YPX, mostraron capacidad para degradar xilosa y producir etanol. En el anexo A, tabla A.1 y A.2, figuran los resultados de la evaluación de cepas nativas con potencial para la producción de etanol.

De las cepas evaluadas sólo una (5 %) mostró capacidad para metabolizar xilosa y producir xilitol (MX1X), dicha cepa fue aislada del melón en agar YPX y fermentada en medio sintético mineral Verduyn modificado, conteniendo 30 g de xilosa. El rendimiento máximo de xilitol fue observado a las 18 horas (**0.4613 g/L**) con una productividad volumétrica de 0.0256 g/Lh, un bajo factor de conversión de xilosa en xilitol de 0.023 g/g y una eficiencia de la conversión de 1,59%. Dicha cepa muestra asimismo capacidad de metabolizar xilosa y glucosa y producir ambos bioproductos xilitol y etanol, mostrando que es una levadura que tiene enzimas para el transporte y metabolismo de xilosa, por lo que resulta

promisorio su estudio ya que sólo existe un pequeño número de microorganismos capaces de asimilar y fermentar D- xilosa a xilitol, etanol y otros compuestos (Winkelhausen E., Kuzmanova S., 1998).

La Tabla 2 muestra los valores promedio de los parámetros fermentativos: productividad volumétrica ($Q_p$), factor de conversión de xilosa en xilitol ($Y_{p/s}$), y eficiencia de la conversión de xilosa en xilitol (η), asumiendo un valor teórico de 0.917 g/g (Barbosa, Medeiros, Mancilha, Schneider, & Lee., 1988).

Tabla 2

Parámetros fermentativos de la producción de xilitol por *Cándida* sp aislada de melón en medio sintético

| Bioproducto | Tiempo | P xilitol (g/L) | $Q_p$ (g/l*h) | $Y_{p/s}$ (g/g) | η (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| Xilitol | 18 | 0.4613 | 0.0256 | 0.023 | 2.53 |
| Xilitol | 24 | <0.0183 | <0.0008 | -0.001 | <2.00 |
| Etanol | 24 | 0.4346 | 0.0181 | 0.014 | 2.84% |
| Etanol | 18 | 0.0795 | 0.0044 | 0.003 | 0.52% |

Los valores alcanzados para la producción de xilitol están por debajo de los reportados en la literatura revisada así Roberto *et al*. (1999) obtuvieron concentraciones de xilitol de 36.8 g/L al emplear hidrolizados de paja de arroz con 62 g/L de xilosa, utilizando la cepa estándar *Candida guilliermondii*; Minghua *et al.* ( 2012) obtuvieron alta producción de xilitol (96,5 g/L) a partir de **hidrolizados** de coronta de maíz conteniendo 80 g/L de xilosa en un proceso de fermentación batch de dos estadios utilizando *Candida tropicalis*.

Asimismo, Silva y Roberto (2001) en su investigación sobre optimización de la producción de xilitol por *Candida guilliermondii* previamente adaptada a hidrolizados de cascarilla de arroz reportan una producción de xilitol de 50 g/L a partir de 90/g/L de xilosa después de 120 horas de fermentación.

Herazo y Ruiz (2011) obtuvieron una producción máxima de xilitol de 2,6 g/L después de 120 horas de fermentación, con una productividad volumétrica de xilitol (Qp) de 0,02 g/L-h y un rendimiento de sustrato en producto Yp/s de 0,13 g/g.

Cabe señalar que estos valores se corresponden con altas concentraciones iniciales de xilosa, Herazo y Ruiz (2011) consideran como una variable importante la concentración inicial de xilosa siendo los valores óptimos reportados entre 60-80 g/L de xilosa para la obtención de xilitol, en nuestro caso se utilizó una concentración de xilosa de 30 g/l en el medio de cultivo.

Asimismo la cepa nativa *Candida* sp se aisló de una matriz nativa, y es más efectivo el uso de cultivos autóctonos de levaduras ya que se encuentran adaptadas a las condiciones climáticas de la zona y a la materia prima a fermentar.

El análisis estadístico (ver anexo 2) muestra que el coeficiente de variación para cada una de las variables respuesta sometidas a la prueba de análisis de varianza resulto en un valor comprendido entre 6 y 12 %, lo que indica que los datos tienen poca variabilidad y en consecuencia son confiables.

Con relación a la actividad fermentativa para todas las variables respuestas procesadas (producción de etanol, producción volumétrica, factor de conversión y rendimiento) el factor Cepa resultó altamente significativo, lo que refleja la existencia de diferencias altamente significativas entre las Cepas con respecto a las repuestas medidas.

En cuanto a la producción de etanol y producción volumétrica, las Cepas LX3G y CX3G, presentan mayores promedios, es decir, tienen una mayor producción. En lo que respecta a la variable factor de conversión, la Cepa LX3G arrojó el mayor valor y en cuanto al rendimiento las Cepas LX3G, CX3G y CX2G presentan mayores valores, es decir, generan un mayor rendimiento de etanol.

Es importante señalar, que para todas las respuestas evaluadas la interacción cepa*tiempo resultó significativa, lo que indica, que los factores cepa y tiempo son dependientes.

Asimismo, el grado de asociación entre las variables resultó altamente significativo con signo positivo, es decir, existe una fuerte tendencia a un comportamiento directamente proporcional entre las variables en estudio.

## Conclusiones

El jugo de caña de azúcar es una fuente natural de variedad de cepas que presentan potencial para la producción de etanol.

La cepa nativa aislada de jugo de caña de azúcar y codificada como CG1G es la que presenta la mayor potencialidad para la producción de etanol.

La cepa nativa del género *Candida* sp. aislada del melón codificada como MX1X puede ser utilizada para obtener xilitol y etanol, aunque su rendimiento y productividad son bajos; sin embargo, podría ser base para complementar con otros procesos de concentración de dichos metabolitos y mejorar así el rendimiento y productividad de ellos.

## Recomendaciones:

Fue verificada la habilidad de producir etanol y xilitol de cepas nativas en un medio sintético, debiendo ser comprobada la misma en un medio complejo como los hidrolizados de residuos lignocelulósicos y compararlas con levaduras procedentes de colecciones de referencia.

Aplicar un diseño estadístico experimental por superficie de respuesta para optimizar las condiciones fermentativas como temperatura, pH, agitación, aireación y concentración de inóculo que permitan incrementar los rendimientos en la concentración de etanol y xilitol

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barbosa, M., Medeiros, M. d., Mancilha, I. M., Schneider, H., & Lee., H. (1988). Screening of yeasts for production of xilitol from D-xilose and some factors which affect xilitol yield in Candida guilliermondii. *Journal of Industrial Microbiology, 3*, 241-251.

García, J.F., Sánchez S. y Bravo, V. (2010). *Producción de bioetanol a partir del residuo de la poda de olivo.* Madrid: PIDMAS.

Granström, T. (2002). Biotechnological production of xilitol with candida yeast. *Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy Helsinki University of Technology*. Department of Chemical Technology.

Herazo C. Ruiz, D. A. (2011). Utilización de Candida guilliermondii aislada del corozo chiquito (Bactris guineensis) en la producción de xilitol. *Revista Colombiana de Biotecnología, 13*(1), 52-57.

Martínez E, Villareal M, Almeida J, A Solenzal. (2002). Uso de diferentes materias primas para la producción biotecnológica de xilitol. *CyTA - Journal of food, 3*, 295-301.

Minghua Li, X. M. (2012). Xilitol production by candida tropicalis from corn cob hemicellulose hydrolyzate in a two-stage fed-batch process. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 87*(3), 387-392.

Ministerio de Agricultura y Riego. (2012). *Maíz amiláceo.* Lima.

Ministerio de Agricultura y Riego. (2015). *Boletín Mensual de Estadística Agraria.* Lima.

PENA, Maribel; CARRASCO, Cristhian; CRESPO, Carla y TERRAZAS S. L., Enrique. (2009). Influencia de la concentración de oxígeno en la producción de etanol a partir de la fermentación de mezclas D-glucosa/D-xilosa e hidrolizados de aserrín de Curupaú porPichia stipitis. *BIOFARBO, 171*.

Pezoa Conte, R. M. (2010). Estudio de pretartamiento con ácido diluido y líquidos iónicos en residuos agrícolas para la producción de bioetanol de segunda generación. *Tesis para optar el gardos de magister en ciencias de la ingeniería, mención química*. Santiago de Chile.

Roberto, I. M. (1999). Influence of KLa on bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate to xylitol. *Bioprocess and Biosystems Engineering, 21* (6), 505-508.

Rojas M, Varela M, Rangel E. (s.f.). *XII Congreso de Biotecnología y Bioingeniería.* Recuperado el 14 de abril de 2011, de http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_XI/CXI-04.pdf

Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*(27), 185-194.

Silva, C., Roberto, I. (2001). Optimization of xylitol production by Candida guilliermondii FTI-20037 using response surface methodology. *Process Biochemestry*(36), 1119-1124.

Vanegas, I.A; Yepes, M. y Ruiz, O. (2004). Producción de xilitol a partir de levaduras nativas colombianas. *RevistaColombiana de Biotecnología*, *6*(2), 31-36.

Verduyn, C. P. (1992). Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeast: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast, 8*, 501-517.

Winkelhausen E., Kuzmanova S. (1998). Review: Microbial conversion of D-xilose to xylitol. *Journal of Fermentation and Bioengineering, 86*, 1-14.

Zu S., Li W., Zhang M., Li Z., Wang Z., Jameel H. & Chang H. (2013). *Pretratamiento de residuos de maíz para la producción de azúcares con ácido clorhídrico seguido de cal.* Elsevier.

## ANEXOS

Anexo A: Datos experimentales

Tabla A.1 Concentración y eficiencia de la conversión a etanol de cepas nativas aisladas de jugo de caña de azúcar, suero lácteo y melón, según tiempo de fermentación en medio sintético conteniendo glucosa.

| Tiempo | CEPA | Concentración (g/L) | Eficiencia de la conversión (%) | Bioproducto |
|---|---|---|---|---|
| **24** | CG1G | 10.2038 | 66.56 | ETANOL |
| **18** | CX3G | 9.9789 | 65.09 | ETANOL |
| **24** | LX1G | 9.9789 | 65.09 | ETANOL |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **24** | LX3G | 9.8661 | 64.36 | ETANOL |
| **18** | CX1G | 9.4910 | 61.91 | ETANOL |
| **18** | LX3G | 9.4746 | 61.80 | ETANOL |
| **24** | CX2G | 9.3171 | 60.78 | ETANOL |
| **18** | CX2G | 8.9842 | 58.61 | ETANOL |
| **24** | CX3G | 8.9221 | 58.20 | ETANOL |
| **18** | CX4G | 7.4875 | 48.84 | ETANOL |
| **18** | MG1G | 5.8419 | 38.11 | ETANOL |
| **24** | CX4G | 4.4347 | 28.93 | ETANOL |
| **18** | MX1G | 4.3190 | 28.17 | ETANOL |
| **18** | CG2G | 3.7129 | 24.22 | ETANOL |
| **18** | CG1G | 2.9630 | 19.33 | ETANOL |
| **24** | MX1G | 2.7908 | 18.20 | ETANOL |
| **24** | CX1G | 2.7584 | 17.99 | ETANOL |
| **18** | LX2G | 2.6780 | 17.47 | ETANOL |
| **24** | MG1G | 2.6221 | 17.10 | ETANOL |
| **24** | LX2G | 2.3095 | 15.07 | ETANOL |
| **18** | LX1G | 0.7897 | 5.15 | ETANOL |
| **24** | CG2G | 0.0924 | 0.60 | ETANOL |

Tabla A.2 Concentración y eficiencia de la conversión a etanol de cepas nativas aisladas de jugo de caña de azúcar, suero lácteo y melón, según tiempo de fermentación en medio sintético conteniendo xilosa.

| Tiempo | CEPA | Concentración (g/L) | Eficiencia de la conversión (%) | Bioproducto |
|---|---|---|---|---|
| **24** | CG1X | 1.3051 | 8.51 | ETANOL |
| **18** | CG1X | 0.9363 | 6.11 | ETANOL |
| **18** | CG2X | 0.5394 | 3.52 | ETANOL |
| **24** | CG2X | 0.4040 | 2.64 | ETANOL |
| **24** | CX1X | 0.4061 | 2.65 | ETANOL |
| **18** | CX1X | 0.3180 | 2.07 | ETANOL |
| **18** | CX2X | 0.6433 | 4.20 | ETANOL |
| **24** | CX2X | <0.1274 | <0.83 | ETANOL |
| **24** | CX3X | 2.9656 | 19.35 | ETANOL |
| **18** | CX3X | 0.9924 | 6.47 | ETANOL |
| **18** | CX4X | 1.2945 | 8.44 | ETANOL |
| **24** | CX4X | 0.3096 | 2.02 | ETANOL |
| **24** | LX1X | 1.1868 | 7.74 | ETANOL |
| **18** | LX1X | 0.1457 | 0.95 | ETANOL |
| **24** | LX2X | 0.9693 | 6.32 | ETANOL |
| **18** | LX2X | 0.2880 | 1.88 | ETANOL |
| **18** | LX3X | 0.9754 | 6.36 | ETANOL |
| **24** | LX3X | 0.4887 | 3.19 | ETANOL |
| **24** | MG1X | 0.9537 | 6.22 | ETANOL |
| **18** | MG1X | 0.2094 | 1.37 | ETANOL |
| **18** | MX1X | 0.4613 | 1.69 | XILITOL |
| **24** | MX1X | <0.0183 | <2.00 | XILITOL |

**Anexo B: Información complementaria**

Características morfológicas de la cepa proveniente de melón catalogada como MX1X:

La muestra procede del melón, forma colonia  color cremosa blanco lechoso, microscópica, pertenece al género *Candida* sp.

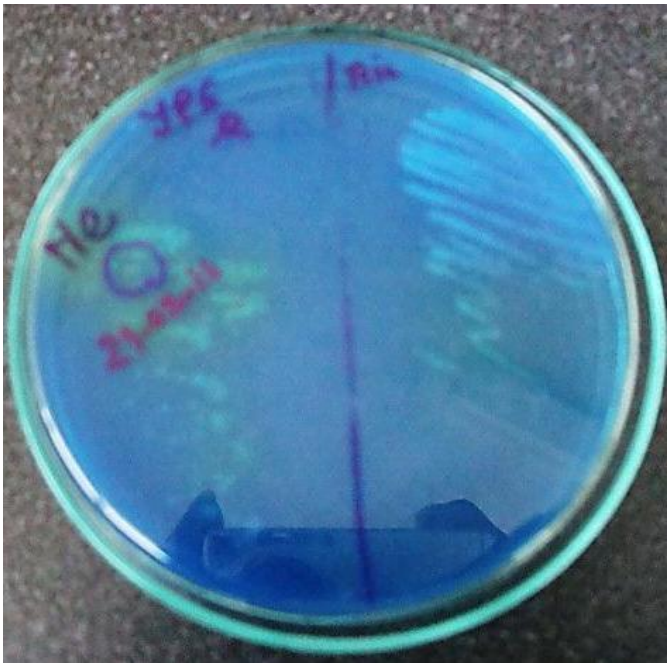


Figura 2 Colonia aislada del fruto de  melón hervido,

Observación macroscópica de cepa nativa colonias blanquecinas, opacas, con bordes liso, microscópicamente se observa **:** Blastoconidias de diferente tamaño, redondeadas u ovaladas, de pared delgada, gemantes.

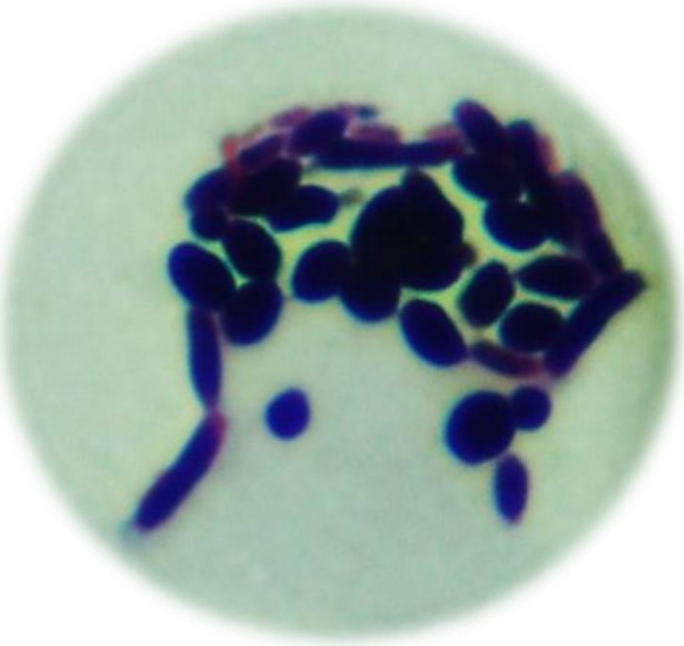


Figura 3 Observación macroscópica de cepa nativa *Candida sp,* aislada de melón

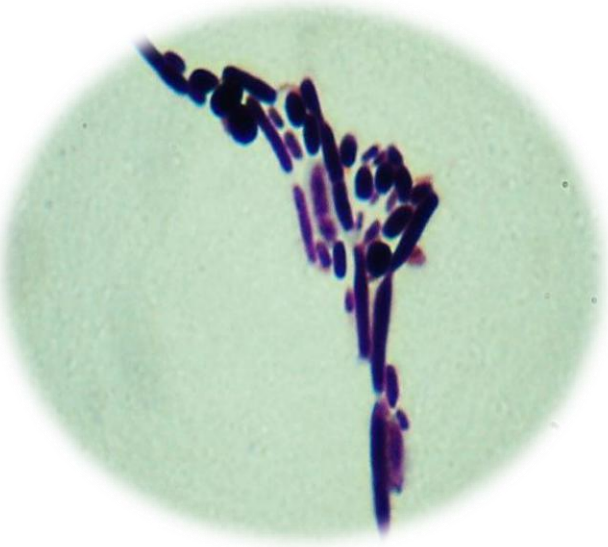


Figura 4 Nativa Candida sp. 1000X

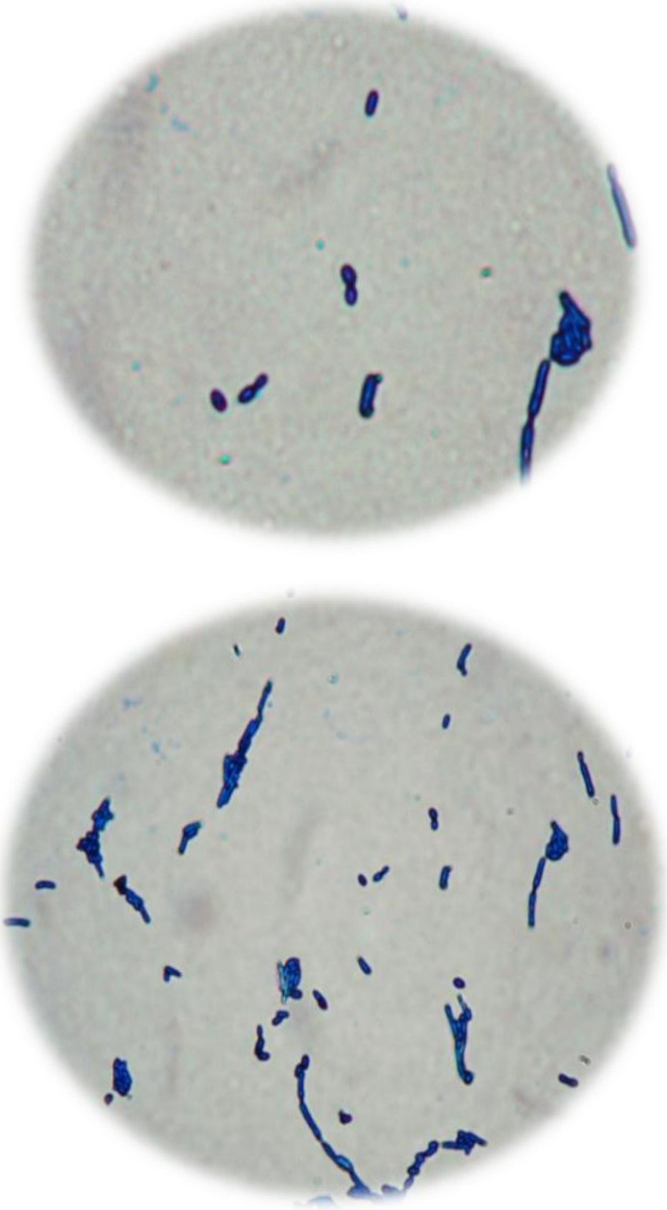


Figura 5 Nativa 400X

## 3.2 Objetivo 2 - Obtención de Xilitol a partir del hidrolizado de coronta de maíz amiláceo.

**RESUMEN**

El objetivo del presente estudio fue la obtención de xilitol a partir del hidrolizado de coronta o mazorca de maíz amiláceo ( *Zea mays L. ssp* amiláceo) por fermentación Batch en cultivo sumergido con una cepa nativa de *Candida* sp. aislada del melón (*Cucumis melo*) y una cepa estándar *Candida*. *Kefyr* ATCC® 66028™. Para lo cual se realizó una hidrólisis ácida, utilizando Ac. Sulfúrico diluido al 1% w/v manteniendo una relación sólido-líquido de 1:10 (w/v). El proceso de hidrólisis se realizó en una autoclave Marca Biogen durante 30 minutos, a 121±1º C y presión de 15 PSI. El proceso de fermentación se efectuó en frascos Erlenmeyer agitados; en un shaker orbital GFL y una concentración inicial de biomasa de 2.6%. Los experimentos realizados se llevaron a cabo por duplicado Las condiciones de fermentación fueron las siguientes: temperatura de 28 ºC, pH del medio de 5,5, agitación de 120 rpm. Los resultados observados muestran que *Candida Kefyr* presenta una mayor efectividad en la bioconversión de xilosa a xilitol que *Candida* sp registrando una producción máxima de xilitol de 9.96 y 2,49 g/L a las 24 y 18 horas de fermentación respectivamente.

De este modo, el hidrolizado de coronta de maíz puede ser utilizado para la producción de xilitol, bajo las condiciones de fermentación desarrolladas.

**Palabras clave**: Coronta de maíz, xilitol, hidrólisis ácida diluida, *Candida Kefyr*, *Candida* sp.

## INTRODUCCIÓN

Los materiales lignocelulósicos representan la mayor fuente de carbono y por tanto de energía renovable en nuestro planeta. De otro lado cantidades apreciables de residuos lignocelulósicos provenientes de la producción agrícola se acumulan anualmente, lo que origina una serie de problemas ambientales por dificultades en la disposición y descomposición descontrolada de este material.

Cabe resaltar que normalmente los residuos agrícolas son destinados como suplemento de la ración animal o como abono orgánico lo que representa una subutilización de recursos que son pasibles de biotransformación a compuestos de alto valor agregado como combustibles de segunda generación (etanol), enzimas, antibióticos, polisacáridos, xilitol entre otros productos de aplicación en el área alimenticia y farmacéutica.

Por tal motivo la revalorización de los residuos agrícolas y la obtención de productos de alto valor agregado es una alternativa para mitigar los daños ambientales que se le han hecho a la naturaleza.

Dentro de las materias primas más usadas para la obtención de productos de alto valor agregado encontramos: la paja de arroz, el bagazo de caña de azúcar, virutas de madera, entre otras (Martínez *et al*, 2002). Sin embargo, se conoce muy poco sobre las posibilidades de utilización de la coronta de maíz, como materia prima para la obtención de hidrolizados que puedan ser empleados en la obtención de xilitol o etanol.

El coronta de maíz, una vez utilizado el grano, tiene muy poco valor comercial, es un residuo disponible en grandes cantidades y con alto contenido de celulosa (35.5% ± 04), y 35.9% ±7.3 de hemicelulosa (Pezoa, 2010) lo que la convierten en un Candidato potencial para ser evaluado como materia prima en la obtención de productos como el xilitol.

El maíz amiláceo ( *Zea mays L. ssp* amiláceo), es uno de los principales cultivos en la zona andina en Perú, existiendo diferentes variedades : El maíz amiláceo es uno de los principales alimentos de los habitantes de la sierra del Perú y uno de los cultivos

de mayor importancia económica en la sierra después de la papa; su producción se consume como grano verde bajo las formas de choclo, y como grano seco como cancha, mote y bebidas entre otras formas de uso.

Asimismo, la producción de maíz para consumo en forma de choclo y cancha, son las más importantes fuentes de ingresos para los productores de este tipo de maíz en la sierra del país. Con respecto a su valor nutricional, el grano de maíz es un fruto rico en nutrientes digestibles totales (Ministerio de Agricultura, 2012)

El área cultivada de maíz en el Perú para el periodo 2014-2015 registra alrededor de 234.4 miles de hectáreas, con una producción aproximada de 0.2 miles de toneladas de maíz (SIEA, 2015), generando una gran volumen de residuos agroindustriales, entre los cuales se destaca la coronta o mazorca, la misma que muchas veces es quemada o arrojada como desecho agroindustrial.

Según Sánchez (2009) la coronta de maíz está compuesta por 15% de lignina, 35% de hemicelulosa, 45% de celulosa y un 1,46% de cenizas. Esta cantidad relativamente moderada de hemicelulosa puede dar lugar a una alta concentración de xilanos, los mismos que previos pre tratamientos físicos y químicos (molienda e hidrólisis química) pueden producir un licor rico en azúcares fermentables (xilosa, arabinosa) que bien pueden ser utilizados como sustrato para la obtención de productos de alto valor agregado vía fermentación microbiana como el xilitol.

El Xilitol es un alcohol pentahidroxilado que ha atraído considerable atención en las industrias farmacéuticas y de alimentos incluyendo su uso para la prevención de caries dental, como un azúcar sustituto en diabéticos insulino.dependientes y como un natural endulzante. El xilitol es producido a escala industrial por reducción catalítica de la xilosa obtenida de fuentes de madera como los abedules blancos. Sin embargo, han sido extensamente explorados procesos alternativos debidos a su alto costo de producción e impacto ambiental asociado con la excesiva utilización de los recursos naturales maderables (Kiyoshi, *et al.*, 2004).

En consecuencia, la producción biotecnológica de xilitol a partir de residuos lignocelulósicos ricos en hemicelulosa como la coronta de maíz podría ser una alternativa económica y ambientalmente viable.

Como los materiales lignocelulósicos son heterogéneos en términos de su composición química, el objetivo del presente estudio fue investigar la viabilidad del uso del hidrolizado de coronta de maíz para la producción de xilitol por vía fermentativa, comparando dos levaduras una estándar (*Candida. Kefyr* ATCC® 66028™) y una nativa del género *Candida* sp. aislada del melón (*Cucumis melo*) sobre un mosto formulado a base de hidrolizado de coronta de maíz.

## MATERIALES Y MÉTODOS

a) Preparación de la materia prima.

La coronta de maíz fue obtenida de agricultores de la Provincia Carhuaz- Ancash. La muestra de materia prima fue sometida a un proceso de secado, colocándose para ello en una estufa MEMMERT a 60°C por 48 horas para disminuir su humedad y evitar la descomposición de la misma. Luego se pasó al proceso de molienda para lo cual se empleó primero un molino manual y luego un molino de cuchillas THOMAS –WILEY Modelo 4, alcanzando el tamaño final de 0.841 mm (Standard test sieve ASTM E-11 malla # 20). Finalmente el material se almacenó a temperatura ambiente en bolsas de plástico herméticamente cerradas para la obtención de los hidrolizados.

b) Hidrólisis ácida de la coronta de maíz.

Para la hidrólisis se partió de las condiciones óptimas encontradas en investigaciones anteriores para la obtención de xilitol y etanol. La coronta de maíz fue sometida a hidrólisis acida con $H_2SO_4$ diluido al 1% w/v manteniendo una relación sólido-líquido de 1:10 (w/v) de la muestra de coronta de maíz y la solución de ácido diluido. El proceso de hidrólisis ácido diluida se realizó en una autoclave Marca Biogen durante 30 minutos, a 121±1º C y presión de 15 PSI; luego de realizada la hidrólisis la muestra fue enfriada rápidamente en un recipiente con hielo, removiéndose el residuo sólido por filtración. El hidrolizado obtenido tiene un pH de 1.079 a 18.9 °C debido al tratamiento ácido al que fue sometido.

c) Detoxificación del hidrolizado.

El hidrolizado fue detoxificado primero con hidróxido de sodio 20% (NaOH) hasta *aumentar* el pH a 10 y luego se disminuyó el pH a 5 utilizando ácido clorhídrico (HCl 1N), el precipitado formado fue removido por filtración a vacío (Vieira et al., 2002).

d) Preparación del inóculo para el proceso fermentativo

Se utilizó la levadura *C. kefyr* de la colección de CINVESTAV – Politécnico Nacional de México y la levadura nativa aislada del melón (*Cándida* sp.) que presentó mayor potencial para la producción de xilitol de la evaluación de cepas nativas reportada en los resultados anteriores.

El inoculo se preparó a partir de un cultivo de 24 h de *Cándida kefyr* y de la levadura nativa, se tomó una asada de las cepas para sembrar en caldo YPX en 50 ml, por 30°C/ 18 h., a 120 rpm durante 24 h con la finalidad de adaptar la levadura al medio hidrolizado y a las condiciones del proceso luego se centrifugó a 4000 rpm/ 15 min., se descartó el sobrenadante, se resuspendió en solución salina peptonada y se inoculó en medio compuesto de: hidrolizado de coronta de maíz que contiene **17,69** g/l de xilosa , 3 g/L de extracto de levadura, 3 g/L de $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 g/L de $CaCL_2$ x $2H_2O$ y se ajustó a pH 5 con NaOH al 20%.

e) Condiciones de fermentación.

Se realizó la fermentación Batch en frascos Erlenmeyer de 500 ml agitados en un shaker orbital GFL y una concentración inicial de biomasa 2.6% (v/V). Los experimentos realizados se llevaron a cabo por duplicado. Las condiciones de fermentación fueron las siguientes: temperatura de 28 ºC, pH del medio de 5,5, agitación de 120 rpm (Silva, C., Silva, S., Roberto, I., 2005), las muestras fueron extraídas a las 12, 18, 24 y 48 horas, para determinar a concentración de xilitol y consumo de xilosa, al igual que la concentración de biomasa en el tiempo. Una vez finalizados los análisis se determinó la productividad volumétrica en xilitol ($Q_p$), el factor de conversión de xilosa en xilitol ($Y_{P/S}$) y rendimiento observado o eficiencia de la conversión ($\eta$ ).

Las condiciones de aireación se proporcionaron con una relación volumen del medio a volumen del matraz de 0,5 v/V.

f) Métodos analíticos

Las concentraciones de xilosa y xilitol en el hidrolizado se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando un Cromatografo liquido AGILENT, modelo 1260 con una columna cromatográfica Agilent HI-PLEX H, 7,7 X 300 mm, 8 µm bajo las siguientes condiciones de operación: eluyente, Ac. Sulfúrico 0,005 M; temperatura del detector 55 ºC; volumen de muestra, 20 µL; flujo, 0,7 mL/min; presión en la columna, 4,6 MPa (46 bar, 670 psi); sistema de detección, índice de refracción (IR), como estándares glucosa, xilosa y xilitol (Sigma ®).

La identificación del metabolito se efectúa mediante los tiempos de retención, y la cuantificación se realiza mediante la integración de las áreas de los picos referidas al valor correspondiente de la solución estándar.

g) Determinación de parámetros fermentativos

- La productividad volumétrica de xilitol ($Q_p$) se determinó por:

$$Qp = \frac{\text{Concentración de xilitol}}{\text{Tiempo}} \quad (1)$$

- Factor de conversión de D- xilosa en xilitol (**$Y_{P/S}$**)

El rendimiento del xilitol a partir de xilosa consumida (**$Y_{P/S}$**) se calculó aplicando la siguiente relación:

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S_T}(g/g) \quad (2)$$

Donde $\Delta P$ es la masa de xilitol presente y $\Delta S_T$ es la masa total de xilosa consumida.

- Rendimiento observado o eficiencia de la conversión (η) se determinó teniendo en cuenta que el rendimiento teórico de la producción de xilitol desde *xilosa* es 0.917 gr de xilitol/gr de xilosa (Barbosa *et al.*, 1988).

Así el rendimiento observado se calcula según la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento observado} = \frac{Y_{p/s}}{\text{Rendimiento teórico}} 100\% \quad (4)$$

h) Diseño experimental

A objeto de evaluar el tiempo, donde se produce el máximo rendimiento de xilitol en la fermentación del hidrolizado utilizando la levadura de referencia *Candida kefyr* y nativa procedente del melón (*Candida s.p*); se desarrolló un diseño experimental completamente aleatorizado en un arreglo bifactorial: cepa a dos niveles (estándar y nativa) y tiempo; en donde el tiempo se analizó a 4 niveles y se realizaron dos repeticiones por cada nivel, para medir las respuestas de las variables consumo de xilosa, producción de xilitol y productividad volumétrica.

El análisis estadístico de los datos obtenidos durante el proceso de fermentación incluyó la correlación entre las variables dependientes y los tratamientos aplicados y fueron analizados estadísticamente realizando un análisis de varianza y el Test de Tukey, utilizando el paquete estadístico STATISTIX 8.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) muestran que la concentración de glucosa en el hidrolizado de coronta de maíz bajo las condiciones del pre tratamiento ácido diluido fue de 8.48 g/L en tanto que la concentración de xilosa fue de **17,69** g/L, lo que demuestra que en el hidrolizado hemicelulósico la fracción de xilanos es mayoritaria y que la coronta de maíz es una fuente importante de xilosa, por su alto contenido de hemicelulosa, la concentración de xilosa obtenida en el hidrolizado crudo es comparable con las reportadas por otros investigadores a partir de otras materias primas como caña de azúcar, paja de arroz y trigo los que presentaron concentraciones de 22.7, 18.33, y 10.65 g/L respectivamente (Martínez *et al*. 2002); sin embargo, esta concentración es menor que las obtenidas a partir de coronta de maíz en otros estudios, así Tada *et al.* (2004) obtuvieron a partir de 100 g de coronta 25 g/L de xilosa por hidrólisis utilizando Ac. Sulfúrico 1% a 121 °C por 60 min, sin embargo, concentraciones similares de xilosa fueron obtenidas a partir de coronta maíz por Misra *et al*. (2012) cuyos resultados de xilosa fueron de 16,36 g/L, a partir de Ac. Sulfúrico 1%, con una relación sólido líquido de 1:8 a 121 °C por 30 min

Según Roberto *et al*. (2003), el factor de mayor influencia en el rendimiento de azúcares es la concentración del ácido, para Pezoa (2010) al aumentar la concentración del ácido y el tiempo en la hidrólisis ácida aumenta la cantidad de

azúcares extraídos, en nuestro caso el tiempo de hidrólisis sólo fue de 30 minutos lo que explicaría el rendimiento aceptable de glucosa y xilosa, asimismo, la concentración del ácido fue de 1%. En consecuencia es necesario optimizar esta etapa del proceso a fin de obtener la mayor concentración de xilosa. Por lo que se sugiere el desarrollo de futuros trabajos de investigación en los que se maximice la obtención de una mayor concentración inicial de xilosa. En consecuencia la coronta de maíz presenta gran potencial para ser utilizada como materia prima para la obtención de azúcares reductores como glucosa y destinados para la producción de xilitol y etanol por vía fermentativa.

Con relación a la productividad y rendimiento de xilitol los resultados muestran una diferencia entre la cepa nativa de *Candida* sp. y la cepa estándar *Candida kefyr*. Los resultados de la fermentación muestran que para la cepa nativa aislada de melón (*Candida* sp), la concentración de xilosa disminuye drásticamente, fundamentalmente en las doce primeras horas de fermentación en las que se consume hasta un 87,76% de la xilosa inicial, a las 18 horas se ha consumido un 89.38% y a las 48 horas el 99,96% de xilosa inicial, tiempo en el que prácticamente finaliza el proceso de fermentación.

La levadura *Candida* sp aislada de melón exhibe en consecuencia una alta capacidad de consumo y transformación de xilosa, pues es capaz de consumir casi el 100% de xilosa en breve tiempo. Este reducido periodo de tiempo para la producción de xilitol, por la levadura nativa resulta deseable sobre todo para procesos industriales, por lo que es necesario profundizar en estudios posteriores sobre la cinética de crecimiento de dicha levadura, así como sobre estudios de caracterización e identificación de la especie.

En la Figura 1 se registra el consumo de xilosa y la producción de xilitol por la cepa nativa *Candida* sp, proveniente de melón.

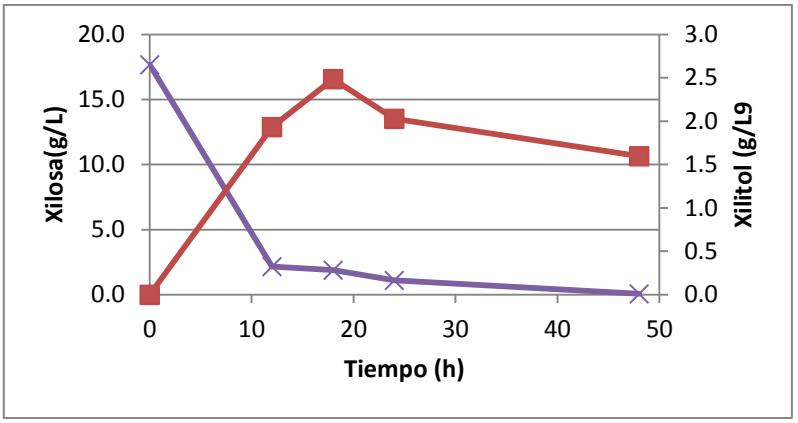



Figura 1 Consumo de xilosa y producción de xilitol por *Candida sp*. aislada de melón en hidrolizado de coronta de maíz.

En la figura se observa que, el consumo de xilosa y la producción e xilitol por *Candida* sp. se inician desde las primeras horas de la fermentación, lo cual indicaría que la producción de xilitol se encuentra relacionada con el crecimiento celular y es fuertemente influenciada por el consumo de oxígeno (Nigaml, P & Singh, D., 1995), la mayor concentración de xilitol se observa a las 18 horas del proceso de fermentación alcanzando 2,49 g/L, asimismo se aprecia que a partir de las 18 horas *Candida* sp. empieza a utilizar el xilitol acumulado cuando las concentraciones de xilosa fueron muy bajas (< 0.069 g//L), similares resultados fueron observados por Walther (2001) utilizando *Candida tropicalis*, consecuentemente los rendimientos de xilitol y productividad volumétrica se reportan a la concentración máxima del producto y no al final de la corrida.

De otro lado, la cepa estándar *Candida kefyr* también es eficiente en cuanto al consumo de xilosa, observándose un comportamiento similar, referente al consumo de xilosa y producción de xilitol, con la cepa nativa de *Candida* sp. ( ver figura 7) habiendo consumido el 82,18 % de xilosa a las 12 horas de iniciada la fermentación y a las 48 horas ha consumido el 99.32% de xilosa inicial, sin embargo la producción de xilitol es mayor, comparada con la cepa *Candida sp* aislada de melón.

En la Figura 2 se muestra el consumo de xilosa y la producción de xilitol por la cepa estándar *Candida Kefyr*, se observa que la máxima producción de xilitol se registra a las 24 horas de fermentación con un valor de 9.96 g//L, momento en el

que prácticamente ha sido agotada la xilosa. También se aprecia que *C. Kefyr* empieza a utilizar el xilitol acumulado, lo cual sugiere la activación de un sistema inducible para un crecimiento diaúxico (Walther, 2001).

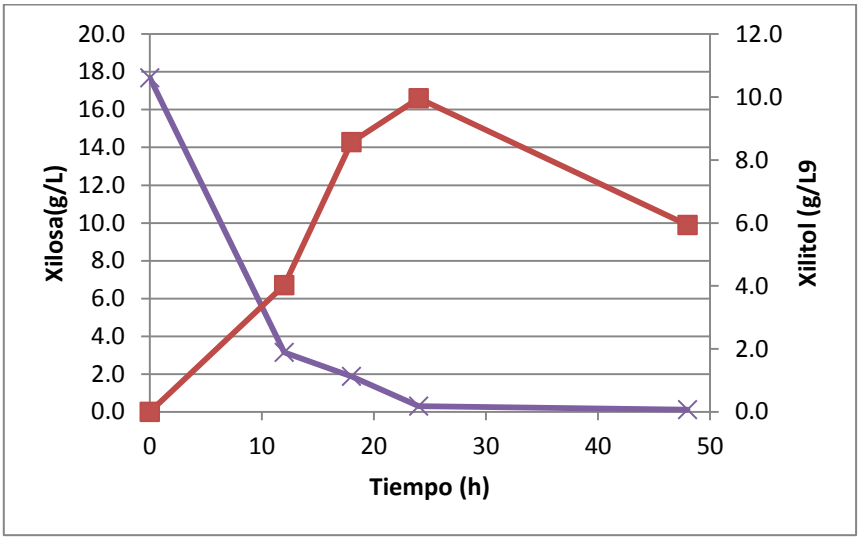



Figura 2 Producción de xilitol y consumo de xilosa por *Candida kefyr* en hidrolizado de coronta de maíz

La producción de xilitol empieza antes de las 12 horas; lo que indicaría que la cinética de producción de xilitol se encuentra relacionada con el crecimiento celular; considerando que prácticamente que la mayor fuente de carbono disponible en el medio es la xilosa procedente de la hidrólisis ácida del xilano, lo cual explicaría el rápido consumo de la misma, no observándose el efecto de represión por glucosa (Walther, *et al*. 2001).

Al final del proceso de fermentación la concentración de xilitol fue superior al observado en el caso de la cepa nativa alcanzando una concentración de 9.96 g//L, esto demuestra que la producción de xilitol está asociada al tipo de levadura y sus características (ver figura 9)

En la Figura 3, se reporta el consumo de xilosa comparativo por la cepa nativa y estándar, destacando el comportamiento similar de ambas levaduras y la alta velocidad de consumo del sustrato.

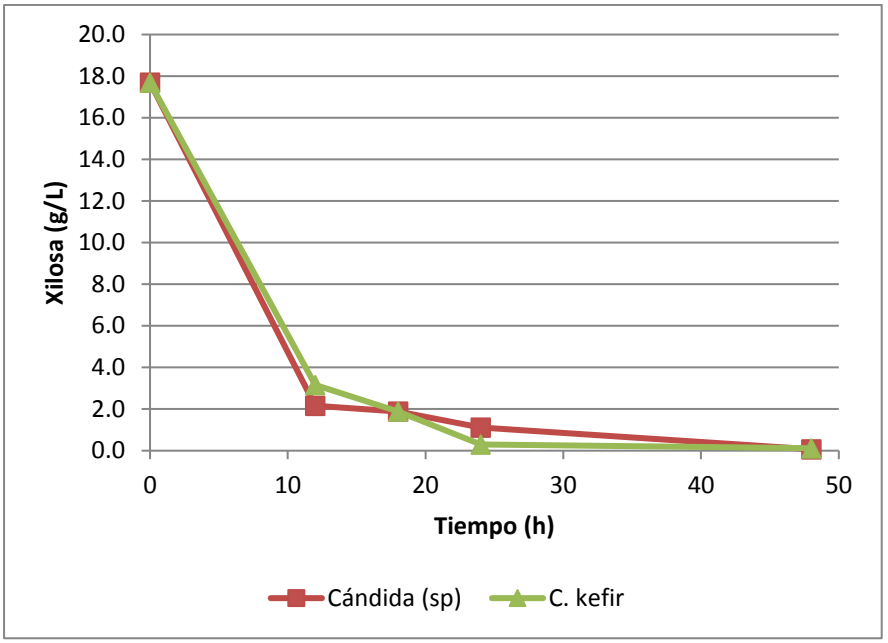



Figura 3 Consumo de xilosa por *Candida* sp. y *Candida kefyr*

La Figura 4 muestra la producción comparativa de xilitol por *Candida* sp. y *Candida kefyr* en hidrolizado de coronta de maíz, resaltando la mayor concentración de xilitol obtenida por la cepa estándar.

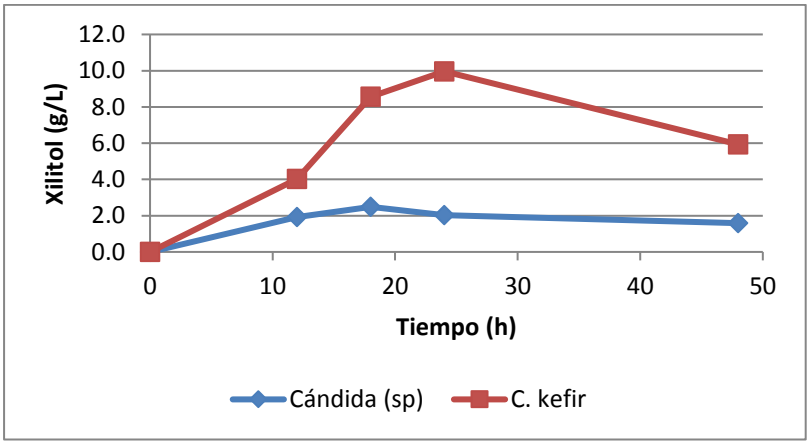



Figura 4 Producción de xilitol por *Candida* sp. *y Candida kefyr* en hidrolizado de coronta de maíz

Con respecto al rendimiento y productividad de xilitol los resultados muestran que *Candida* sp. produjo 2,49 g/L de xilitol en 18 horas a partir de 17,69 g/L de xilosa inicial con una productividad volumétrica máxima ($Q_p$) de **0.1610** g/Lh y un

rendimiento de xilitol máximo ($Y_{P/S}$) de **0.141** g/g a las 18 horas de fermentación en el hidrolizado bruto de coronta de maíz.

Con relación a la producción de xilitol *Candida kefyr* presenta un potencial importante para la obtención de xilitol a partir de hidrolizados de coronta de maíz bajo las condiciones evaluadas en esta investigación ya que a partir de 17,69 g/L de xilosa inicial produjo 9.96 g/L de xilitol en 24 horas con una productividad volumétrica máxima ($Q_p$) de **0.48** g/Lh y un rendimiento de xilitol máximo ($Y_{P/S}$) de **0.56** g/g a las 24 horas de fermentación.

Respecto a los parámetros fermentativos comparativos de la producción de xilitol por Candida *sp* aislada de melón y la levadura estándar *Candida kefyr* la Tabla 1 sintetiza los resultados de los rendimientos, productividades volumétricas, eficiencia de la conversión de xilosa en xilitol y rendimiento de xilitol por 100 g de materia prima.

Tabla 1 Parámetros fermentativos máximos de la producción de xilitol a partir de hidrolizado de coronta de maíz por *Candida sp* aislada de melón

| Levadura | Concentración de xilitol (g/L) | Yp/s (g/g) | Qp (g/lh) | η (%) | mg de Xilitol /100 g Ms |
|---|---|---|---|---|---|
| *Candida (sp)* | 2.4868 | 0.141 | 0.1610 | 15.41% | 621.7048 |
| *Candida Kefyr* | 9.9643 | 0.563 | 0.4761 | 61.75% | 2491.0837 |

Los resultados muestran un incremento significativo en el rendimiento de xilitol de 4,0 veces producido por *C. kefyr*, en comparación con la cepa nativa en el hidrolizado crudo de coronta, este incremento estuvo acompañado de un aumento en el tiempo del periodo de fermentación de 6 horas, asimismo, la productividad volumétrica de la cepa estándar supera en 2.96 veces a la cepa nativa (Candida *sp.)*, así mismo, la eficiencia de la conversión de xilosa en xilitol (η), asumiendo un valor teórico de 0.917 g/g (Barbosa, Medeiros, Mancilha, Schneider, & Lee., 1988), es mucho mayor en *Candida kefyr* alcanzando un 61,75% de rendimiento

teórico, en comparación con *Candida* sp. aislada de melón que alcanza un rendimiento teórico de sólo 15,41%.

El relativamente bajo rendimiento en xilitol observado por la cepa nativa *Candida* sp. puede atribuirse al hecho de que la xilosa haya sido utilizada principalmente en la producción de biomasa, y al hecho de que en el diseño del proceso de fermentación se utilizó el extracto no tratado de coronta de maíz, el mismo que se caracteriza por su contenido de inhibidores (furfural, hidroximetilfurfural, compuestos fenólicos, ácido acético), los que siempre están presentes como producto de la hidrólisis ácida de material hemicelulósico por la degradación de azúcares incluso en condiciones poco severas y que interfieren en el proceso de fermentación de la levadura nativa, inhibiendo el metabolismo microbiano, reduciendo el crecimiento celular y rendimiento del producto (Parajó *et al.* 1998; Silva y Roberto, 2001)

Sin embargo, resultados similares fueron obtenidos por otros investigadores utilizando cepas nativas así Herazo *et al.* (2011) evaluaron la capacidad para producir xilitol de una cepa nativa de *Candida guilliermondii* aislada del fruto del corozo chiquito (*Bactris guineensis)* sobre un sustrato hidrolizado de cascarilla de arroz, los resultados muestran que después de 120 horas de fermentación se obtuvieron 2,6 g/L de xilitol con una productividad volumétrica ($Q_p$) de 0,02 g/Lh y un rendimiento de sustrato en producto ($Y_{P/S}$) de 0,13 g/g.

Los rendimientos y productividades obtenidos en nuestra investigación para la Cepa estándar (Candida *kefyr*) son comparables con los obtenidos por Misra *et al.* (2013), quienes reportan la obtención de 10,29 g/L de xilitol en 60 horas a partir de 20,92 g/L de xilosa con un rendimiento de xilitol de 0,50 g/g bajo condiciones de hidrolizado optimizado de fibra de maíz con una combinación de ajuste de pH tratamiento con carbono activado y resinas de intercambio iónico, utilizando una cepa nativa de *Candida tropicalis.*

Mussato y Roberto (2001) reportaron que el ajuste de pH y el tratamiento con carbono activado combinados, producen una mejor detoxificación del hidrolizado hemicelulósico, incrementando la eficiencia de la conversión de xilosa en xilitol.

En nuestra investigación se efectuó la fermentación utilizando el hidrolizado crudo sin concentración del mismo ni detoxificación con carbono activado, ya que si bien es cierto diversas investigaciones han demostrado su efectividad en la remoción de compuestos fenólicos y furfural generados durante la hidrolisis ácida (Ge e*t al*, 2011) sin embargo, también se ha reportado la perdida de glucosa (28,4%), xilosa (18.3%) y arabinosa (8,6%) (Ge e*t al*, 2011 y ) por lo que a objeto de minimizar los costos económicos del proceso sólo se llevó a cabo la detoxificación por sobretitulación.

Vanegas et al (2004) aislaron y purificaron 25 cepas de levaduras de los géneros *Candida, Cryptococcus, y Rhodotorula*, siendo evaluadas en su capacidad para producir xilitol, en un medio de cultivo sintético, con un contenido de xilosa de 20 g/L y glucosa como suplemento, los resultados demuestran que las levaduras del género *Candida* son las mejores productoras de xilitol y entre ellas la más promisoria fue *Candida kefyr* con una producción de xilitol de 9.93 g/L de xilitol en un tiempo total de 30 horas, rendimiento de xilitol a partir de xilosa ($Y_{P/S}$) de 0,50 g/g y una productividad volumétrica de 0,33 g/Lh.

Nuestros resultados son comparables con los obtenidos por Vanegas *et al*. (2004), con la diferencia de que en nuestra investigación se utilizó un medio complejo con hidrolizado ce coronta de maíz sin tratamientos de detoxificación ni concentración al vacío en rotavapor. El rendimiento de conversión de sustrato en producto (Yp/s) alcanzado por *C. Kefyr* en este medio de fermentación, es similar al obtenido en el medio sintético lo que indica de una buena adaptación de la levadura al medio

Los resultados del análisis estadístico (ver anexo 2) muestran que el coeficiente de variación para cada una de las variables respuesta sometidas a la prueba de análisis de varianza resulto un valor superior al 50%, lo que indica que los datos tienen alta variabilidad.

Para todas las variables respuestas procesadas (producción de xilitol, producción volumétrica (Qp) y factor de conversión) el factor Levadura resultó altamente significativo, lo que refleja la existencia de diferencias altamente significativas entre las Levaduras con respecto a las repuestas medidas, siendo la Levadura estándar *Candida kefyr* la que, arrojó mayores valores de producción de xilitol, producción volumétrica (Qp) y factor de conversión de xilosa en xilitol (Yps).

Es importante señalar, que para todas las respuestas evaluadas la interacción cepa*tiempo resultó no significativa, lo que indica, que los factores cepa y tiempo son independientes.

El grado de asociación entre las variables resultó altamente significativo con signo positivo, es decir, existe una fuerte tendencia a un comportamiento directamente proporcional entre las variables en estudio.

## CONCLUSIONES

La hidrólisis ácido diluida de la coronta de maíz produjo un caldo rico en azúcares fermentables, siendo mayoritaria la xilosa en una concentración de 17,69 g/l, que corresponde a un rendimiento del 41.16% de la conversión de la fracción hemicelulósica del sustrato a xilosa, convirtiéndose en una fuente de azúcares reductores que podrían ser aprovechables para la producción de xilitol.

La cepa estándar, *Candida Kefyr*, fue capaz de producir xilitol vía fermentativa en las condiciones evaluadas, siendo la producción máxima de xilitol de 9,96 g/L obtenido después de 24 h de fermentación, con una productividad volumétrica de xilitol ($Q_p$) de 0,48 g/Lh y un rendimiento de sustrato en producto $Y_{p/s}$ de 0,56 g/g. lo cual demuestra que esta levadura tiene una buena capacidad fermentativa cuando se utiliza hidrolizado crudo de coronta de maíz (*Zea mays*) como medio de cultivo para la obtención de xilitol.

La cepa estándar *Candida kefyr* presenta comparativamente una mayor efectividad en la bioconversión de xilosa a xilitol, que la cepa nativa (*Candida* sp.*)*, registrando un rendimiento de sustrato en producto 4,0 veces mayor, una productividad volumétrica 2.96 veces superior y eficiencia de la conversión de xilosa en xilitol de 61,75% en comparación con *Candida* sp.

Bajo las condiciones desarrolladas en esta investigación la producción máxima de xilitol por *Candida* sp fue de 2,5 g/L obtenida después de 18 h de fermentación, con una productividad volumétrica de xilitol ($Q_p$) de 0,16 g/Lh y una eficiencia de conversión de en producto $Y_{p/s}$ de 0,141 g/g. De esta manera, la levadura nativa *Candida* sp. aislada del melón (*Cucumis melo*) puede ser utilizada para obtener xilitol a partir de hidrolizado crudo de coronta de maíz (*Zea mays*).

## RECOMENDACIONES

- Optimizar el proceso de hidrólisis ácida de la coronta de maíz para encontrar mejores n niveles de azucares reductores y rendimientos de conversión de xilosa a xilitol. También es pertinente realizar detoxificación del hidrolizado para reducir la producción de compuestos tóxicos que pueden actuar como inhibidores en el proceso fermentativo.

- Aplicar un diseño estadístico experimental por superficie de respuesta para optimizar las condiciones fermentativas como temperatura, pH, agitación, Aireación y concentración de inóculo que permitan incrementar los rendimientos en la concentración de azucares reductores y xilitol

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barbosa, M., Medeiros, M. d., Mancilha, I. M., Schneider, H., & Lee., H. (1988). Screening of yeasts for production of xilitol from D-xilose and some factors which affect xilitol yield in Candida guilliermondii. *Journal of Industrial Microbiology, 3*, 241-251.

Ge, J.-P., Cai, B.-Y., Liu, G.-M., Ling, H.-Z., Fang, B.-Z., Song, G., et al. (2011). Comparison of different detoxification methods for corn cob hemicelluose hydrolysate toimprove. *African Journal of Microbiology, 5*(10), 1163–1168.

Herazo C. Ruiz, D. A. (2011). Utilización de Candida guilliermondii aislada del corozo chiquito (Bactris guineensis) en la producción de xilitol. *Revista Colombiana de Biotecnología, 13*(1), 52-57.

Martínez E, Villareal M, Almeida J, A Solenzal. (2002). Uso de diferentes materias primas para la producción biotecnológica de xilitol. *CyTA - Journal of food, 3*, 295-301.

Ministerio de Agricultura y Riego. (2012). *Maíz amiláceo.* Lima.

Ministerio de Agricultura y Riego. (2015). *Boletín Mensual de Estadística Agraria.* Lima.

Misra, S., Raghuwanshi, S., y Saxena, R.K. (2013). Evaluation of corncob hemicellulosic hydrolysate for xylitol production by. *Carbohydrate Polymers, 92*, 1596– 1601.

Mussatto, S. I., & Roberto, I. C. (2001). Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by Candida guilliermondii. *Biotechnology Letters,*(23), 1681–1684.

Nigaml, P & Singh, D. (1995). Processes for Fermentative Production of Xylitol - a Sugar Substitute. *Process Biochemistry, 30*(2), 117-124.

Parajó, J.C., Domínguez, H. & Domínguez, J.M. (1998). Biotechnological production of xylitol. Part 3. *Bioresource Technology*(66), 25–40.

Pezoa Conte, R. M. (2010). Estudio de pretartamiento con ácido diluido y líquidos iónicos en residuos agrícolas para la producción de bioetanol de segunda generación. *Tesis para optar el gardos de magister en ciencias de la ingeniería, mención química*. Santiago de Chile.

Roberto, I. M. (2003). Dilute-Acid Hydrolysis for Optimization of Xylose Recovery from Rice straw in a Semi-Pilot Reactor. *Industrial Crops And Products*(17), 171-176.

Roberto,I. , Mussatto, S. y Rodrigues R. (2003). Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. *Industrial Crops and Products, 17*(3), 171–176.

Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*(27), 185-194.

Silva, C., Roberto, I. (2001). Optimization of xylitol production by Candida guilliermondii FTI-20037 using response surface methodology. *Process Biochemestry*(36), 1119-1124.

Silva, C., Silva, S., Roberto, I. (2005). Study of xylitol production by Candida guilliermondii on a bench bioreactor . *Journal of Food Engineering, 75* (1), 115-119.

Tada, K.; Horiuchi, J; Kanno, T y Kobayashi, M. (2004). Microbial Xylitol Production from Corn Cobs Using Candida magnoliae. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, 98*(3), 228–230.

Vanegas, I.A; Yepes, M. y Ruiz, O. (2004). Producción de xilitol a partir de levaduras nativas colombianas. *RevistaColombiana de Biotecnología, 6*(2), 31-36.

Vieira Canettieri, E., de Almeida e Silva, J. B., & de Almeida Felipe, M. d. (2002). Obtenção biotecnológica de xilitol a partir de cavacos de eucalipto. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 38*(3), 323-331.

Walther, T, Hensirisak, P. y Agblevor,F. (2001). The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by Candida tropicalis. *Bioresource Technology, 76*(3), 213–220.

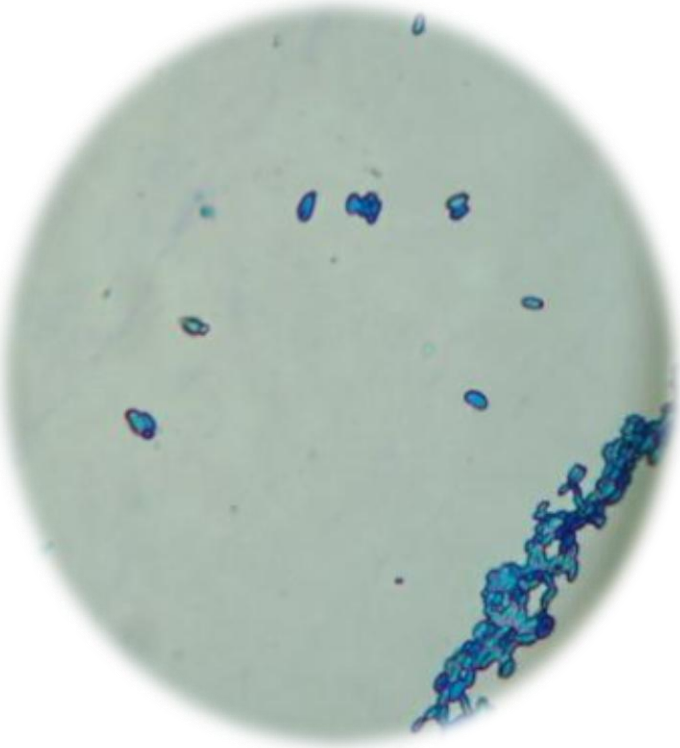
## ANEXOS

### Anexo A. Resultados comparativos del proceso fermentativo de C. Kefyr y *Candida* (s.p) nativa en la producción de xilitol

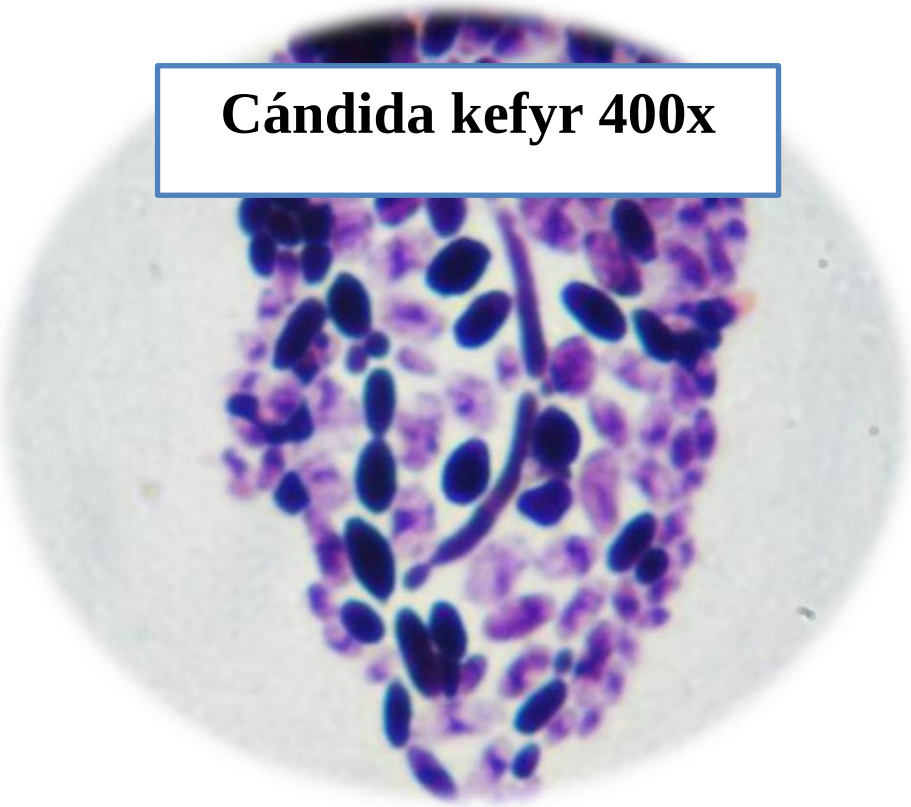
| Tiempo | CEPA | Concentración de xilosa (g/L) | P XILITOL (g/L ) | Productividad Volumétrica Qp (g/l*h) | (Yp/s) |
|---|---|---|---|---|---|
| **12** | K1T1 | **4.612** | 4.451 | **0.3709** | **0.252** |
| **18** | K1T2 | **4.496** | 8.623 | **0.4790** | **0.487** |
| **24** | K1T3 | **2.259** | 10.051 | **0.4188** | **0.568** |
| 48 | K1T4 | **0.380** | 4.314 | **0.0899** | **0.244** |
| **12** | K2T1 | 1.693 | 3.601 | **0.3000** | **0.204** |
| **18** | K2T2 | 1.499 | 8.519 | **0.4733** | **0.481** |
| **24** | K2T3 | 0.213 | 9.878 | **0.4116** | **0.558** |
| 48 | K1T4 | 0.207 | 7.563 | **0.1576** | **0.427** |
| **12** | N1T1 | 1.467 | 1.394 | **0.1161** | **0.079** |
| **18** | N1T2 | 0.994 | 1.454 | **0.0808** | **0.082** |
| **24** | N1T3 | 1.819 | 3.417 | **0.1424** | **0.193** |
| 48 | N1T4 | -0.001 | 0.424 | **0.0088** | **0.024** |
| **12** | N2T1 | 2.865 | 2.470 | **0.2058** | **0.140** |
| **18** | N2T2 | 2.763 | 3.520 | **0.1956** | **0.199** |
| **24** | N2T3 | 0.398 | 0.641 | **0.0267** | **0.036** |
| 48 | N2T5 | -0.051 | 0.602 | **0.0125** | **0.034** |

Anexo B

Observacion microscópica de *Candida kefyr* .



**Cándida kefyr 400x**





**Cándida kefyr**

**1000 x**

## 3.3 Evaluación de las condiciones óptimas de hidrólisis y fermentación para la obtención de bioetanol a partir de residuos de maíz


**RESUMEN**

El objetivo del presente estudio fue la evaluación de las condiciones óptimas de la hidrólisis ácida diluida e hidrólisis enzimática de residuos de maíz para maximizar el contenido de azucares fermentables, así como la obtención de etanol a partir de un medio sintético por fermentación Batch con una cepa estándar *Pichia stipitis*, para lo cual se realizó la caracterización físico química de una mezcla de coronta y hojas de maíz así como se efectúo la hidrólisis ácida y enzimática de residuos de maíz y fermentación en medio sintético evaluándose la influencia de la aireación, agitación y composición del mosto mediante un diseño de experimento factorial $2^3$, con punto central. El estudio fermentativo se realizó durante 48 horas y el tamaño de inóculo de la levadura fue de 1 g/l.

Los resultados muestran que la mayor concentración y rendimiento de glucosa (11.59 g/l y 11.55 g/100 gramos de materia prima inicial, respectivamente) obtenidas en la hidrólisis acida y enzimática corresponden a las condiciones de concentración de sólido pre tratado 5%, temperatura 50°C, velocidad de agitación 150 rpm y 24 hrs.



**Palabras clave**: Coronta de maíz, etanol, hidrólisis ácida diluida, *Pichia stipitis*

## INTRODUCCIÓN

La preocupación por el agotamiento de las reservas de combustibles fósiles, las fluctuaciones del precio del petróleo y el cambio climático vienen conduciendo a la búsqueda de nuevas fuentes de energía renovable, como los biocombustibles. En este contexto el etanol de segunda generación (producido a partir de materiales lignocelulósicos) recibe gran atención, debido a los bajos costos de los residuos de material lignocelulósico y su posibilidad de utilización de este en mezcla con la gasolina.

Los residuos lignocelulósicos constituyen una biomasa rica en polímeros de celulosa y hemicelulosa entre 75-80%, los cuales pese a su dificultosa degradación, es posible mediante procesos químicos, físicos y/ó biológicos desdoblarlos a azucares monosacáridos para su posterior conversión a etanol (Sánchez, 2010).

En este contexto entre los residuos agrícolas lignocelulósicos más abundantes en la zona sierra del Departamento de Ancash se encuentran los residuos de maíz (mazorca o coronta, chala) los mismos que no tienen un uso productivo, por el contrario, este material habitualmente es quemado y muy pocas veces incorporado al suelo y pocos agricultores lo utilizan como forraje, desaprovechando, de ese modo, grandes volúmenes de biomasa y fuente energética.

Numerosos estudios se han realizado para la producción de bioetanol, fundamentalmente a partir de caña de azúcar, siendo poco explorada la viabilidad de producción de etanol a partir de los residuos de maíz por lo que el objetivo principal del presente estudio fue la evaluación de las condiciones óptimas de hidrólisis y fermentación para la obtención de bioetanol a partir de residuos de maíz.

Los Objetivos específicos fueron:

- Estudiar la composición físico-química de los residuos de maíz
- Evaluar las condiciones óptimas de operación de la hidrólisis ácida para la obtención de azúcares reductores a partir de residuos de maíz
- Evaluar las condiciones óptimas de operación de la hidrólisis enzimática para la obtención de azúcares reductores a partir de residuos de maíz.

- Evaluar las condiciones óptimas para la obtención de etanol por *Pichia stipitis* a partir de un medio simulado de hidrolizado de coronta de maíz.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Caracterización de la materia prima

La materia prima estuvo constituida de una mezcla de residuos lignocelulósicos de maíz compuesta por 50% de coronta o mazorca y 50% de hoja, obtenida en el mercado de la provincia de Carhuaz.

La muestra de materia prima fue sometida a un proceso de secado, colocándose para ello en una estufa (Estufa universal, marca Memmert. modelo UF55 PLUS,) a 60ºC por 48 horas para disminuir su humedad y evitar la descomposición de la misma. Luego se pasó al proceso de molienda para lo cual se empleó un molino de cuchillas alcanzando el tamaño final promedio del material aproximadamente de 2 mm. Finalmente el material se almacenó a temperatura ambiente en recipientes de plástico herméticamente cerrados.

La caracterización físico química se realizó en bases a las técnicas analíticas del *National Renewable Energy Laboratory* – NREL, se desarrollaron diferentes ensayos a las muestras de la materia prima, analizándose el porcentaje de humedad, la determinación del contenido de extractivos etanólicos y la determinación del contenido de extractivos acuosos. Cada una de las técnicas se realizó por triplicado (Anexo 1 y 2).

Para la caracterización de la materia prima libre de extractivos se realizó la técnica PULS, (Sluiter *et al.*, 2008) (Anexo 3).

### Hidrólisis ácida y enzimática

Luego de la caracterización de la materia prima y la determinación del contenido de extractivos etanólicos y acuosos se realizó una hidrólisis ácida diluida con $H_2SO_4$ y una hidrólisis enzimática utilizando para ello enzimas comerciales.

Para la realización del pretratamiento químico de la materia prima se empleó una autoclave (vertical automatizada Modelo AVDA. Marca Biogen) por 1 hora a 120 psi.

En esta etapa del proceso se estudió la influencia de variables operacionales: % de ácido, temperatura, tiempo y relación sólido/líquido, aplicando para ello un diseño de experimento factorial fraccionado del tipo $2^{4-1}$ (Adler *et al.*, 1973), con 3 réplicas del punto central. En la tabla 1 mostramos las variables evaluadas, sus límites inferiores y superiores.

Tabla 4. Variables a evaluar en la etapa de Hidrólisis Ácida Diluida (HAD)

| Variables | Límite inferior | Límite superior | Punto Central |
|---|---|---|---|
| **X1: *Ácido (% v/v)*** | 1 | 2 | 1.5 |
| **X2: *Temperatura (º C)*** | 120 | 160 | 140 |
| **X3: *Tiempo (minutos)*** | 20 | 60 | 40 |
| **X4: *Relación Sólido/líquido (g/ml)*** | 1/10 | 1/20 | 1/15 |

Para el proceso de hidrólisis enzimática se utilizó un complejo de enzimas tipo NOVOZYMES Cellic®CTec2 VCN10005 compuesta por celulasas y xilanasas. La hidrólisis enzimática es un proceso catalizado por un grupo de enzimas denominadas genéricamente celulasas, que constituyen una mezcla de distintas actividades enzimáticas cuya acción de manera conjunta resultan en la degradación de la celulosa (Anexo 5).

Para este proceso se tuvo en cuenta las siguientes condiciones:

- Concentración: 5% de sólido pretratado
- Buffer acetato de sodio (pH 4.8): 25 ml
- Temperatura: 50°C
- Velocidad de agitación: 150 rpm
- Tiempo: 24 horas
- Volumen de enzimas: 4%

Para la obtención de los resultados de la aplicación de la Hidrólisis ácida diluida (HAD) y la hidrólisis enzimática (HE) a los residuos del maíz, se determinaron las concentraciones y rendimientos en base a la materia prima inicial de los azúcares convertidos, y el rendimiento de líquidos y sólidos obtenidos luego del pretratamiento.

**Medios de cultivo y condiciones**

Se trabajó con la levadura *Pichia stipitis* y el medio de cultivo para el crecimiento de la misma es el encargado de suministrar los minerales y fuentes de nutrientes que necesita para crecer y desarrollarse (Shupe *et al.*, 2012). Ejemplo de los compuestos más utilizados en la preparación de medios de cultivo se encuentra: extracto de levadura, peptona, xilosa y agar, además solución de vitaminas y solución de trazas metálicas, y sales como $KH_2PO_4$, $(NH_4)_2SO_4$ y $MgSO_4*7H_2O$.

Los compuestos que integran el medio de crecimiento empleado en nuestra investigación, así como la concentración de estos para el desarrollo de la misma se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1**. Componentes del medio de crecimiento y concentración

| Componentes | Concentración (g/l) |
|---|---|
| *Extracto de levadura* | 5 |
| $NH_4Cl$ | 1 |
| $KH_2PO_4$ | 1 |
| $MgSO_4*7H_2O$ | 0.5 |
| *xilosa* | 30 |

Las condiciones para el crecimiento de la levadura utilizada, es uno de los aspectos más importantes para lograr el éxito de la fermentación. La literatura plantea que la temperatura es una de las variables o parámetros de mayor influencia en su comportamiento. Según estudios realizados utilizando la levadura *Pichia stipitis*, se obtienen mejores resultados cuando se trabaja a valores de temperatura entre 25 y 33 °C (Agbogbo, 2008). Este mismo autor plantea que el rango óptimo de

trabajo de la levadura está comprendido entre 4.5 y 5.5 valores de pH, fuera de este el desarrollo o desenvolvimiento no es el mejor.

La velocidad de agitación puede influir positiva o negativamente en el proceso de crecimiento, favoreciendo este o demorándolo. Para la *Pichia stipitis* se han analizado velocidades de agitación en valores de 50, 150 y 300 rpm (Shupe *et al.*, 2012). Los valores de rendimientos arrojados fueron mejores a 150 rpm obteniendo 29.7 g/l de etanol a las 120 horas, aunque también es muy común trabajar a 200 rpm (Silva *et al.*, 2011).

Otra variable influyente en el desarrollo del microorganismo es la razón de aireación. Empleando la *Pichia stipitis* se obtienen valores de rendimiento de 15 g/l y productividad de 0.35 g etanol/g sustrato para condiciones micro-aeróbicas, mientras que para condiciones aeróbicas se alcanza una productividad de 0.25 g/g (Furlan *et al.*, 1994).

**Condiciones de la Fermentación**

Para identificar las condiciones de operación óptimas para la producción por vía microbiana de etanol  a partir de la xilosa obtenida de la coronta de maíz amiláceo realizamos una fermentación de sustrato sintético.

El proceso de la fermentación es la operación referida al crecimiento de la levadura, donde desarrolla su metabolismo consumiendo los azúcares presentes en el medio y produciendo como principal producto el etanol.

Se realizó una fermentación de sustrato sintético que en nuestro caso las variables estudiadas fueron: temperatura, velocidad de agitación, aireación y relación de la composición de mezcla de azúcares en el medio. El estudio fermentativo se realizó durante 48 horas y el tamaño de inóculo de la levadura es 1 g/l.

Teniendo en cuenta los resultados alcanzados por la literatura especializada y la composición de la mezcla de los residuos de maíz estudiados, se confecciona un medio sintético para la obtención de etanol.

Tabla 2**. Componentes del medio de fermentación y concentración**

| Componentes | Concentración (g/l) |
|---|---|
| *Extracto de levadura* | 5 |
| $NH_4Cl$ | 1 |
| $KH_2PO_4$ | 1 |
| $MgSO_4*7H_2O$ | 0.5 |
| *peptona* | 5 |
| *Azúcares (xilosa/glucosa)* | 20 |
| ***Sln. elementos trazas*** | 1 ml/l |
| $CuSO_4*5H_2O$ | 2.5 |
| $MnSO_4*7H_2O$ | 1.69 |
| $ZnSO_4*7H_2O$ | 2.87 |
| $H_2SO_4$ *concentrado* | 0.2 ml |

En la fermentación en medio sintético se evaluó la influencia de variables mediante un diseño de experimento factorial $2^3$, con punto central (Adler *et al.*, 1973).

**Tabla 3**. Rango de variables evaluadas

| Variables | Límite inferior | Límite superior | Punto Central |
|---|---|---|---|
| **X1:** ***Agitación (rpm)*** | 150 | 250 | 200 |
| **X2:** ***Aireación (v/v)*** | 2.5 | 5 | 3.33 |
| **X3:** ***Composición de mezcla G/X (%)*** | 25/75 | 75/25 | 50/50 |

El tamaño de inóculo para las fermentaciones de medios compuestos por azúcares sintéticos es de 1 g/l, (Anexo 6). El muestreo se realiza cada 4 horas durante 24 horas de monitoreo de la operación, y para el seguimiento de esta se determinaron los siguientes parámetros:

- consumo de azúcares (técnica HPLC)
- producción de etanol (técnica HPLC)

**Métodos Analíticos**

Las concentraciones de glucosa, xilosa y etanol en el hidrolizado se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando un Cromatografo liquido AGILENT, modelo 1260 con una columna cromatográfica Agilent HI-PLEX H, 7,7 X 300 mm, 8 µm bajo las siguientes condiciones de operación: eluyente, Ac. Sulfúrico 0,005 M; temperatura del detector 55 ºC; volumen de muestra, 20 µL; flujo, 0,7 mL/min; presión en la columna, 4,6 MPa (46 bar, 670 psi); sistema de detección, índice de refracción (IR), como estándares glucosa, xilosa y xilitol (Sigma ®).

La identificación del metabolito se efectúa mediante los tiempos de retención, y la cuantificación se realiza mediante la integración de las áreas de los picos referidas al valor correspondiente de la solución estándar.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización de la materia prima

Los resultados de la caracterización físico-química de la mezcla de hoja y coronta de maíz utilizada presenta un 10.16% de humedad. El contenido de extractos acuosos es de 9.87 y el contenido de extractos etanólicos fue de 2.32%. La composición de azúcares de la materia prima empleada fue de 30.3% de glucosa referido a la materia prima inicial y 21.49 % de xilosa. La lignina representa un 16.17% de la materia inicial y la ceniza solo 1.1%.

### Hidrólisis ácida y enzimática

En la Tabla 2 se muestran los resultados de la aplicación de la Hidrólisis ácido diluida (HAD) a los residuos del maíz.

Tabla 4 **Resultados de la aplicación de la Hidrólisis Ácida Diluida**

| | Diseño experimentos | | | | Caracterización de sólidos | | Caracterización líquidos | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| EXP | X1 | X2 | X3 | X4 | Glucosa (%) | Xilosa ( %) | Glucosa (%) | Xilosa (%) |
| | (% ácido) | (°C) | (min) | (R s/l) | Ref inicial | Ref inicial | 100 g inicial | 100 g inicial |
| ***1*** | + | + | + | + | 11.66 | 0.34 | 4.88 | 21.03 |
| ***2*** | + | + | - | - | 10.45 | - | 1.27 | 6.2 |
| ***3*** | + | - | + | - | 13.42 | 2.88 | 1.53* | 2.66* |
| ***4*** | + | - | - | + | 11 | 1.7 | 0.81 | 12.86 |
| ***5*** | - | + | + | - | 5.98 | - | 2.04* | 4.12* |
| ***6*** | - | + | - | + | 13.3 | 2.21 | 4.86* | 9.28* |
| ***7*** | - | - | + | + | 9.69 | 0.99 | 7.81* | 18.11* |
| ***8*** | - | - | - | - | 13.69 | 2.43 | 3.69 | 8.68 |

***:** Poshidrólisis

Los valores están reportados en g/100 g de materia prima inicial

Como se observa después de realizada la HAD, los niveles de xilosa en el sólido son inferiores al 3%, evidenciando como primera conclusión que la HAD es selectiva a la eliminación de la fracción xilano en la biomasa lignocelulósica.

Los resultados obtenidos a partir de los líquidos hidrolizados, muestran los experimentos 3, 5, 6 y 7 con valores de rendimiento de glucosa y xilosa aceptables después de realizada la etapa de poshidrólisis (Anexo 6). En el caso del experimento 7, el 88% de la xilosa obtenida es a través de realizar la poshidrólisis y en el experimento 6 el 60%, significando el empleo de la poshidrólisis la adición de una etapa más al proceso de obtención de etanol a partir de materiales lignocelulósicos, con el gasto de más materias primas, consumo de energía y equipamiento a utilizar, por lo que la aplicación de esta etapa debe estar muy bien justificada a la hora de toma de decisiones al respecto.

Los resultados de la hidrólisis enzimática a los sólidos pretratados luego de la HAD se muestran en la Tabla 3. Como se puede observar el experimento 8 es el que presentó la mayor concentración y rendimiento de glucosa (11.59 g/l y 11.55 g/100 gramos de materia prima inicial, respectivamente.

**Tabla 5**. Resultados de la hidrólisis enzimática

| EXP | X1 (% ácido) | X2 (°C) | X3 (min) | X4 (R s/l) | Glucosa g/l | Glucosa % 100 g materia prima | Rendimiento Glucosa Enzimática (%) | Xilosa (g/l) | Xilosa % 100 g materia prima |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***1*** | + | + | + | + | 2.23 | 2.17 | 18.59 | 0.55 | 0.54 |
| ***2*** | + | + | - | - | 6.00 | 6.13 | 58.66 | 1.45 | 0.15 |
| ***3*** | + | - | + | - | 6.5 | 13.61 | 72.46 | 3.55 | 0.53 |
| ***4*** | + | - | - | + | 4.82 | 5.97 | 54.23 | 2.20 | 0.27 |
| ***5*** | - | + | + | - | 5.39 | 5.19 | 86.76 | 1.93 | 0.19 |
| ***6*** | - | + | - | + | 5.98 | 6.62 | 10.4 | 2.37 | 0.02 |
| ***7*** | - | - | + | + | 5.72 | 6.27 | 64.68 | 1.39 | 1.53 |
| ***8*** | - | - | - | - | 11.59 | 11.55 | **84.38** | 2.43 | 4.12 |

Para el análisis estadístico de los resultados contenidos en las tablas anteriores se ha utilizado el software statistix 8, en aras de conocer las variables del diseño que influyen en los parámetros respuestas seleccionados: rendimiento de xilosa en el líquido (g/100 g) y rendimiento de glucosa enzimática (g/100g). Estos parámetros son los que describen el aporte de los azúcares, tanto por la HAD como por la hidrólisis enzimática, por tal motivo fueron los seleccionados para la evaluación.

Los resultados muestran que las variables significativas para el parámetro respuesta rendimiento de xilosa en el líquido fue la relación sólido: líquido. Mientras para el rendimiento de glucosa enzimática ninguna de las variables analizadas resultaron significativas. No obstante, la temperatura y la relación sólido: líquido son las que mayor influencia ejercen sobre este parámetro respuesta.

Con los resultados obtenidos se prevé para futuras etapas de la investigación, continuar trabajando con el líquido y el sólido pretratado del experimento 8, ya que en este caso se obtiene un sólido con rendimiento enzimático de glucosa superior al 80% en 24 horas, y el líquido presenta valores de rendimiento de xilosa cercanos al 9% sin aplicar la poshidrólisis.

**Resultados de la fermentación en medio sintético**

En la fermentación del medio simulado se emplea la levadura *Pichia stipitis*, capaz de fermentar pentosas de 5 átomos de carbono como la xilosa. En este proceso se estudia la influencia de variables operacionales en aras de encontrar las mejores condiciones a las que la levadura produce etanol. Las variables estudiadas fueron la agitación, el factor aireación y la composición de mezclas de azúcares en valores porcentuales. Las concentraciones de etanol alcanzadas en cada punto del diseño se muestran en la Tabla 4, así como los valores de rendimientos alcanzados referidos al valor teórico y la productividad.

Tabla 6. **Resultados de la fermentación sintética**

| EXP | X1 (rpm) | X2 (v/v) | X3 (G/X%) | Conc. Etanol (g/l) | Rdto. Ref. teórico % | Productividad (g/l*h) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ***1*** | + | + | + | 1.31 | 12.91 | 0.05 |
| ***2*** | + | + | - | 3.74 | 36.72 | 0.16 |
| ***3*** | + | - | + | 3.65 | 35.86 | 0.15 |
| ***4*** | + | - | - | 6.66 | 65.30 | 0.28 |
| ***5*** | - | + | + | 1.39 | 13.63 | 0.06 |
| ***6*** | - | + | - | 4.29 | 42.10 | 0.18 |
| ***7*** | - | - | + | 4.17 | 40.94 | 0.17 |
| ***8*** | - | - | - | ***6.72*** | ***65.92*** | ***0.28*** |

Como se observa en la tabla 4 la mayor concentración de etanol se alcanza cuando las variables evaluadas se encuentran en su valor inferior.

Teniendo en cuenta los resultados, las variables que ejercen mayor influencia, son la composición de los medios y la aireación. Los mejores valores se alcanzan para los niveles inferiores de las variables evaluadas, velocidad de agitación 150 rpm, aireación de 2.5 v/v y mayor porciento de xilosa en la mezcla.

En la literatura consultada se reportan valores de rendimiento de etanol en medios sintéticos de 0.47 g/g a 160 rpm, aireación de 0.1 v/v, mezclas de 25 y 50 g/l de xilosa y glucosa respectivamente, durante 40 horas de monitoreo empleando la levadura *Pichia stipitis.* En el caso del mejor resultado obtenido en este estudio, el rendimiento alcanzado es de 0.34 g/g, la diferencia entre los resultados puede estar dada por las diferentes condiciones de operación y nutricionales empleadas.

Existen diversas estrategias que pueden implementarse para enfrentar el problema de la inhibición de la fermentación de los hidrolizados lignocelulósicos. En primer lugar, una correcta selección de las condiciones del pretratamiento permite minimizar la formación de inhibidores.

Una segunda opción es la detoxificación, o sea, la remoción de los inhibidores de los hidrolizados antes de la fermentación (Martínez *et al.*, 2002). Para la elección de la estrategia o método de detoxificación se debe tener en cuenta la composición del hidrolizado y el tipo de inhibidores que predomina en este. Investigaciones confirman que la adición de $Ca(OH)_2$ es el método más eficiente para hidrolizados de maderas blandas. El tratamiento con $Ca(OH)_2$ puede propiciar la eliminación de compuestos tóxicos por precipitación, conversión a formas no tóxicas y/o adición de alguna sustancia que mejore la fermentabilidad de los hidrolizados (Ranatunga *et al*, 2000).

**Conclusiones**:

La composición de azúcares de los residuos de maíz empleados fue de 30.3% de glucosa referido a la materia prima inicial y 21.49 % de xilosa.

Las concentraciones de xilosa en el residuo sólido pre tratado por HAD son inferiores al 3%, evidenciando que este proceso es selectivo a la eliminación de la fracción xilano en la biomasa lignocelulósica.

En la HAD la variable independiente de mayor influencia fue la relación sólido líquido ($p<0.05$) sobre el parámetro respuesta rendimiento de xilosa en el líquido, en tanto que para el rendimiento de glucosa las variables estudiadas no resultaron significativas; no obstante, las de mayor influencia fueron: la temperatura y la relación sólido líquido. Ambos parámetros respuestas aumentan cuando las variables significativas o influyentes son usadas el nivel inferior de los rangos estudiados.

El tratamiento 8 del diseño del pre tratamiento con hidrólisis ácida diluida e hidrólisis enzimática es el que presentó mayor concentración y rendimiento de glucosa y por tanto mayores potencialidades para la fermentación del hidrolizado de los residuos hemicelulósicos y obtención de etanol.

Las condiciones de operación más adecuadas para llevar a cabo un proceso fermentativo con medio sintético y *pichia stipitis* y producción de etanol fueron composición del medio con una relación glucosa/xilosa de 25/75%, agitación de 150 rpm y aireación de 2.5 (v/V). La aireación y composición del medio fermentativo son las variables que resultaron significativas sobre los parámetros respuestas: concentración y rendimiento de etanol.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Adler, J. (1973). A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by Escherichia coli.*Microbiology*, *74*(1), 77-91.

Affleck, R. P. (2000). Recovery of xylitol from fermentation of model hemicellulose hydrolysates using membrane technology.

Agbogbo, F. K., & Coward-Kelly, G. (2008). Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, Pichia stipitis. *Biotechnology letters*, *30*(9), 1515-1524.

Balat, M., 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. Energy, Conversion and Management. 52, 858 – 875.

Bellido, C., 2013. Obtención de bioetanol 2G a partir de hidrolizados de paja de trigo. Fermentación conjunta de los penta y hexa carbohidratos con *pichia stipitis.*

Calero Silva, M. S. (2011). Investigación del potencial de los subproductos del proceso de obtención de etanol lignocelulósico para la producción de biogás mediante fermentación anaerobia y su análisis por cromatografía de gases.

Canilha, L. and Mussatto, S.I. Uso de diferentes materias primas para la producción biotecnológica de xilitol. Cienc. Technol. Aliment. Vol. 3, Nº 5: 295-301. Agosto 2002.

Choi, J.-H.; Moon, K.-H.; Ryu, Y.-W. and Seo, J.-H. 2000. Production of xilitol in cell recycle fermentations of Candida tropicalis. Biotechnology Letters. 22: 1625-1628.

Furlan, S. A., Bouilloud, P., & De Castro, H. F. (1994). Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. *Process Biochemistry*, *29*(8), 657-662.

Johansson, B.; Christensson, C.; Hobley, T.; Hahn- Hägerdal, B.: Xylulokinase overexpression in two strains of Saccharomyces cerevisiae also expressing xylose reductase and xylitol dehydrogenase and its effect on fermentation of xylose and lignocellulosichydrolysate, Appl. Environ. Microbiol., 67, 4249-4255, 2001

Kiyoshi T., Jun-Ichi H., Tohru K., And Masayoshi K.: Microbial Xylitol Production from Corn Cobs Using *Candida magnoliae*. Journal of Bioscience and Bioengineering Vol. 98, No. 3, 228 – 230. 2004.

Martínez E, Villareal M, Almeida J, A Solenzal. «Uso de diferentes materias primas para la producción biotecnológica de xilitol.» *CyTA - Journal of food* 3 (2002): 295-301.

Murthy, G.S.; Sridhar, S.; Shyam Sunder, M.; Shankaraiah, B.; RamaKrishna, M. Concentration of xylose reaction by nanofiltration for the production of xylitol sugar alcohol. Separation and Purification Technology 44, 205-211. Febrero 2005.

Pezoa R. «Estudio de pretratamiento con ácido diluido y líquidos iónicos en residuos agrícolas para la producción de bioetanol de segunda generación .» *Tesis para optar el gardos de magister en ciencias de la ingeniería, mención química.* Santiago de Chile, 2010.

Ranatunga, T. D., Jervis, J., Helm, R. F., McMillan, J. D., & Wooley, R. J. (2000). The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics: the role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics.*Enzyme and microbial technology*, *27*(3), 240-247.

Rangaswamy, S., & Agblevor, F. (2002). Screening of facultative anaerobic bacteria utilizing D-xylose for xylitol production. *Applied microbiology and biotechnology*, *60*(1-2), 88-93.

Sanchez, A. M.;I Gutiérrez, A. I.; Muñoz, J. A. y Rivera Barrero, C. A. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Tumbaga,* (5), 61-91.

Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S., Aikat, K., 2012. "Bioethanol production from agricultural wastes: An overview." Renewable Energy 37, 19-27.

Shupe, A. M., & Liu, S. (2012). Effect of agitation rate on ethanol production from sugar maple hemicellulosic hydrolysate by Pichia stipitis. *Applied biochemistry and biotechnology*, *168*(1), 29-36.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2008). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory analytical procedure*, *1617*.

Zu S., Li W., Zhang M., Li Z., Wang Z., Jameel H. & Chang H. (2013). Pretratamiento de residuos de maíz para la producción de azúcares con ácido clorhídrico seguido de cal. Elsevier, 34, 366. doi:10.1016/j.conbuildmat.2012.02.014.

## ANEXOS

### *Anexo 1. Determinación del contenido de humedad*

Se pesan 2 gramos de muestra en 3 crisoles de porcelana, limpios y previamente tarados, utilizando para ello una balanza analítica RADWAG. Se transfiere la muestra a una estufa MEMMERT previamente calentada a 135°C, manteniéndose a esta temperatura durante un tiempo de 2 horas. Luego se enfrían en desecador y se pesan.

***Anexo 2. Determinación del contenido de extractivos acuosos y etanólicos***

Tarar los balones previamente secados durante 3 horas a 105˚C en estufa MEMMERT. A estos se le añaden 200 ml de agua destilada o etanol, según la extracción. Se pesan aproximadamente 2 gramos de la muestra, anteriormente molida y tamizada, en un dedal de extracción usando para esto una balanza analítica RADWAG, la muestra pesada se conecta a un equipo Soxhlet, y comienza la extracción por espacio de 24 horas. Luego, los balones que poseen el extracto se pasan a una estufa MEMMERT por 2 horas a 50°C y se aumenta la temperatura hasta 105°C hasta lograr sequedad total.

Al llegar a estas condiciones se enfría en desecador y se pesa hasta que el peso se mantenga constante.

***Anexo 3. Análisis PULS***

Se pesan 0.3 g en base seca de la muestra de materia prima libre de sustancias extraíbles. Se le adiciona 3 ml de $H_2SO_4$ al 72% y se coloca en un baño maria MEMMERT regulado a 30˚C durante 1h, agitando por espacios de 10 minutos. Se trasvasa cuantitativamente el sólido hidrolizado en condiciones ácidas fuertes, y se procede a la hidrólisis ácida diluida utilizando para ello 84 ml de agua destilada durante el trasvase a frascos herméticos. Estos frascos son llevados al autoclave Biogen, programación de 1h a 120 ˚C, trascurrido este tiempo las muestras son enfriadas en un baño con hielo y luego filtradas en un filtro Millipore, utilizando para esto una bomba de vacío.

Luego de tener el líquido necesario para la evaluación de muestras en el HPLC, se procede a obtener el sólido con la menor cantidad de líquido permisible. El líquido obtenido de la filtración se neutraliza utilizando 0.1g de $CaCO_3$ por cada 1 ml de líquido a neutralizar. Se centrifuga la muestra en centrífuga CENTURION. a 4000 rpm y 20 minutos, se decanta el sobrenadante y se inyecta en HPLC AGILENT 1260 para el análisis de componentes y sus concentraciones.

El sólido obtenido es separado con extremo cuidado, incluyendo la membrana de nitrocelulosa, y pasado a crisoles, previamente secos y tarados, estos se colocan en una estufa MEMMERT durante 24 horas a 105ºC, luego de este tiempo se deseca y se pesa. Para determinar el contenido de lignina la muestra es transferida a una mufla a 500˚C por espacio de 3 horas, luego se enfría en desecador y se pesa para, por diferencia de peso, determinar el contenido de cenizas.

***Anexo 4. Cálculos de la hidrólisis enzimática***

***Cálculo para volumen del buffer que se necesita***

- # Experimentos * g de sólido pretratado = g sólido pretratado total
- # Experimentos * ml solución Enzimática de cada experimento = ml de solución de enzimas total

***Cálculo para volumen de enzimas***

- Complejo enzimático: 4% del volumen total de solución enzimática para los puntos del experimento.

***Anexo 5. Preparación del inóculo***

Se conforman 5 medios donde crecerá la levadura empleada, erlenmeyers de 250 ml, con 50 ml de medio por cada uno. Estos se ponen en incubadora con shaker GFL a 30 °C y 200 rpm durante 48 horas.

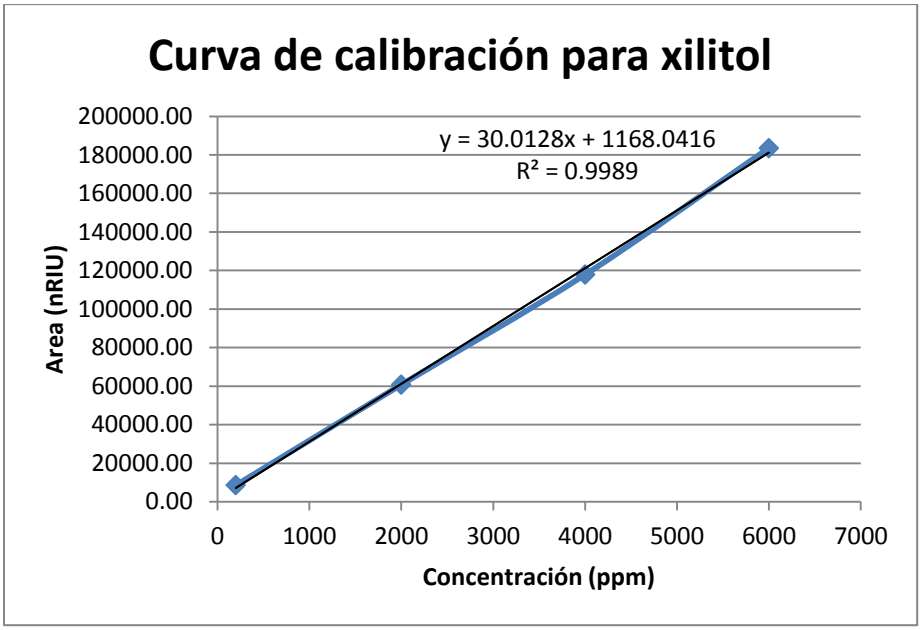
***Anexo 6. Detoxificación de licores hidrolizados***

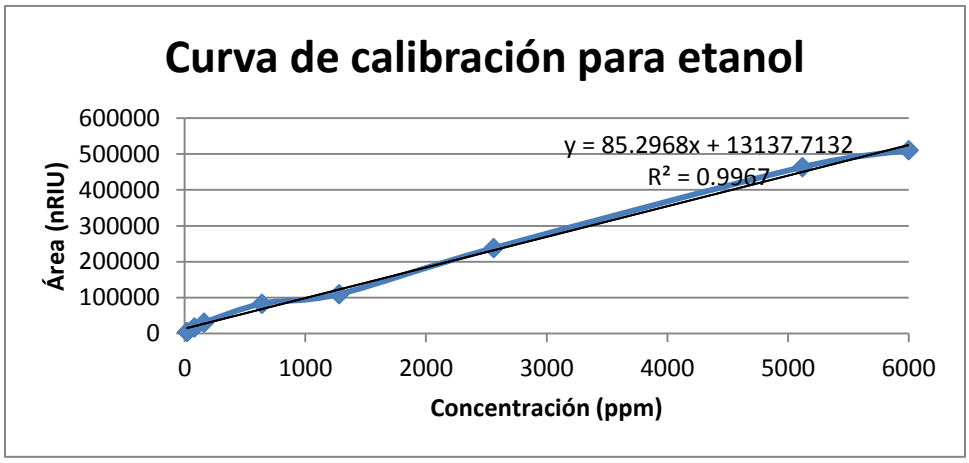
Se prepara una solución de Ca $(OH)_2$ al 20% (m/v), se adicionada al hidrolizado hasta alcanzar un pH de 10. Después de una hora de reposo a pH 10 el hidrolizado se filtra al vacío, se neutraliza hasta pH 5.5 con $H_2SO_4$ y se filtra nuevamente a vacío. Los resultados de los volúmenes de licor obtenidos se reportan en ml.

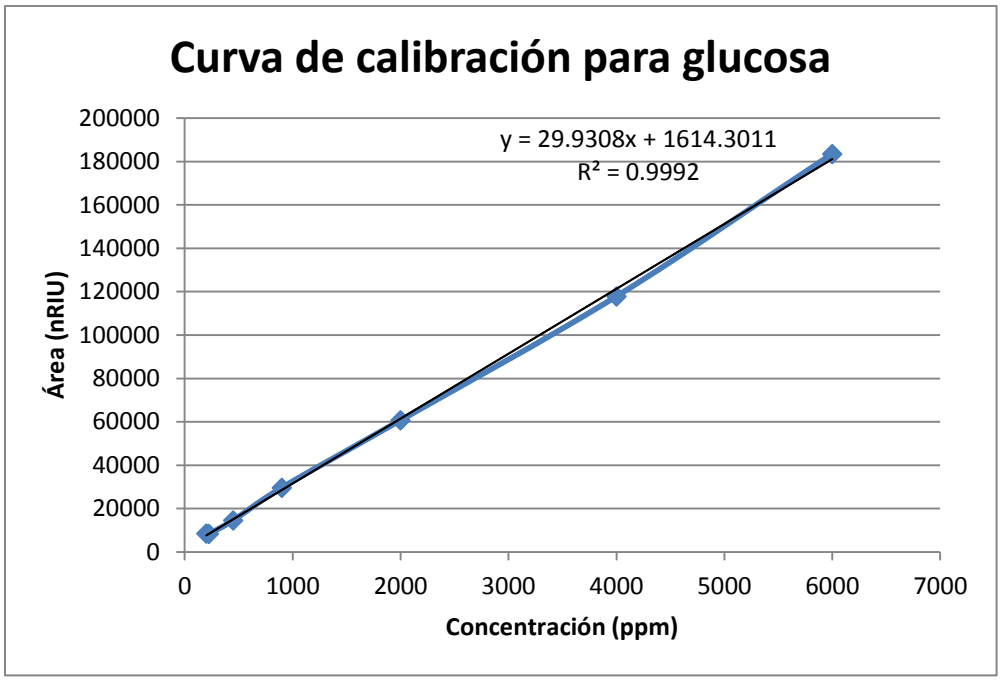
| **Licor hidrolizado** | **Solución. $Ca(OH)_2$** | **Licor filtración 1** | **Licor filtración 2** | **Rendimiento. licor ( %)** |
|---|---|---|---|---|
| 80 | 10 | 73 | 71 | **88.75** |

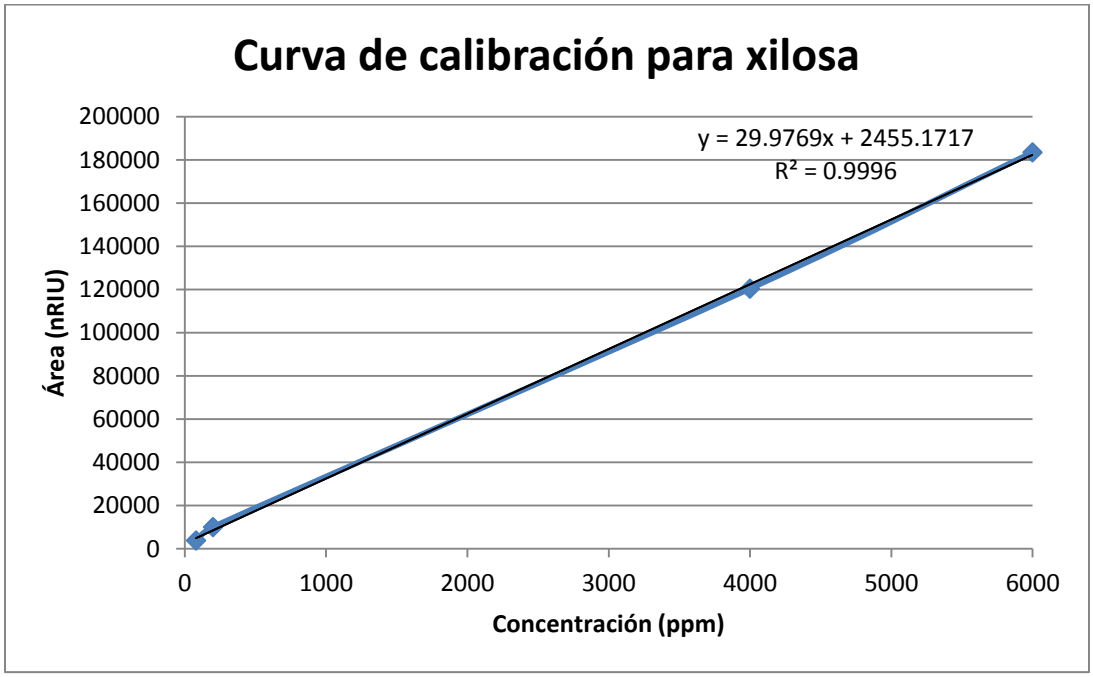
# ANEXOS

ANEXO 1: CURVAS DE CALIBRACIÓN




Curva de calibración para glucosa
y = 29.9308x + 1614.3011
R² = 0.9992
Área (nRIU)
200000
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
Concentración (ppm)


Curva de calibración para xilosa
y = 29.9769x + 2455.1717
R² = 0.9996
Área (nRIU)
200000
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
Concentración (ppm)

## Anexo 2 Tratamiento estadístico de datos

# INFORME (DATOS PROCESADOS)

**OBJETIVO 1 (DATOS PROCESADOS)**

Statistix 8.0

**Analysis of Variance Table for ETANOL**

| Source | DF | SS | MS | F | P |
|---|---|---|---|---|---|
| CEPA | 21 | 465.099 | 22.1476 | 463.10 | 0.0022 |
| TIEMPO | 1 | 0.002 | 0.0018 | 0.04 | 0.8656 |
| CEPA*TIEMPO | 21 | 113.451 | 5.4024 | 112.96 | 0.0088 |
| Error | 2 | 0.096 | 0.0478 | | |
| Total | 45 | | | | |

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 3.2835  CV 6.66

Statistix 8.0

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of ETANOL for CEPA**

| CEPA | Mean | Homogeneous Groups |
|---|---|---|
| 17 | 9.6700 | A |
| 9 | 9.4500 | A |
| 7 | 9.1500 | AB |
| 1 | 6.5800 | BC |
| 5 | 6.1250 | CD |
| 11 | 5.9600 | CD |
| 13 | 5.3850 | CD |
| 19 | 4.2300 | CDE |
| 21 | 3.5550 | DEF |
| 15 | 2.4950 | EFG |
| 10 | 1.9800 | EFGH |
| 3 | 1.9000 | EFGH |
| 2 | 1.1250 | FGH |
| 12 | 0.8000 | GH |
| 18 | 0.7350 | GH |
| 14 | 0.6700 | GH |
| 16 | 0.6300 | GH |
| 20 | 0.5800 | GH |
| 4 | 0.4700 | GH |
| 6 | 0.3650 | GH |
| 8 | 0.2550 | GH |
| 22 | 0.1275 | H |

Alpha 0.05
Critical Q Value 17.121
Error term used: Error, 2 DF

There are 8 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.

Statistix 8.0

**Analysis of Variance Table for PVOLUM**

| Source | DF | SS | MS | F | P |
|---|---|---|---|---|---|
| CEPA | 21 | 1.08752 | 0.05179 | 159.34 | 0.0063 |
| TIEMPO | 1 | 0.02396 | 0.02396 | 73.72 | 0.0133 |
| CEPA*TIEMPO | 21 | 0.29186 | 0.01390 | 42.76 | 0.0231 |
| Error | 2 | 0.00065 | 0.00033 | | |
| Total | 45 | | | | |

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 0.1599  CV 11.28

Statistix 8.0

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of PVOLUM for CEPA**

| CEPA | Mean | Homogeneous Groups |
|---|---|---|
| 17 | 0.4700 | A |
| 9 | 0.4600 | A |
| 7 | 0.4450 | AB |
| 5 | 0.3200 | ABC |
| 11 | 0.3000 | ABCD |
| 1 | 0.2950 | ABCD |
| 13 | 0.2300 | BCDE |
| 19 | 0.2150 | CDE |
| 21 | 0.1800 | CDEF |
| 15 | 0.1250 | CDEF |
| 3 | 0.1050 | CDEF |
| 10 | 0.0900 | DEF |
| 2 | 0.0500 | EF |
| 12 | 0.0400 | EF |
| 18 | 0.0350 | EF |
| 14 | 0.0300 | EF |
| 16 | 0.0300 | EF |
| 4 | 0.0250 | EF |
| 20 | 0.0250 | EF |
| 6 | 0.0200 | EF |
| 8 | 0.0150 | EF |
| 22 | 0.0125 | F |

Alpha 0.05
Critical Q Value 17.121
Error term used: Error, 2 DF
There are 6 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of PVOLUM for TIEMPO**

| TIEMPO | Mean | Homogeneous Groups |
|---|---|---|

```
     1  0.1830  A
     2  0.1368   B

Alpha              0.05
Critical Q Value  6.094
Error term used: Error, 2 DF
All 2 means are significantly different from one another.
Statistix 8.0
```

**Analysis of Variance Table for FCONVER**

| Source | DF | SS | MS | F | P |
|---|---|---|---|---|---|
| CEPA | 21 | 0.52052 | 0.02479 | 198.29 | 0.0050 |
| TIEMPO | 1 | 5.814E-07 | 5.814E-07 | 0.00 | 0.9518 |
| CEPA*TIEMPO | 21 | 0.12378 | 0.00589 | 47.15 | 0.0210 |
| Error | 2 | 2.500E-04 | 1.250E-04 | | |
| Total | 45 | | | | |

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 0.1092  CV 10.24

Statistix 8.0

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of FCONVER for CEPA**

| CEPA | Mean | Homogeneous Groups |
|---|---|---|
| 17 | 0.3250 | A |
| 9 | 0.3150 | AB |
| 7 | 0.3050 | AB |
| 1 | 0.2200 | ABC |
| 5 | 0.2050 | ABC |
| 11 | 0.2000 | ABCD |
| 13 | 0.1800 | BCDE |
| 19 | 0.1400 | CDEF |
| 21 | 0.1150 | CDEFG |
| 15 | 0.0850 | CDEFG |
| 10 | 0.0650 | DEFG |
| 3 | 0.0600 | EFG |
| 2 | 0.0350 | FG |
| 12 | 0.0250 | FG |
| 18 | 0.0250 | FG |
| 14 | 0.0200 | FG |
| 16 | 0.0200 | FG |
| 20 | 0.0200 | FG |
| 4 | 0.0150 | FG |
| 6 | 0.0100 | FG |
| 8 | 0.0100 | FG |
| 22 | 0.0075 | G |

```
Alpha              0.05
Critical Q Value 17.121
Error term used: Error, 2 DF
There are 7 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.
```

Statistix 8.0

**Analysis of Variance Table for REND**

| Source | DF | SS | MS | F | P |
|---|---|---|---|---|---|
| CEPA | 21 | 19807.5 | 943.216 | 152.17 | 0.0065 |
| TIEMPO | 1 | 9.826E-05 | 9.826E-05 | 0.00 | 0.9972 |
| CEPA*TIEMPO | 21 | 4825.83 | 229.801 | 37.07 | 0.0266 |
| Error | 2 | 12.3973 | 6.19863 | | |
| Total | 45 | | | | |

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 21.416  CV 11.63

Statistix 8.0

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of REND for CEPA**

| CEPA | Mean | Homogeneous Groups |
|---|---|---|
| 17 | 63.080 | A |
| 9 | 61.645 | A |
| 7 | 59.695 | A |
| 1 | 42.945 | AB |
| 5 | 39.950 | ABC |
| 11 | 38.885 | ABC |
| 13 | 35.120 | ABCD |
| 19 | 27.605 | BCDE |
| 21 | 23.185 | BCDEF |
| 15 | 16.270 | BCDEF |
| 10 | 12.910 | BCDEF |
| 3 | 12.410 | CDEF |
| 2 | 7.310 | DEF |
| 12 | 5.230 | DEF |
| 18 | 4.775 | EF |
| 14 | 4.345 | EF |
| 16 | 4.100 | EF |
| 20 | 3.795 | EF |
| 4 | 3.080 | EF |
| 6 | 2.360 | EF |
| 8 | 1.685 | EF |
| 22 | 0.762 | F |

Alpha 0.05
Critical Q Value 17.121
Error term used: Error, 2 DF
There are 6 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.

Statistix 8.0

**Correlations (Pearson)**

| | ETANOL | PVOLUM | FCONVER |
|---|---|---|---|
| PVOLUM | 0.9817 | | |

```
FCONVER    0.9994    0.9817
REND       0.9999    0.9819    0.9996
Cases Included 46    Missing Cases 0
```

**OBJETIVO 2 (DATOS PROCESADOS)**

Statistix 8.0

**Analysis of Variance Table for XILITOL**

| Source | DF | SS | MS | F | P |
|---|---|---|---|---|---|
| LEVADURA | 1 | 115.982 | 115.982 | 20.64 | 0.0019 |
| TIEMPO | 3 | 1.137 | 0.379 | 0.07 | 0.9757 |
| LEVADURA*TIEMPO | 3 | 12.837 | 4.279 | 0.76 | 0.5467 |
| Error | 8 | 44.965 | 5.621 | | |
| Total | 15 | 174.922 | | | |

Grand Mean 4.4326  CV 53.49

Statistix 8.0

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of XILITOL for LEVADURA**

| LEVADURA | Mean | Homogeneous Groups |
|---|---|---|
| 1 | 7.1250 | A |
| 2 | 1.7403 | B |

```
Alpha              0.05     Standard Error for Comparison  1.1854
Critical Q Value  3.263     Critical Value for Comparison  2.7347
Error term used: Error, 8 DF
All 2 means are significantly different from one another.
```

Statistix 8.0

**Analysis of Variance Table for PVOLUM**

| Source | DF | SS | MS | F | P |
|---|---|---|---|---|---|
| LEVADURA | 1 | 0.22848 | 0.22848 | 15.65 | 0.0042 |
| TIEMPO | 3 | 0.05900 | 0.01967 | 1.35 | 0.3261 |
| LEVADURA*TIEMPO | 3 | 0.01479 | 0.00493 | 0.34 | 0.7987 |
| Error | 8 | 0.11678 | 0.01460 | | |
| Total | 15 | 0.41906 | | | |

Grand Mean 0.2183  CV 55.36

Statistix 8.0

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of PVOLUM for LEVADURA**

| LEVADURA | Mean | Homogeneous Groups |
|---|---|---|
| 1 | 0.3377 | A |
| 2 | 0.0988 | B |

```
Alpha              0.05     Standard Error for Comparison  0.0604
Critical Q Value  3.263     Critical Value for Comparison  0.1394
Error term used: Error, 8 DF
All 2 means are significantly different from one another.
```

Statistix 8.0

**Analysis of Variance Table for FCONVER**

| Source | DF | SS | MS | F | P |
|---|---|---|---|---|---|
| LEVADURA | 1 | 0.37027 | 0.37027 | 20.70 | 0.0019 |
| TIEMPO | 3 | 0.00361 | 0.00120 | 0.07 | 0.9758 |
| LEVADURA*TIEMPO | 3 | 0.04099 | 0.01366 | 0.76 | 0.5454 |
| Error | 8 | 0.14307 | 0.01788 | | |
| Total | 15 | 0.55794 | | | |

Grand Mean 0.2505  CV 53.39

Statistix 8.0

**Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of FCONVER for LEVADURA**

| LEVADURA | Mean | Homogeneous Groups |
|---|---|---|
| 1 | 0.4026 | A |
| 2 | 0.0984 | B |

Alpha 0.05  Standard Error for Comparison 0.0669
Critical Q Value 3.263  Critical Value for Comparison 0.1543
Error term used: Error, 8 DF
All 2 means are significantly different from one another.

Statistix 8.0

**Correlations (Pearson)**

| | XILITOL | PVOLUM |
|---|---|---|
| PVOLUM | 0.8491 | |
| FCONVER | 1.0000 | 0.8494 |

Cases Included 16  Missing Cases 0