

APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS DE LA *ANANAS
COMOSUS* (PIÑA) PARA LA PRODUCCIÓN DE XILITOL POR HIDRÓLISIS
ENZIMÁTICA

SANDRA MILENA RAMÍREZ ALFONSO
MARÍA CAMILA REYES NIETO

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D, C.
2017

APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS DE LA ANANAS
COMOSUS (PIÑA) PARA LA PRODUCCIÓN DE XILITOL POR HIDRÓLISIS
ENZIMÁTICA

SANDRA MILENA RAMÍREZ ALFONSO
MARÍA CAMILA REYES NIETO

Proyecto integral de grado para optar al título de
INGENIERO QUÍMICO

Directora
MARTHA LUCIA MALAGÓN MICAN
Ingeniería Química MSC.

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ D, C.
2017

Nota de Aceptación (dirección de investigación)

Firma Docente Investigador

Firma Docente Jurado 1

Firma Docente Jurado 2

Bogotá, D.C., agosto de 2017

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. JAIME POSADA DÍAZ

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. LUIS JAIME POSADA GARCÍA-PEÑA

Vicerrectora Académica y de Posgrados

Dra. ANA JOSEFA HERRERA VARGAS

Secretario General

Dr. JUAN CARLOS POSADA GARCÍA-PEÑA

Decano General Facultad de Ingenierías

Ing. JULIO CESAR FUENTES ARISMENDI

Director de Investigaciones

Ing. ARMANDO FERNÁNDEZ CÁRDENAS

Director del Departamento de Ingeniería Mecánica

Ing. LEONARDO DE JESUS HERRERA GUTIERREZ

Las directivas de la Universidad de América, los jurados y el cuerpo docente no se hacen responsables por los criterios e indicios expuestos en este documento, esta responsabilidad corresponde únicamente al autor.

DEDICATORIA

Primeramente, a Dios, por guiar mi camino, por cada oportunidad y experiencia vivida, por mi fe completa hacia él, otorgándome la fuerza para salir adelante; logrando alcanzar cada una de las metas propuestas. por mostrarme siempre que cada circunstancia y situación presentada tienen un porque, enseñándome que ningún soñador es pequeño y ningún sueño es demasiado grande.

A mis padres por su amor eterno, por su esfuerzo imparable para permitirme crecer personal y profesionalmente, por su gran apoyo en cada dificultad y obstáculo presentado; haciendo de ellos una experiencia superada y una lección aprendida, los amo.

A mi hermano menor por ser mi motor, fuerza y la mayor inspiración en cada momento y pensamiento, por mostrarme con su condición a valorar y a amar cada cosa de la vida, por ser la mayor bendición y el regalo más grande de Dios, te adoro.

A mi hermano mayor por ser mi ejemplo a seguir, por enseñarme que ningún sueño se hace realidad mágicamente, sino que se necesita sudar, determinación y trabajo duro, para lograrlos.

A mi novio por su amor leal, por su compañía y apoyo incondicional en cada momento de esta etapa vivida, por sus palabras de fuerza en los momentos difíciles y por su incansable paciencia.

A cada una de las personas que conocí en esta bonita etapa, les agradezco por su amistad y compañía en este largo camino, principalmente a mi compañera de tesis Camila Reyes, que, a pesar de las adversidades y discusiones, fuimos una sola en este proceso, logrando aprender de cada experiencia vivida y de las oportunidades presentadas durante estos cinco años y a mi amiga Camila Bermúdez, por su gran ternura, humildad, sencillez, positivismo, afecto y escucha en las situaciones difíciles, logrando con sus palabras subirme el ánimo y llenarme de valor.

Sandra Milena Ramírez Alfonso

DEDICATORIA

Primero quiero dedicar este logro a Dios quien es el que hace todo posible, cada paso, cada aprendizaje, cada experiencia, mostrándome siempre el camino y brindándome la fortaleza necesaria para no dejarme derrumbar por nada.

A mi familia quienes siempre han estado ahí para brindarme su apoyo incondicional, confiando en cada decisión y paso que doy; especialmente a mis padres, sin ellos este logro no sería realidad, gracias por su esfuerzo, ejemplo, paciencia, confianza, dedicación, fuerza, amor, sabiduría, experiencia, positivismo y por nunca darse por vencidos.

A mi hermana la peque, esa personita que simplemente llego a mi vida para llenarla de amor, compañía y complicidad, gracias por tus locuras, apoyo, sabiduría a pesar de tu edad y sobre todo por siempre estar a mi lado.

A mis abuelos, gracias por su apoyo tanto económica como emocionalmente; gracias porque junto a mis padres han formado esta persona con defectos, pero también con valores y principios que no perderé jamás, los amo.

Al laboratorio clínico García & Asociados S.A.S. y sus colaboradores, por hacerme parte de esta gran familia, acogerme con amor, cariño y enseñarme tanto; especialmente al Dr. Gustavo García el patriarca de esta gran empresa; a la Dra. Norma Montoya la líder de este gran equipo, que con su conocimiento y la calidad de sus instalaciones hizo posible la realización de esta tesis; a la Dra. Adriana García, por su apoyo en todo sentido durante toda esta etapa de mi vida; a la bacterióloga Ana Villadiego, por sus enseñanzas, brindarme su mano amiga, su fe y positivismo.

A todos mis compañeros que me acompañaron durante esta etapa, llena de conocimientos y grandes experiencias; especialmente a mi gran amigo Alejandro Castañeda y mi compañera de tesis Sandra Ramírez, gracias por su complicidad, paciencia y por estar en los buenos y malos momentos.

María Camila Reyes Nieto.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Fundación Universidad de América, por disponer de personal preparado, dedicado a brindarnos los mejores conocimientos durante estos 5 años, permitiéndonos crecer profesional e intelectualmente. Por prestarnos los equipos, materiales, reactivos y laboratorios necesarios para la realización de las pruebas experimentales, por su ayuda económica para cada uno de los materiales y análisis realizados para llevar a cabo y culminar este proyecto.

A nuestra directora Martha Malagón, por su apoyo y guía durante todo el proyecto y por la ayuda que nos brindó para la realización de este.

Al laboratorio clínico García & Asociados S.A.S y sus colaboradores por prestarnos sus instalaciones y brindarnos la ayuda necesaria para llevar a cabo la última etapa de este proyecto, especialmente a la bacterióloga Ana Villadiego por el tiempo brindado, quien estuvo interesada y pendiente de que todo se realizara con el mayor cuidado y de manera correcta, guiándonos a partir de su experiencia y completo conocimiento.

A la curadora Angela Alvarado del Cerapio de la Colección de Microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana, por su paciencia, comprensión y brindarnos los conocimientos necesarios para el manejo adecuado de las levaduras utilizadas y la realización de manera adecuada del proceso de fermentación.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	26
OBJETIVOS	28
1. GENERALIDADES	29
1.1 ASPECTOS IMPORTANTES DEL XILITOL Y GENERALIDADES DE SU PRODUCCIÓN	29
1.1.1 Origen e historia	29
1.1.2 Estructura química	29
1.1.3 Propiedades fisicoquímicas	30
1.1.4 Aplicaciones	31
1.1.5 Síntesis química producción de xilitol	31
1.1.6 Producción biotecnológica de xilitol-vía alterna	32
1.1.7 Factores que influyen en la producción de xilitol	43
1.2 MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS	45
1.2.1 Celulosa	45
1.2.2 Hemicelulosa	46
1.2.3 Lignina	47
1.3 PIÑA (<i>Ananas comosus</i>)	48
1.3.1 Piña Gold MD2	48
1.3.2 Composición química	49
1.3.3 Producción nacional	51
1.4 METODO ÁCIDO 3,5 DINITROSALICÍLICO (DNS) PARA LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	54
2. OBTENCIÓN DE MUESTRA DE PIÑA	55
2.1 MADURACIÓN CUALITATIVA	55
2.1.1 Maduración por color de cáscara	56
2.1.2 Frutículos	58
2.2 OBTENCIÓN DE RESIDUOS Y MUESTREO	59
2.2.1 Proceso de obtención	59
2.2.2 Muestreo	61
2.2.3 Almacenamiento y conservación de muestra	62
2.3 TÉCNICA DE MUESTREO POR CUARTEO	63
3. METODOLOGÍA	65
3.1 PRETRATAMIENTO FÍSICO	66
3.1.1 Secado	66
3.1.2 Molienda y tamizado	66
3.2 CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS	67
3.2.1 Determinación de humedad	67

3.2.2	Determinación de extraíbles	68
3.2.3	Determinación de lignina insoluble y soluble en ácido	68
3.2.4	Determinación de holocelulosa	70
3.2.5	Determinación de celulosa y hemicelulosa	70
3.3	PRETRATAMIENTO QUÍMICO	71
3.4	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	73
3.4.1	Diseño experimental para la hidrólisis enzimática	75
3.5	DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	78
3.5.1	Preparación del reactivo ácido 3,5 dinitrosalicílico	78
3.5.2	Cuantificación de azúcares	79
3.5.3	Curva patrón de xilosa	79
3.5.4	Determinación del grado de conversión y rendimiento de enzima	80
3.6	FERMENTACIÓN	81
3.6.1	Esterilización del hidrolizado	81
3.6.2	Activación de levaduras	81
3.6.3	Activación de cepas en el hidrolizado	81
3.6.4	Fermentación	82
3.6.5	Seguimiento microscópico del crecimiento de levaduras	83
3.7	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN HPLC.	84
4.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	85
4.1	PRETRATAMIENTO FÍSICO	85
4.1.1	Secado	85
4.1.2	Molienda y tamizado	85
4.2	CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS	88
4.2.1	Porcentaje de humedad	88
4.2.2	Porcentaje de extraíbles	89
4.2.3	Porcentaje de lignina	90
4.2.4	Porcentaje de holocelulosa	92
4.2.5	Porcentaje de celulosa y hemicelulosa	93
4.3	PRETRATAMIENTO QUÍMICO (DESLIGNIFICACIÓN)	95
4.4	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	97
4.5	DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES MEDIANTE MÉTODO DNS	98
4.5.1	Análisis cualitativo de azúcares reductores	98
4.5.2	Concentración de Xilosa	100
4.5.3	Cuantificación de azúcares reductores en los diferentes tratamientos del diseño experimental	102
4.5.4	Grado de conversión y rendimiento de la enzima Xilanasas AN 20 durante el proceso de hidrólisis	105
4.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DISEÑO EXPERIMENTAL DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	107
4.7	FERMENTACIÓN	113
4.7.1	Activación de levaduras	114
4.7.2	Activación de cepas de <i>Candida guilliermondii</i> y <i>Candida tropicalis</i>	

en hidrolizado de piña	116
4.7.3 Fermentación	118
4.8 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	131
4.9 ANÁLISIS DE FACTORES DE IMPEDIMENTO PRESENTADOS EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL	134
4.9.1 Deslignificación de fibra mediante inmersión en solución de NaOH	134
4.9.2 Hidrólisis enzimática	136
4.9.3 Determinación azúcares reductores	139
4.9.4 Fermentación	140
5. CONCLUSIONES	142
6. RECOMENDACIONES	144
BIBLIOGRAFÍA	145
ANEXOS	158

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Resultados morfología <i>Candida guilliermondii</i>	40
Tabla 2. Resultados asimilación y fermentación de azúcares por <i>Candida guilliermondii</i>	41
Tabla 3. Resultados morfología <i>Candida tropicalis</i>	43
Tabla 4. Resultados asimilación y fermentación de azúcares por <i>Candida tropicalis</i>	43
Tabla 5. Composición de la cáscara de piña seca y molida variedad MD2	50
Tabla 6. Composición nutricional de la planta de piña según la parte analizada y el estado del material. San José, Costa Rica.2011	51
Tabla 7. Contenido mínimo de solidos solubles expresado como grado Brix	57
Tabla 8. Concentración de xilosa para obtener la ecuación de la recta para el método DNS	79
Tabla 9. Resultados obtenidos de la molienda y tamizado de muestra obtenida de piña	87
Tabla 10. Composición química de la muestra de piña MD2 obtenida	94
Tabla 11. Absorbancias obtenidas para diferentes concentraciones de xilosa	101
Tabla 12. Absorbancias obtenidas de la totalidad de tratamientos del diseño experimental de la hidrólisis enzimática	103
Tabla 13. Concentraciones de azúcares reductores obtenidas a partir de la ecuación de calibración de xilosa	103
Tabla 14. Resultados azúcares reductores mediante el método DNS	105
Tabla 15. Resultados de la conversión de la enzima Xilanasas AN 20 durante la hidrólisis	106
Tabla 16. Rendimiento hidrólisis enzimática con base a la cantidad de hemicelulosa disponible en la fibra	107
Tabla 17. Datos de concentración de azúcares reductores con relación a la concentración de enzima, tiempo de hidrólisis y cálculos de análisis de bloques	108
Tabla 18. Tabla análisis ANOVA	110
Tabla 19. Distribución F	111
Tabla 20. Conteo celular inicial, <i>Candida guilliermondii</i>	119
Tabla 21. Conteo celular inicial, <i>Candida tropicalis</i>	120
Tabla 22. Concentración de células posterior a la activación de levaduras	120
Tabla 23. Concentración de células en la fermentación con <i>Candida guilliermondii</i>	124
Tabla 24. Concentración de células en la fermentación con <i>Candida tropicalis</i>	125
Tabla 25. Resultados cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	134
Tabla 26. Composición química del bagazo de malta en la forma original y de las pulpas obtenidas después de cada proceso para liberación de las fibras de celulosa	135

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas del xilitol	30
Cuadro 2. Composición química y nutricional de la piña	49
Cuadro 3. Etapas de muestreo y preparación de muestra	61

LISTA DE IMÁGENES

	pág.
Imagen 1. Puntos de obtención de residuos de <i>Ananas comosus</i>	60
Imagen 2. Residuos de cáscara de piña obtenidos	60
Imagen 3. Proceso de reducción de muestra de cáscara de piña Acondicionada por técnica de cuarteo	64
Imagen 4. Proceso de molienda de la cáscara de piña	86
Imagen 5. Proceso de tamizado de fibra previamente molida	86
Imagen 6. Muestra de fibra de piña seca, molida y tamizada	87
Imagen 7. Muestra de fibra de piña después de 6 horas de secado	88
Imagen 8. Montaje soxhlet para la eliminación de extraíbles de la piña	89
Imagen 9. Muestra de piña libre de extraíbles	90
Imagen 10. Lignina insoluble en ácido (klason) seca	91
Imagen 11. Hidrolizado (filtrado) obtenido en análisis de lignina insoluble en ácido	91
Imagen 12. Calentamiento de muestra de piña con clorito de sodio y ácido acético	92
Imagen 13. Celulosa seca	93
Imagen 14. Montaje pretratamiento químico (deslignificación)	96
Imagen 15. Fibra deslignificada	96
Imagen 16. Montaje diseño experimental de la hidrólisis enzimática	97
Imagen 17. Concentraciones de xilosa analizadas por el método DNS	101
Imagen 18. Método DNS para muestras con 2 días de tiempo de hidrólisis	104
Imagen 19. Método DNS para muestras con 3 días de tiempo de hidrólisis	105
Imagen 20. Levaduras <i>Candida guilliermondii</i> CMPUJ H025 y <i>Candida tropicalis</i> CMPUJ H029	114
Imagen 21. Medio de cultivo PDA (Agar papa dextrosa) puro y fresco	115
Imagen 22. Siembra de levadura <i>Candida guilliermondii</i> y <i>tropicalis</i> en medio de cultivo PDA respectivo	115
Imagen 23. <i>Candida guilliermondii</i> y <i>tropicalis</i> después de tiempo de Incubación	116
Imagen 24. Incubadora utilizada para garantizar una adecuada temperatura de activación de cepas	117
Imagen 25. Activación de levaduras en hidrolizado de piña	117
Imagen 26. Termohigometro utilizado para medir la temperatura	118
Imagen 27. Montaje fermentación <i>Candida guilliermondii</i> y <i>Candida tropicalis</i>	119
Imagen 28. Coloración Gram <i>Candida guilliermondii</i> pre-inoculada	121
Imagen 29. Coloración Gram <i>Candida tropicalis</i> pre-inoculada	122
Imagen 30. Procedimiento coloración Gram	131
Imagen 31. Cromatografía HPLC. Muestra fermentada con <i>Candida guilliermondii</i>	132
Imagen 32. Replica cromatografía HPLC. Muestra fermentada con <i>Candida guilliermondii</i>	132

Imagen 33. Cromatografía HPLC. Muestra fermentada con <i>Candida tropicalis</i>	133
Imagen 34. Replica cromatografía HPLC. Muestra fermentada con <i>Candida tropicalis</i>	133

LISTA DE GRÁFICOS

	pág.
Grafico 1. Producción mundial piña por países	52
Grafico 2. Curva de calibración y linealización ecuación azúcares reductores (xilosa)	102
Grafico 3. Distribución F, factor concentración de enzima	112
Grafico 4. Distribución F, tiempo de hidrólisis	112
Grafico 5. Distribución F, interacción de enzima y tiempo de hidrólisis	113
Grafico 6. Curva de crecimiento <i>Candida guilliermondii</i> primera réplica técnica de fermentación	127
Grafico 7. Curva de crecimiento <i>Candida guilliermondii</i> segunda réplica técnica de fermentación	127
Grafico 8. Curva de crecimiento <i>Candida guilliermondii</i> tercera réplica técnica de fermentación	128
Grafica 9. Curva de crecimiento <i>Candida tropicalis</i> primera réplica técnica de fermentación	129
Grafica 10. Curva de crecimiento <i>Candida tropicalis</i> segunda réplica técnica de fermentación	129
Grafica 11. Curva de crecimiento <i>Candida tropicalis</i> tercera réplica técnica de fermentación	130

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Estructura xilitol	30
Figura 2. Vía alterna de la síntesis química de xilitol	33
Figura 3. Estructura del xilano o hemicelulosa y de las enzimas xilanolíticas implicadas en su degradación	37
Figura 4. Vía metabólica de fermentación de xilosa por bacterias y levaduras	38
Figura 5. Levadura del género <i>Candida</i>	39
Figura 6. Estructura química de la celulosa	46
Figura 7. Segmento de la estructura química de la hemicelulosa	47
Figura 8. Estructura química de la lignina	47
Figura 9. Piña Golden MD2	48
Figura 10. Participación (%) del área agrícola dedicada a cultivos de frutas en el área rural dispersa censada	53
Figura 11. Reacción redox entre azúcares reductores y reactivo DNS	54
Figura 12. <i>Ananas comosus</i> variedad MD2	55
Figura 13. Grados de maduración de la <i>Ananas comosus</i>	56
Figura 14. Apariencia de frutículos en la maduración establecida para la obtención de residuos de cáscara de la <i>Ananas comosus</i> (Grado 4 a 5)	58
Figura 15. Comparación de frutículos de grado de madurez 1 a 6	59
Figura 16. Procedimiento para la elaboración de la muestra analítica por medio de cuarteo diagonal	63
Figura 17 Cuadrantes cámara de Neubauer utilizados en seguimiento Microscópico	84
Figura 18. Análisis cualitativo a partir de coloraciones obtenidas por el Método DNS	98
Figura 19. Cuadrilla y medidas de la cámara de Neubauer	123
Figura 20. Enzimas involucradas en la degradación de hemicelulosa	138

LISTA DE ESQUEMAS

	pág.
Esquema 1. Diagrama de flujo del proceso experimental	65
Esquema 2. Diagrama pretratamiento químico de muestra de piña	73
Esquema 3. Diagrama hidrólisis enzimática	74
Esquema 4. Diagrama básico diseño experimental	75

LISTA DE ECUACIONES

	pág.	
Ecuación 1	Porcentaje de humedad	68
Ecuación 2	Porcentaje de componentes extraíbles	68
Ecuación 3	Porcentaje de lignina insoluble en ácido	69
Ecuación 4	Porcentaje de lignina soluble en ácido	69
Ecuación 5	Porcentaje de holocelulosa	70
Ecuación 6	Porcentaje de celulosa	71
Ecuación 7	Porcentaje de hemicelulosa	71
Ecuación 8	Número de tratamientos diseño experimental	78
Ecuación 9	Porcentaje grado de conversión	80
Ecuación 10	Cantidad azúcares reductores	80
Ecuación 11	Cantidad teórica de xilosa obtenible	80
Ecuación 12	Porcentaje de rendimiento hidrólisis enzimática	81
Ecuación 13	Concentración de células en conteo cámara de Neubauer	82
Ecuación 14	Ecuación lineal de concentración de xilosa	102
Ecuación 15	Suma cuadrados totales	108
Ecuación 16	Suma cuadrados entre tiempo de hidrólisis	108
Ecuación 17	Suma cuadrados entre concentración de enzima	109
Ecuación 18	Suma cuadrados entre interacción tiempo de hidrólisis y concentración de enzima	109
Ecuación 19	Suma cuadrados dentro de tratamientos - error residual	109
Ecuación 20	Cuadrados medios entre tiempo de hidrólisis	109
Ecuación 21	Cuadrados medios entre concentración de enzima	109
Ecuación 22	Cuadrados medios entre interacción tiempo de hidrólisis y concentración de enzima	109
Ecuación 23	Cuadrados medios dentro tratamientos – error residual	109
Ecuación 24	Cuadrados medios total	110
Ecuación 25	Distribución F, tiempo de hidrólisis	110
Ecuación 26	Distribución F, concentración de enzima	111
Ecuación 27	Distribución F, interacción tiempo de hidrólisis y concentración de enzima	111

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Proceso de producción de xilitol por síntesis química hidrólisis e hidrogenación de xilano a xilitol	158
Anexo B. Enzimas degradadoras de hemicelulosa	159
Anexo C. Estructura tridimensional de los dominios catalíticos de las xilanasas pertenecientes a diferentes familias	160
Anexo D. Sitios de rompimiento de diferentes tipos de hemicelulosas sobre la hemicelulosa	161
Anexo E. Microorganismos estudiados para la producción de xilitol	162
Anexo F. Composición química de algunas partes de la piña	163
Anexo G. Ficha técnica de Xilanasa Fungal (XILANASA AN 20)	164
Anexo H. Ficha técnica <i>Candida guilliermondii</i>	165
Anexo I. Ficha técnica <i>Candida tropicalis</i>	166
Anexo J. Conteo celular de <i>Candida guilliermondii</i> en intervalos de 12 horas	167
Anexo K. Conteo celular de <i>Candida tropicalis</i> en intervalos de 12 horas	168
Anexo L. Apariencia días 1 y 2, montaje de fermentación	169
Anexo M. Recta calibración de xilitol	171

GLOSARIO

ANÁLISIS ANOVA: “es un método flexible que permite construir modelos estadísticos para el análisis de los datos experimentales cuyo valor ha sido constatado en muy diversas circunstancias. Básicamente es un procedimiento que permite dividir la varianza de la variable dependiente en dos o más componentes, cada uno de los cuales puede ser atribuido a una fuente (variable o factor) identificable”¹

ANANAS COMOSUS: comúnmente conocida como piña, “pertenece a la familia Bromeliaceae, al género *Ananas*. Originaria de América, exactamente de América del Sur”². “Es una planta perenne con una roseta de hojas puntiagudas de hasta 90cm de longitud. Del centro de la roseta surge un vástago e cuyo extremo se producen flores”³.

CURVA DE CALIBRACIÓN: “es la representación gráfica de una señal que se mide en función de la concentración de un analito. La calibración incluye la selección de un modelo para estimar los parámetros que permitan determinar la linealidad de esa curva. y, en consecuencia, la capacidad de un método analítico para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración de un compuesto en una muestra, dentro de un determinado intervalo de trabajo”⁴

ENZIMAS XILANASAS: enzima degradadora de la hemicelulosa, específicamente xilanos. Se componen de dos grupos de enzimas: endo-1,4- β -D-xilanasas, la cual actúa sobre la cadena de xilanos al azar y 1,4- β -D-xilosidasas actúa sobre los xilooligosacaridos⁵.

HEMICELULOSA: polisacárido no celulósico, que aparecen en las paredes celulares, está compuesta por cadenas largas con gran variedad de hexosas, pentosas y en la mayoría de los casos, de ácidos urónicos⁶. Se encuentran en frutas,

¹ TAMAYO, Ignacio. Análisis de varianza con spss 8.0: modelo de ANOVA. Disponible en: http://www.ugr.es/~imartin/TEMA5_ANOVA.pdf

² INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACIÓN PARA LA AGRICULTURA. IICA. La piña. Guía técnica para el cultivo de la piña *Ananas comusus*, (L) Merr. Editorial estación experimental “el recreo”. Nicaragua, 1983.

³ BOTANICAL. Propiedades de la piña. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/pina.htm> [en línea].

⁴ DOSAL, María y VILLANUEVA, Marcos. Introducción a la metrología química: curvas de calibración en los métodos analíticos, 2008. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CURVASDECALIBRACION_23498.pdf

⁵ MONTOYA, S. Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto grifola frondosa. Tesis de grado. Maestría es Ingeniería Química. Manizales, Colombia. Mayo, 2008. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/956/1/sandramontoyabarreto.2008.pdf>

⁶ BLASCO, M. Microbiología de suelos. Curso. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA. Centro de enseñanza e investigación. Turrialba, Costa Rica. 1970.

tallos de plantas y cáscaras de granos; no son comestibles, pero pueden ser fermentadas por microorganismos (levaduras y bacterias).

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: hidrólisis producida por un grupo de enzimas, llamadas hidrolasas. Algunas de las ventajas de este tipo de hidrólisis es la especificidad que tienen las enzimas, se elabora generalmente en condiciones moderadas de temperatura y pH, además de ello, se obtienen productos de elevado valor nutricional y funcional.

MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS: se encuentran en la biomasa vegetal, principalmente en las paredes celulares de plantas, consisten en polisacáridos, compuestos fenólicos y compuestos minoritarios (minerales, lípidos, proteínas, entre otros). Los polisacáridos se clasifican en celulosa, hemicelulosa y lignina. En la actualidad, son ampliamente estudiados por sus compuestos, ya que estos permiten la obtención de productos sustentables y no contaminantes.

REPLICA TÉCNICA: “se utiliza cuando se tratan réplicas de la misma muestra biológica”⁷.

TINCIÓN: “es el proceso por el cual las moléculas de un colorante se adsorben a una superficie. El uso de colorantes permite cambiar el color de las células de los microorganismos y poder realizar la observación en microscopio óptico. Dado que las bacterias son casi incoloras, no presentan contraste con el medio en el cual se encuentran suspendidas y no pueden observarse claramente sin algún tratamiento previo”⁸

TINCIÓN DE GRAM: “permite separar a las bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas, basados en si retienen o no, el colorante primario (cristal violeta) luego del proceso de decoloración. Los organismos que retienen el cristal violeta luego de la adición del agente decolorante, el alcohol, aparecen como azul oscuro o violeta, y se designan como Gram positivos; aquellos que pierden el cristal violeta y se tiñen con el colorante secundario, la safranina, aparecen como rojos y se designan como Gram negativos”⁹

XILANO: “es el polímero que se halla en mayor proporción dentro de la composición de las hemicelulosas. Se ubica detrás de la celulosa como fuente de polisacáridos

⁷ SANCHEZ-PLA, Alex y RUIZ, Carme. Análisis de datos de microarrays, replicación. Barcelona: Universidad de Barcelona. Departamento de estadística. Facultad de Biología. Disponible en: [Análisis_de_microarrays_C5_Diseño_Experimental.pdf](#)

⁸ SANTAMBROSIO, Eduardo. Tinción y observación de microorganismos. Argentina: Universidad Tecnológica Nacional, 2009. Disponible en: https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practico4.pdf

⁹ VIZCARRONDO, Milagros. Morfología y tinción de los microorganismos, 2008. Disponible en: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Morfolog%C3%ADa_y_Tinci%C3%B3n.pdf

renovables en la naturaleza”¹⁰. “polisacárido formado por una cadena lineal de moléculas de D-xilosa con algunas ramificaciones y sustituciones, con enlaces β -1,4”¹¹

XILITOL: polialcohol, compuesto por 5 átomos de carbono obtenido por la reducción de la xilosa. Azúcar natural utilizado por la industria alimentaria como sustituto de la sacarosa. Se encuentra presente en la naturaleza, así como en muchas frutas y verduras. Tiene una dulzura y sabor similar a la sacarosa, es por ello, que cada vez es más apetecido, además por sus cualidades como: anticaries, aporta menos calorías, reduce la formación de placa, y no necesita de insulina para ser procesado por el cuerpo humano, entre otros.

XILOSA: aldopentosa, Azúcar que se encuentra en materiales vegetales, es por ello, que es conocido como azúcar de madera. Utilizada principalmente en medicina para pruebas de absorción intestinal, ya que este se absorbe de forma incompleta en el intestino.

¹⁰ VAZQUEZ, Fabio. Estudio y mejoramiento genético de cepas de levaduras y hongos filamentosos en fermentaciones con xilosa o xilano como fuente de carbono. Doctorado en Ciencias Naturales. La Plata: Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, 1999.

¹¹ PLANTAS Y HONGOS. Xilano. [en línea]. Disponible en: <http://www.plantasyhongos.es/glosario/xilano.htm>

RESUMEN

Esta investigación consistió en un desarrollo experimental con una serie de etapas consecutivas para la producción de xilitol biotecnológicamente, inicialmente se utilizó como materia prima residuos de cáscara de piña de la variedad MD2, conocida comercialmente como piña Golden. Para la selección de cáscara obtenida en cada punto de venta ambulante, se establecieron dos requisitos cualitativos con referencia a la maduración de la piña, como son el grado de coloración de la cáscara; aquella en la que la coloración amarilla cubre del 51-80% de la superficie del cuerpo de la fruta y la apariencia de las brácteas de esta (frutículos planos), se llevó a cabo un muestreo selectivo luego de la obtención de muestra en cada punto, verificando de igual manera la sanidad de los residuos, previniendo la acción de microorganismos y posibles procesos de deterioro. Se realizó como pretratamientos físicos un secado en mufla, una molienda y un tamizado cuyo fin es la adecuación y conservación de los residuos para posteriormente ser almacenados por tamaños.

Para dar inicio a la experimentación fue necesario realizar una técnica de muestreo por cuarteo, para obtener la muestra analítica y representativa de la totalidad de residuos adquiridos y seleccionados. La caracterización química se realizó para determinar el porcentaje de humedad, extraíbles, lignina, holocelulosa, celulosa y de mayor interés hemicelulosa. Una vez conocida la composición química de la cáscara, se llevó a cabo el pretratamiento químico, que consistió en la deslignificación de la fibra, mediante la inmersión de esta en hidróxido de sodio al 2% durante 3 horas, con el fin de facilitar la acción de la enzima en el biopolímero de interés en el proceso de hidrólisis. En la etapa de hidrólisis se utilizó la enzima xilanasa AN 20 (endo- β -1,4-xilanasa), se elaboró un diseño experimental (diseño factorial de 2 factores) cuya variable de interés fue la concentración de azúcares reductores (especialmente xilosa), donde se manejaron como variables independientes el tiempo de hidrólisis (2 y 3 días) y la concentración de enzima (1,5%, 3% y 4,5% p/p de sustrato), en esta fase se logró mantener la temperatura de hidrólisis a 50°C y el pH entre 4-7. Luego se determina la cantidad de azúcares reductores presentes en el hidrolizado con el método DNS, se realizó la curva patrón de xilosa pura, se obtuvieron bajos porcentajes de grado de conversión y rendimiento en cada uno de los tratamientos realizados (por debajo de 0,9% y 4% respectivamente). En la elaboración del análisis estadístico correspondiente al diseño experimental se determinó que hubo efecto de las variables concentración de enzima y tiempo de hidrólisis, pero no de la interacción de estas en la concentración final de azúcares reductores.

En el proceso de fermentación fue necesario la esterilización del hidrolizado (muestra de mayor rendimiento en el proceso de hidrólisis enzimática), se activó la

levadura *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis* en el caldo de piña estéril, pre-inoculación que llevo un tiempo de 12 horas a 28°C, se inició la fermentación con una concentración de 1×10^7 ceL/mL de cada levadura, realizando una dilución del pre-inóculo con caldo estéril, logrando un volumen de 200mL, El seguimiento de crecimiento microbiano se desarrolló mediante conteos con ayuda de la cámara de Neubauer, conteos que se realizaron cada 12 horas. Para observar la pureza de cada fermentación se realizaron tinciones de Gram cada 24 horas, donde no se observó contaminación alguna.

Terminada la etapa de bioconversión de xilosa, las muestras se llevaron a análisis de cromatografía HPLC para la determinación de xilitol, donde no se detectó concentración alguna en ninguna de las dos muestras correspondientes a cada fermentación, por lo cual fue necesario realizar un análisis detallado de los posibles factores que pudieron influenciar que se diera este resultado, en cada etapa realizada.

INTRODUCCIÓN

Bogotá es una ciudad que al transcurrir de los años se ve cada vez más afectada a causa de problemas de contaminación, producida en gran parte por los gases y lixiviados que emiten las aglomeraciones de residuos orgánicos, según un Informe de Evaluación del relleno Sanitario Doña Juana realizado por United States Environmental Protection Agency (UAESP) y la SCS ENGINEERS, sobre los principales residuos sólidos desechados allí, se observa que los materiales orgánicos presentan el mayor promedio (61,58%) en cuanto al estudio de caracterización de residuos sólidos, es decir, es uno de los mayores residuos generados¹². Esta aglomeración de residuos se da debido a una inadecuada planeación y organización a la hora de desecharlos; por falta de capacidad y gestión no se les ha dado una reutilización, como el aprovechamiento de estos residuos principalmente los frutales para la producción de un edulcorante conocido como xilitol.

En Colombia, la producción de piña es de gran interés, por lo cual atrae cada vez más a productores y empresarios; esto se debe a varios factores, el primero de ellos es un aumento en el consumo a nivel mundial de la fruta pudiéndose convertir en una consigna para el país la exportación de ella, segundo, la variedad de climas en donde esta puede ser cosechada, tercero, los buenos suelos y disponibilidad de los recursos hídricos que hay en las distintas regiones del país, además de que el cultivo sea atractivo desde el punto de vista de rentabilidad. “El auge de la piña promete seguir hacia la cima. Según estudios realizados por el Programa de Transformación Productiva (PTP) y la Asociación Nacional de Frutas y Hortalizas de Colombia (Asohofrucol), el comercio internacional de este producto podría llegar a superar los 2.000 millones de dólares en el 2029, partiendo de una cifra de 1.718 millones en 2011”¹³. “Según estudios realizados, los desechos de cultivo generados por la piña, representan un 65% del fruto, dentro de estos desechos se destacan, la corona, el corazón, las cáscaras y el rastrojo (material vegetal)”¹⁴. Estos residuos

¹² ALCALDIA MAYOR DE BOGOTÁ, DISTRITO CAPITAL. Banco distrital de programas y proyectos. Ficha de estadística básica de inversión distrital EBI-D. enero 9 de 2015. Disponible en: http://www.ambientebogota.gov.co/es/c/document_library/get_file?uuid=4d840d51-ebe5-4ae0-b7fc-65ab948368ef&groupId=55886.

¹³ Negocios, E. y. La miel de la piña atrae a empresarios veteranos. *El Tiempo*, págs. 21 de Noviembre de 2014. Disponible en: <http://www.eltiempo.com/economia/sectores/produccion-de-pina-en-colombia/14864655>.

¹⁴ ALTEC. Nuevas Oportunidades con Residuos Agroindustriales Tropicales. XV Congreso Latino-Iberoamericana de Gestao de Tecnologia. Porto, 2013. Disponible en: http://www.altec2013.org/programme_pdf/50.pdf

se consideran una alternativa de bajo costo para la producción de endulcorante, ya que estos contienen azúcares simples, fermentables como son la glucosa, fructosa y sacarosa, igualmente cantidades significativas de celulosa y de hemicelulosa potencialmente hidrolizables.

El xilitol es un edulcorante que sustituye el azúcar común (sacarosa), que al igual que esta posee propiedades de dulzor marcadas pero que no necesita de insulina para ser procesado en el organismo, por lo cual beneficia principalmente a personas diabéticas y a personas que quieran llevar una vida más saludable baja en carbohidratos, siendo recomendado por muchos especialistas; también es aconsejable para el cuidado dental ya que es un azúcar anticaries e inhibe la formación de placa y sarro, por esta razón ha sido incluido en productos como las gomas de mascar. Por lo tanto, la producción de xilitol es una opción que favorece la salud principalmente. En la actualidad este producto es industrialmente obtenido por síntesis química, teniendo como principal proceso la hidrogenación de xilosa a partir de la mazorca de maíz o el árbol de abedul, pero este presenta desventajas, principalmente sus altos costos, al ser necesario una secuencia de etapas de purificación, razón por la que se han venido realizando diversas investigaciones para encontrar procesos de generación de xilitol que presenten ventajas sobre esta producción actual; en esta investigación se plantea una vía alterna a este proceso de hidrólisis, proceso principal de la síntesis química de xilitol.

Una de las limitantes para el consumo de xilitol en el país es que no existen empresas productoras, por lo tanto, este producto debe ser importado, aumentando de manera significativa el valor de este; siendo de difícil adquisición para personas de estratos bajos y medios.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Aprovechar los residuos lignocelulósicos de la *Ananas Comosusus*, utilizándose como materia prima para la síntesis de un edulcorante conocido como xilitol.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Acondicionar los residuos de la *Ananas comosus* por medio de un pretratamiento físico y químico.
- Realizar una vía alterna de la síntesis química, como es la hidrólisis enzimática a través de enzima xilanasa para la obtención de xilosa.
- Obtener xilitol a partir de la conversión de la xilosa, por medio de una fermentación utilizando dos tipos de especies de levadura del Género *Candida* como son la *guilliermondii* y *tropicalis*.
- Comparar el rendimiento de xilitol de cada especie de levadura involucrada en el proceso de fermentación.

1. GENERALIDADES

1.1 ASPECTOS IMPORTANTES DEL XILITOL Y GENERALIDADES DE SU PRODUCCIÓN

El xilitol es un edulcorante nutritivo, obtenido por la reducción del azúcar xilosa, el cual, posee gran poder de dulzor, excelentes propiedades fisicoquímicas y bondadosos beneficios para la salud, es considerado una alternativa de la sacarosa conocida como el azúcar común de mesa, que aporta 4 cal/g, mientras que este proporciona aproximadamente 2,4 cal/g.

1.1.1 Origen e historia. El xilitol es de origen completamente natural, se puede encontrar en alimentos de consumo diario como son frutas y verduras de gran variedad; inicialmente fue descubierto en Alemania, científicos lo hallaron de forma natural en la corteza del árbol celta betule, cuyo nombre común es Abedul; árbol que en la actualidad continúa siendo una de las principales fuentes para su producción industrial debido a que tiene un contenido significativo de xilosa.

“El edulcorante se deriva del xilano, que está presente en las paredes de las células vegetales de abedules y hayas, arroz, avena, trigo y semillas de algodón, mazorcas de maíz y tallos, junto con bagazo de caña de azúcar”¹⁵.

Su historia se le atribuye primordialmente al químico alemán Emil Hernán Fischer quien, en el siglo XIX, con exactitud en el año 1891 extrajo el xilitol de virutas de madera de haya y casi simultáneamente “el químico francés M.G. Bertrand había logrado aislar el jarabe de xilitol en el procesamiento de trigo y paja de avena”¹⁶.

1.1.2 Estructura química. “El xilitol es un alcohol de azúcar de cinco carbonos cíclico, también conocido como un polialcohol”¹⁷. “Este polialcohol tiene la denominación química de D-xilitol, su fórmula empírica es $C_5H_{12}O_5$ y su peso

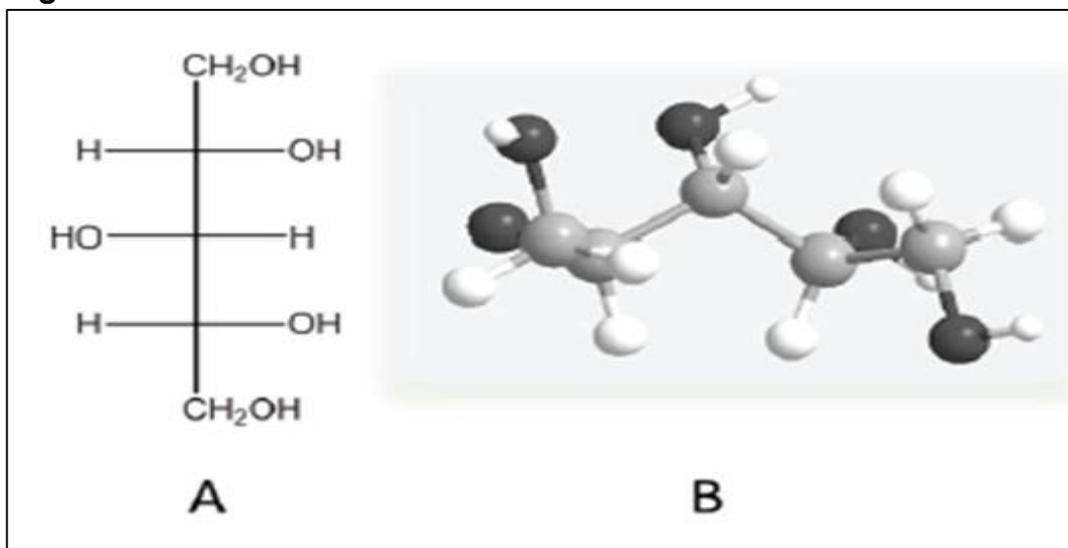
¹⁵ WRIGHT, Carolanne. Xylitol: Uncovering the dark side of this popular sugar substitute. [en línea]. 11 de febrero de 2014. Disponible en www.naturalnews.com/043857_xylitol_artificial_sweeteners_digestive_distress.html.

¹⁶ BERTRAND citado por MUN, Low Wai. process optimization for xylitol purification using liquid-liquid batch extraction: effect of volume ratios and number of stages: History of xylitol. Trabajo de grado de Licenciado en Ingeniería Química (Biotecnología). Pahang, Malaysia: Universiti Malaysia Pahang. Faculty of Chemical & Natural Resources Engineering, 2015. 27 P.

¹⁷ USVALAMPI, Anne. Microbial production of xylitol, L-xylulose and L-xylose. Xylitol. Espoo, Finland: doctoral dissertation, 2013. 14 p.

molecular es 152.15 g/mol¹⁸. En la figura 1 se observa la estructura química de este.

Figura 1. Estructura xilitol.



A) como una proyección de Fischer y B) como un modelo de barras y esferas.

Fuente: USVALAMPI, Anne. Microbial production of xylitol, L-xylulose and L-xylose. Xylitol. 1a ed. Espoo, Finland: doctoral dissertation, 2013. 14 p.

1.1.3 Propiedades fisicoquímicas. A continuación, en el cuadro 1 se muestran las propiedades fisicoquímicas del xilitol, las cuales son responsables de efectos como son la sensación refrescante que este produce al consumirlo, su dulzor, lo cual, lo hace un edulcorante atractivo en la industria alimentaria, farmacéutica y como producto para bienestar dental.

Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas del xilitol.

Propiedad	Xilitol
Peso molecular (g/mol)	152,15
Nombre químico	1,2,3,4,5 Pentahidroxi pentano
Apariencia	Blanco y cristalino
Olor	Inodoro
Sabor	Dulce
Peso molecular (g/mol)	152,15
Nombre químico	1,2,3,4,5 Pentahidroxi pentano

¹⁸ REPETTO y CAMEAN, Toxicología Alimentaria citado por SANCHEZ GOMEZ, Magaly. edulcorantes: utilización y aprovechamiento en diferentes procesos de la industria alimentaria. Trabajo de grado químico en alimentos. Toluca, México: Universidad autónoma del estado de México. Facultad de química, 2014. 67 p.

Cuadro 1 (continuación).

Propiedad	Xilitol
Apariencia	Blanco y cristalino
Olor	Inodoro
Sabor	Dulce
Poder edulcorante*	1
Solubilidad (20°C)	64,2 g/100 H ₂ O
Densidad (g/cm ³)	1,5
pH en agua	5-7
Viscosidad (cP) (20°C) **	10% 1,23; 40% 4,18; 50% 8,04; 60% 20,63
Punto fusión (°C)	92-96
Punto ebullición (°C) (1 atm)	216
Valor calórico (cal/g)	2,4
Calor de disolución (KJ/g)	0,146
Higroscopicidad	Baja

*El poder edulcorante se define en relación con el de la sacarosa, que se toma como azúcar de referencia; por lo tanto, la sacarosa y el xilitol tienen igual poder edulcorante.

**La viscosidad se da de acuerdo con la temperatura y a la concentración (%P/P) del xilitol.

Fuente: MUN, Low Wai. Process optimization for xylitol purification using liquid-liquid batch extraction: effect of volume ratios and number of stages: Properties of xylitol. Trabajo de grado de Licenciado en Ingeniería Química (Biotecnología). Pahang, Malaysia: Universiti Malaysia Pahang. Faculty of Chemical & Natural Resources Engineering, 2015. 30 P.

1.1.4 Aplicaciones. Generalmente es de gran utilidad en la industria alimentaria, farmacéutica y en productos de cuidado dental; se puede implementar como un excelente edulcorante en bebidas, caramelos duros, mentas, postres, gomas de mascar y otros productos; debido a la sensación de frescor que este genera al consumirlo. Según Calorie Control Council¹⁹ es un aditivo de gran valor para la generación de medicamentos y alimentos que van dirigidos principalmente a diabéticos; en la salud de niños se puede incorporar en suplementos multivitamínicos masticables y en dulces para que sea ingerido de manera fácil; entre sus aplicaciones más importantes esta la industria odontológica cuyo objetivo es la salud bucal, encontrándose en pastas dentales, pastillas para la garganta, jarabes y enjuagues bucales.

1.1.5 Síntesis química producción de xilitol. Es el proceso usado actualmente a escala industrial, consiste principalmente en el proceso de reducción química de xilosa pura, que es el componente mayoritario de la fracción hemicelulosa

¹⁹ CALORIE CONTROL COUNCIL. Xylitol: útil en la dieta de las personas que sufren diabetes. [en línea]. Disponible en datosobrelaspolioles.com/xylitol/. citado el 23 de diciembre de 2016.

presente en diversas plantas, de principal uso la madera de abedul, haya y mazorca de maíz o de hidrolizados hemicelulosicos ricos en xilosa.

Usvalampi²⁰ y Carrasco²¹ proponen que inicialmente se realiza una hidrolisis acida generalmente con ácido sulfúrico, clorhídrico o nítrico para obtener D-xilosa y otros azucares simples como son la D-manosa, D-arabinosa y D-galactosa, se realiza una purificación para así aislar estos hidratos de carbono y lograr obtener xilosa pura, posteriormente al hidrolizado resultante se le realiza una hidrogenación en presencia de níquel, el cual funciona como catalizador para la obtención de xilitol que es sometido a cristalización y purificación por medio de cromatografía líquida, para así separar la fracción de xilitol no cristalizada.

Este proceso incurre en altos costos debido a que se requieren varios pasos de purificación, altos requerimientos energéticos y altas presiones principalmente en la etapa de hidrogenación, por lo tanto, es un proceso complejo y no viable a pequeña escala. En el anexo A se muestra la estructura básica de la reacción de extracción de D-xilosa y su conversión a xilitol.

1.1.6 Producción biotecnológica de xilitol- Vía alterna. Carrasco²² y Naranjo²³ comentan que la producción biotecnológica de xilitol se caracteriza por la reutilización de desechos agroindustriales y el uso de hongos filamentosos, bacterias y especialmente levaduras, microorganismos que son capaces de fermentar a xilitol hidrolizados hemicelulósicos, obtenidos previamente por hidrólisis ácida o enzimática de desechos provenientes generalmente de cascarilla de arroz, bagazo de caña de azúcar, paja de trigo, mazorca de maíz y algunas pieles o residuos de frutas y verduras, la reutilización de estos residuos es viable, dado que poseen material lignocelulósico, principalmente lignina, celulosa y hemicelulosa. La hemicelulosa es el polisacárido de mayor interés, este está ubicado en la pared celular, conformado por una mezcla de hexosas (glucosa, manosa y galactosa) y pentosas (xilosa y arabinosa), hidrolizada para la liberación de xilanos e igualmente para la obtención de L-arabinosa, glucosa y xilosa, monosacáridos que serán aprovechados por el microorganismo seleccionado para la bioconversión a xilitol, en

²⁰ USVALAMPI, op.cit., P.17

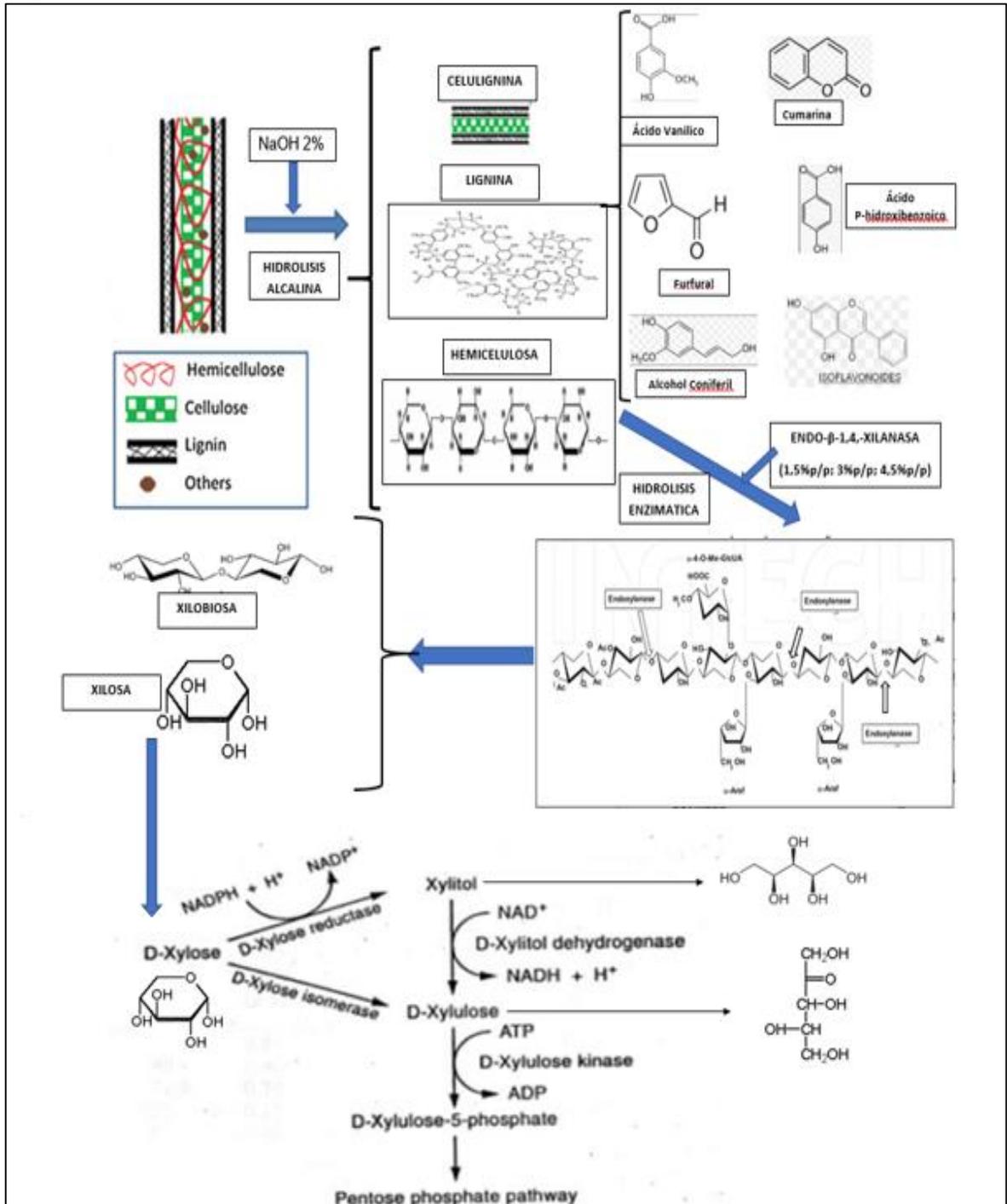
²¹ DOMÍNGUEZ CARRASCO, Eva Marení. efecto de algunos componentes del medio de fermentación sobre la actividad de xilosa reductasa obtenida de una levadura productora de xilitol: aplicaciones del xilitol. Trabajo de grado ingeniero químico. Xalapa, Veracruz: universidad veracruzana. Facultad de ciencias químicas. Departamento de ingeniería química, 2013. 7 p.

²² Ibid., P.8

²³ NARANJO, Sauk. Revisión sistemática de la literatura sobre los metabolitos generados por la levadura *Candida guilliermondii*. Trabajo de grado microbiología agrícola y veterinaria. Bogotá D.C: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias, 2011. 11 P.

la figura 2 se observa la síntesis biotecnológica planteada como vía alterna a la síntesis química.

Figura 2. Vía alterna de la síntesis química de xilitol.



1.1.6.1 Hidrólisis básica. La hidrólisis alcalina es utilizada como pretratamiento de materiales lignocelulósicos; esta consiste principalmente en la aplicación de soluciones alcalinas o básicas, esto con el fin de remover la lignina y sustituciones de ácidos úricos, los cuales reducen la accesibilidad de la enzima al momento de actuar en el compuesto de interés, ya sea celulosa o hemicelulosa²⁴.

El tratamiento con NaOH diluido (Hidróxido de Sodio) produce un hinchamiento de la biomasa, lo cual, conduce a un aumento del área superficial interna, un descenso de la cristalinidad y polimerización, causando la separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos, y una rotura en la estructura de la lignina²⁵. El mecanismo de hidrólisis alcalina está basado en la saponificación de los enlaces esteres intramoleculares que unen los xilanos de la hemicelulosa y otros componentes, como por ejemplo la lignina. Así, por ejemplo, se ha conseguido aumentar la digestibilidad de sustratos como paja con un contenido de lignina del 18% y de maderas duras, pero no de maderas blandas con un contenido de lignina superior al 26%²⁶.

1.1.6.2 Hidrólisis enzimática. El proceso consiste en descomponer la hemicelulosa en azúcares sencillos. Debido a la heterogeneidad y complejidad en la composición de la hemicelulosa, su hidrólisis requiere de un sistema de varias enzimas hidrolíticas con diversas especificaciones y modo de acción. Las enzimas implicadas en la degradación de la cadena principal son las endo- β -1,4-xilanasas y las β -1,4.-xilosidasas, y en la degradación de la cadena lateral α -L-arabinofuranosidasa, α -glucoronidasa, así como las estererasas que liberan sustituyentes acetilo, cumaril y ferúlico^{27,28}; las reacciones presentadas en este proceso dependen de las enzimas que se utilicen. En el anexo B se muestran algunas enzimas y su acción en la degradación de la hemicelulosa. La hidrólisis

²⁴ NIÑO, L. ACOSTA, A. GELVES, R. Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia núm. 69, diciembre-, 2013, pp. 317-326 [en línea]. 2013. Medellín, Colombia. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/430/43029812024.pdf>

²⁵ CUERVO, L. FOLCH, J. QUIROZ, R. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de Etanol. Centro de Investigación en Biotecnología, UAEM. 2 Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor. 62209, México. Revista BioTecnología, Año 2009, Vol. 13 No. 3. P. 11-25. [en línea]. Disponible en: http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Lignocelulosa.pdf

²⁶ NIÑO, L. ACOSTA, A. GELVES, R. Op cit., P 318.

²⁷ MOTTA, F. ANDRADE, C. SANTANA, M. A Sustainable degradation of lignocellulosic biomass - techniques, applications and commercialization. Chapter 10: Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. P. 252- 257. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5772/53544>

²⁸ LOERA, O. VILLASEÑOR, F. 14. Xylanases. Advances in Agricultural and Food Biotechnology, 2006: 305-322 ISBN: 81-7736-269-0. Universidad Autónoma Metropolitana, Biotechnology Department. México. P. 306-311.

enzimática presenta ventajas frente a la hidrólisis ácida, como menores costos, ya que esta se presenta a presión atmosférica y a temperaturas moderadas, las cuales son fácilmente controladas, no necesita de agentes químicos por lo cual, no necesita de una operación adicional para la eliminación de estos del hidrolizado.

- **Enzimas Xilanasas.** La actividad de la xilanasas conduce a la hidrólisis de la hemicelulosa o xilano. “Las xilanasas son glicosol hidrolasas que catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico interno β -(1,4) de la cadena de xilosas de la hemicelulosa, generando principalmente xilooligosacaridos de bajo peso molecular con o sin ramificaciones”²⁹.
- **Origen.** “Las xilanasas son un tipo de enzimas extracelulares que actúan de manera general sinérgicamente, estas son producidas por diferentes microorganismos como bacterias, hongos, micorrizas, levaduras, actinomicetos, además en protozoos, insectos, crustáceos, caracoles y algunas semillas de plantas durante la fase de germinación en suelo”³⁰. La mayoría provienen de fermentación microbiana a partir de hongos filamentosos o bacterias caracterizándose las β -xilosidasas y endo- β -xilanasas de los géneros *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Micrococcus*, *Staphilococcus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, entre otros^{31,32}.
- **Clasificación.** “Las enzimas se han clasificado en al menos tres formas, por su peso molecular y punto isoeléctrico, la estructura cristalina y las propiedades cinéticas, o la especificidad del sustrato y el perfil del producto”³³.

La información actualizada sobre las características y clasificación de las enzimas se encuentra en la base de datos Carbohydrate-Active Enzyme (CAZy). Según esta, las xilanasas están relacionadas con las familias 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 y 62. Las secuencias de las familias 16, 51 y 62 son enzimas bifuncionales, es decir, contienen dos dominios catalíticos; mientras que las familias 5, 7,8,10,11 y 43 tienen un dominio catalítico con la actividad

²⁹ VALENZUELA, S. Proteómica de xilanasas de *Paenibacillus barcinonensis*. Proyecciones biotecnológicas. Departamento de microbiología. Facultad de biología. Universidad de Barcelona. Septiembre 2012. Disponible en: http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/98296/SVVM_TESIS.pdf;sequence=1

³⁰ COOPER, B. Enzimas xilanólíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales. © VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud, 16(1): 19-22, 2013. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/vertientes/vre-2013/vre131e.pdf>

³¹ Ibid. p.20.

³² LOERA, O. VILLASEÑOR, F. Op.cit. p. 310

³³ MOTTA, F. ANDRADE, C. SANTANA, M. Op.cit, p. 254-255.

endo- β -1,4-xilanasas, pero difieren en sus propiedades fisicoquímicas, la estructura, el modo de acción y las especificaciones del sustrato. Las familias 9, 12, 26, 30 y 44 tienen actividad de xilanasas residual o secundaria³⁴.

En el anexo C se puede observar la estructura tridimensional de los dominios catalíticos de las xilanasas pertenecientes a diferentes familias.

- ✓ **Familia GH 10 y 11.** La mayoría de xilanasas conocidas pertenecen a la familia GH 10 (o familia G) o a la familia GH 11 (o familia F). La familia GH 10 tiene un peso molecular alto de aproximadamente 35KDa, está compuesta de endo- β -1,4-xilanasas y endo- β -1,3-xilanasas, estas son altamente activas en xilooligosacaridos cortos; capaces de hidrolizar enlaces xilosa más cerca de los residuos de cadena lateral. La familia GH 11 tienen un peso molecular bajo de aproximadamente 20KDa, tienen propiedades como alta selectividad de sustrato y alta eficiencia catalítica; está compuesta solo de xilanasas, ya que son exclusivamente activas en sustratos que contienen D-xilosa. Las xilanasas de esta familia son más activas en los xilooligosacaridos de cadenas largas; hidrolizan preferentemente las regiones no sustituidas del esqueleto^{35,36}.
- **Mecanismo de reacción de la enzima Xilanasas.** Los endo- β -1,4-xilanasas rompen los enlaces glucosídicos internos del esqueleto, específicamente los enlaces entre las unidades de xilano, liberando oligosacáridos³⁷. “El ataque no es al azar, este depende de la longitud y el grado de ramificación del sustrato o la presencia de sustituyentes específicos dentro de él”³⁸. En la figura 3 y anexo D se puede observar las enzimas que actúan sobre la hemicelulosa con sus sitios de acción.

³⁴Ibid., P. 255.

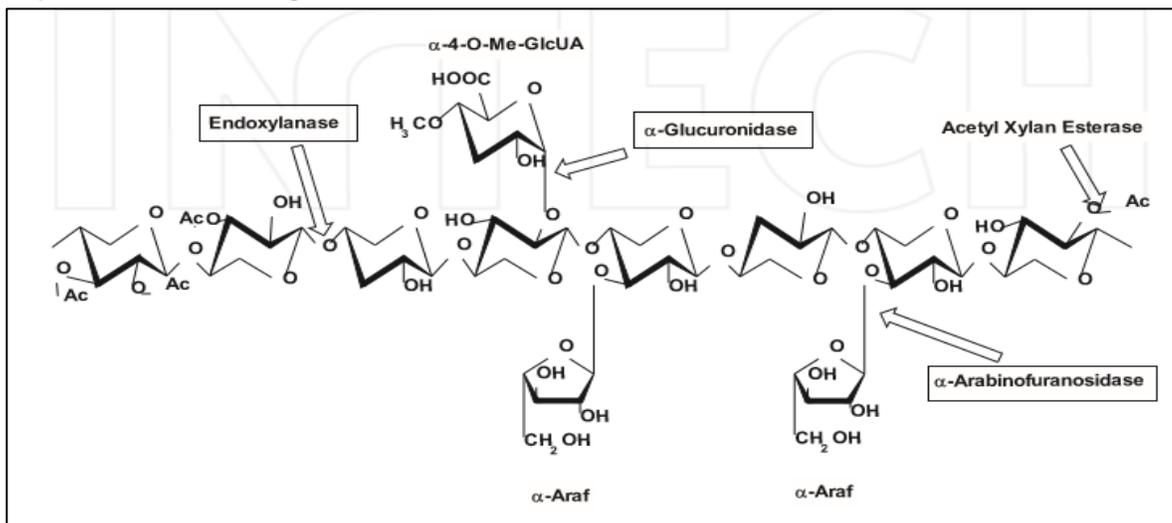
³⁵COOPER, B. Op.cit., p.20.

³⁶MOTTA, F. ANDRADE, C. SANTANA, M. Op.cit., p. 256.

³⁷LOERA, O. Las xilanasas microbianas y sus aplicaciones. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Departamento de Biotecnología. Revista Biotecnología 2002. Vol. 7. No 2. 25-37. México D, F. P. 27

³⁸LOERA, O. VILLASEÑOR, F. Op.cit., p. 310-311.

Figura 3. Estructura del xilano o hemicelulosa y de las enzimas xilanolíticas implicadas en su degradación.



Fuente: MOTTA, F. ANDRADE, C. SANTANA, M. A Sustainable degradation of lignocellulosic biomass - techniques, applications and commercialization. Chapter 10: Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. P. 252- 257. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5772/53544>.

1.1.6.3 Fermentación. De acuerdo con Usvalampi³⁹ y Affleck⁴⁰ la producción microbiana de xilitol utilizando ingeniería metabólica, consiste en la implementación de hongos, bacterias y principalmente levaduras (Anexo E) consideradas las mejores productoras de xilitol microbiano a partir de xilosa; las levaduras más eficientes han sido las del género *Candida* como lo son la *pelliculosa*, *boivinii*, *guilliermondii* y *tropicalis*. “Fluctuando los rendimientos del xilitol respecto a la xilosa entre 0,73-0,88% y las productividades entre 1,73 y 3,15 g/l*h. En 2002, Kim et al., lograron incrementar la productividad de *C. tropicalis* en una mezcla de glucosa y xilosa”⁴¹.

➤ **Levaduras.** Las levaduras usan generalmente una conversión de dos etapas de D-xilosa a D-xilulosa. En esta ruta de oxidoreductasa; ruta observada en la figura 4, la xilosa se reduce primero a xilitol mediante xilosa reductasa. El xilitol se oxida luego a D-xilulosa mediante xilitol-2-deshidrogenasa. A continuación, la

³⁹ USVALAMPI, op.cit., P.17-18

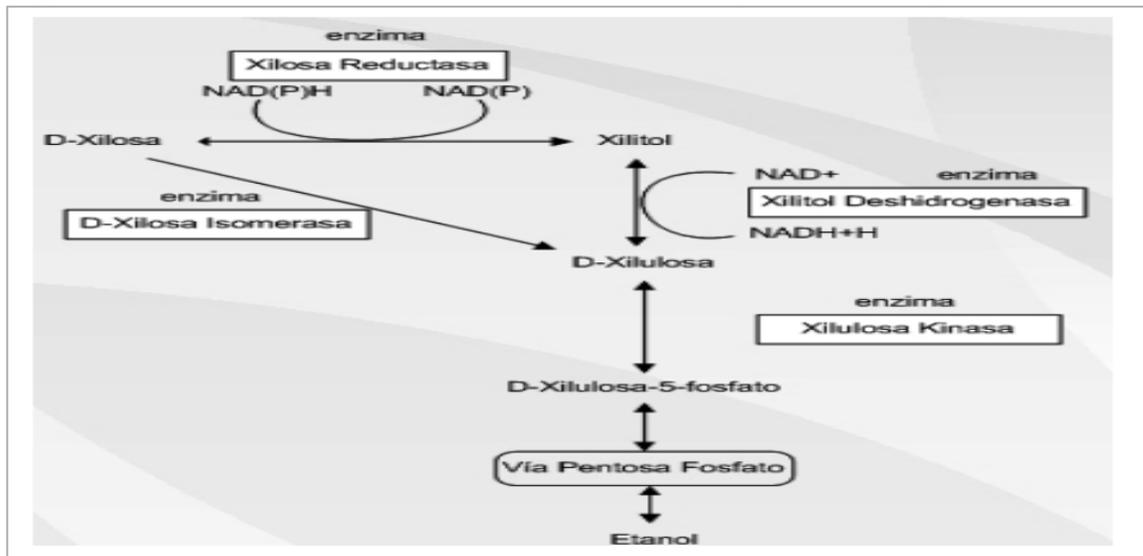
⁴⁰ AFFLECK, Richard Peter. Recovery of Xylitol from Fermentation of Model Hemicellulose Hydrolysates Using Membrane Technology: Microbial Production of Xylitol. Trabajo de grado ingeniero de sistemas biológicos. Blacksburg, Virginia: Virginia Polytechnic Institute, 2000. P 14-15.

⁴¹ Ibid.p. 25.

D-xilulosa es fosforilada por la D-xilulocinasa a D-xilulosa-5-fosfato, que puede entrar en la vía de la pentosa fosfato. Tanto XR como XDH requieren cofactores de nucleótidos de piridina para funcionar. XR y XDH pueden ser nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) o nicotinamida adenina fosfato de dinucleótido (NADP^+) dependiente. NADH y NADPH son las formas reducidas de estos cofactores.⁴²

En la primera etapa de xilosa a xilitol se oxida un NADPH a NADP^+ , y en la segunda etapa de xilitol a xilulosa se reduce un NAD^+ a NADH . Como consecuencia, NADPH y NAD^+ necesitan ser regenerados. Como las levaduras carecen de la enzima transhidrogenasa ($\text{NADH} + \text{NADP}^+ \leftrightarrow \text{NAD}^+ + \text{NADPH}$), necesitan formas alternativas para regenerar los cofactores. Bajo condiciones aerobias NAD^+ se puede regenerar con oxígeno. Bajo condiciones limitadas de oxígeno, la acumulación de NADH limita la reacción catalizada por la XDH unida a NAD^+ , dando como resultado la acumulación de xilitol.⁴³

Figura 4. Vía metabólica de fermentación de xilosa por bacterias y levaduras.



Fuente: GOMEZ, A. Comparación del rendimiento de madera de eucalipto y olote de maíz, como biomasa residual rica en hemicelulosa, para la obtención de xilitol por medio de fermentación con levadura del tipo *saccharomyces cerevisiae*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Escuela de Ingeniería Química. Febrero 2012. Guatemala. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_1229_Q.pdf

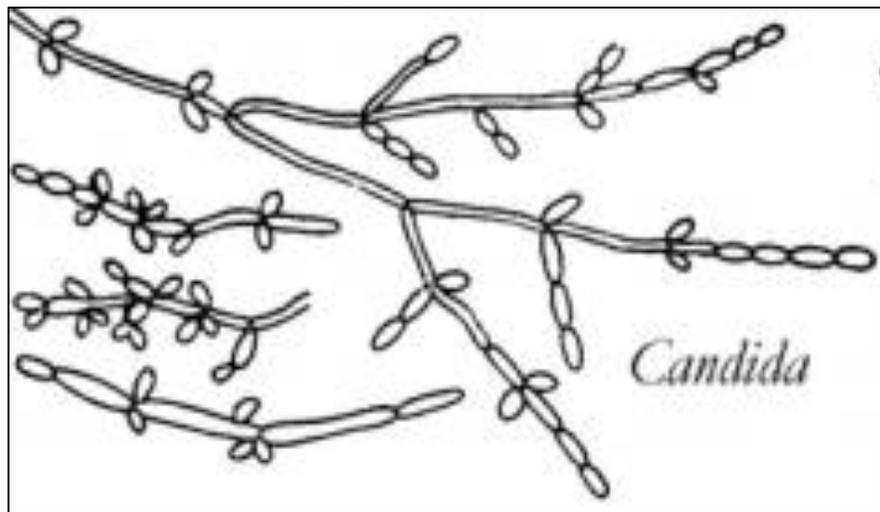
⁴² WINKELHAUSEN y KUZMANOVA, Microbial conversion of D-xylose to xilitol citado por USVALAMPI, op.cit., P.9.

⁴³ Van Dijken y Scheffers, Redox balances in the metabolism of sugars citado por ibid., P.10

- **Levaduras del Género *Candida*.** Este género abarca más de 160 especies; pertenece a la clase *Blastomycetes* que comprende las levaduras imperfectas (asexuales). Esta especie asimila azúcares como la glucosa, sacarosa, xilosa, fructosa, galactosa y celobiosa; no asimila lactosa⁴⁴. “El nombre del género significa “blanco radiante” y de ahí que sus células no contengan pigmentos carotenoides. Forman hifas verdaderas o falsas con abundantes células en gemación o blastosporas y puede formar clamidosporas”.⁴⁵

Son consideradas unas de las mejores en cuanto a producción de xilitol por fermentación, ya que estas tienen como característica natural consumir D-Xilosa y mantener el equilibrio de óxido-reducción en la acumulación de D-Xilitol, evitando que se produzca D-xilulosa⁴⁶.

Figura 5. Levadura del género *Candida*.



Fuente: ANCASI EG. Manual de microbiología de los alimentos. Capítulo 4. P.41.

⁴⁴ BARRIENTOS, I. Evaluación preliminar de la actividad metabólica de *Candida guilliermondii* sobre las propiedades fisicoquímicas de la leche y en el proceso de producción de yogurt. Microbiología industrial. Pontificia universidad Javeriana. 2011. Bogotá, D.C., Colombia. [en línea. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co:8443/bitstream/handle/10554/8828/tesis774.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

⁴⁵ BUITRAGO, J. ESCOBAR, A. Aplicación de levadura *Candida ssp.* Como una alternativa viable para la retardación en la pudrición del banano (*Musa acuminata*). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Carrera de microbiología industrial. Bogotá D, C. enero 2009. P.32. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis211.pdf> [en línea]

⁴⁶ SASAKI, M. INUI, M. YUKAWA, H. D-Xylitol. Fermentative Production, Application and Commercialization. Chapter 5 Microorganisms for Xylitol Production: Focus on Strain Improvement. DOI: 10.1007/978-3-642-31887-0_5, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

✓ ***Candida guilliermondii***. A continuación, se observa la clasificación biológica y las características microscópicas y macroscópicas para esta especie.

▪ **Taxonomía**⁴⁷. La clasificación biológica de *Candida guilliermondii* es la siguiente:

Reino: Fungi
 Subreino: Dikarya
 División: *Ascomycota*
 Subdivisión: *Saccharomycotina*
 Clase: *Saccharomycetes*
 Orden: *Saccharomycetales*
 Género: *Candida*
 Especie: *Candida guilliermondii*
 Sexual o amorfa: *Pichia guilliermondii*

▪ **Características microscópicas y macroscópicas.** Se pueden observar células pequeñas ovoides, siendo la mayoría mesófilas aerobias. Puede presentar pseudohifas después de 96 horas de incubación⁴⁸. “La formación del pseudomicelio es variable, siendo generalmente muy fino y ramificado. Los Blastosporos ovoides o cilíndricos, cortos, en posición más o menos verticilada, en las constricciones pseudomicelio y/o pseudo-hifa”⁴⁹. Presenta colonias planas, húmedas, de color blanco cremoso en medio PDA (Agar papa dextrosa).

Tabla 1. Resultados morfología *Candida guilliermondii*.

Morfología	Resultado Morfológico
Clamidosporas	Negativo
Seudomicelios	Positivo
Tubos germinales	Negativo
Cápsula	Negativo

Fuente: PRATS, G. Microbiología clínica. Editorial medica panamericana. Madrid, España. Octubre 2007. P.98.

⁴⁷MARTINEZ, C. Evaluación preliminar de la levadura *Candida guilliermondii* como controlador biológico de *Mysus sp* en la papaya. Trabajo de grado para obtener título de Biólogo. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá D, C. 2010. P.8. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co:8443/bitstream/handle/10554/8685/tesis634.pdf?sequence=1&isAllowed=y> [en línea]

⁴⁸ CMPUJ. Ficha técnica *Candida guilliermondii*. Colección de microorganismos. Pontificia Universidad Javeriana. Disponible en: Anexo 2.

⁴⁹ ANDRADE, M. Identificación de las especies del género *Candida* en gestantes con candidiasis vulvovaginal que acuden al Hospital Gineco-obstétrico Dr. Jaime Sánchez Porcel Sucre – 2011. Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca, Facultad de Ciencias Químico Farmacéuticas y Bioquímicas. Sucre, Bolivia. P.220. Disponible en: http://www.ecorfan.org/bolivia/series/Topicos%20Selectos%20de%20Quimica_I/Articulo%205.pdf

- **Generalidades de la levadura.** Crecen en rangos de temperatura entre “24 a 36°C, toleran un pH entre 3–5. Esta una especie que es asociada con micosis, que es una enfermedad producida por la levadura *Candida*, produciendo infecciones en la vagina y en las cavidades orales”.⁵⁰ “La levadura *Candida guilliermondii* no es patógena para el ser humano, es una levadura antagonista frente a otros microorganismos. Además de ello, se encontró que “es beneficiosa frente a enemigos que presentaban frutos como: piña, banano, tomate, manzana y uchuva”.⁵¹
- **Asimilación y fermentación de azúcares.** En la tabla 2 se observan los azúcares que es capaz de asimilar y fermentar la levadura *Candida guilliermondii*. Es importante tener clara la diferencia entre el proceso de asimilación y el proceso de fermentación.

La asimilación “es la capacidad de las levaduras para utilizar determinado carbohidrato como única fuente de carbono, en un medio químicamente definido y en presencia de oxígeno, al asimilar el carbono de ese azúcar es evidente el crecimiento en el medio”⁵², sin que se generen productos metabólicos. El proceso de fermentación es un proceso catabólico de oxidación incompleta, bajo condiciones de anaerobiosis, siendo el producto final un metabolito, derivado del sustrato que son frecuentemente ácidos orgánicos, alcoholes y otras sustancias de bajo peso molecular que caracterizan el tipo de fermentación ocurrida; incluidos gases como hidrogeno y dióxido de carbono⁵³.

Tabla 2. Resultado asimilación y fermentación de azúcares por *Candida guilliermondii*.

Hidrato de carbono	Resultado de la asimilación	Resultado de la fermentación
Glucosa	Positivo	Positivo
Sacarosa	Positivo	Positivo
Lactosa	Negativo	Negativo
Xilosa	Positivo	Positivo
Fructosa	Positivo	
Galactosa	Positivo	Positivo
Celobiosa	Positivo	
Rafinosa	Positivo	Positivo

⁵⁰ MARTINEZ, C. Op.cit., p. 8.

⁵¹ Ibid.p. 8.

⁵² MARTOS, Pedro; FERNANDEZ., María y PAREDES., Fernando. Microbiología clínica practica: micosis de interés clínico. 2 ed. Madrid: ediciones Diaz de santos, S.A, 1993. 421 P.

⁵³ RODRÍGUEZ, Evelyn, *et al.* Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio: fermentación de carbohidratos. Costa rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica, 2005. P 271

Tabla 2 (continuación).

Hidrato de carbono	Resultado de la asimilación	Resultado de la fermentación
Maltosa	Negativo	Negativo
Levulosa		Positivo
Ureasa		Negativo

Fuente: Adaptado de: SAENZ, P. Clave dicotómica para la determinación de géneros de levaduras. Universidad de Murcia. Facultad de veterinaria. P. C-187. Disponible en:

<http://revistas.um.es/analesumciencias/article/viewFile/101851/97021>.

BUITRAGO, J. ESCOBAR, A. Aplicación de levadura *Candida ssp.* Como una alternativa viable para la retardación en la pudrición del banano (*Musa acuminata*). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Carrera de microbiología industrial. Bogotá D, C. enero 2009. P.54-55. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis211.pdf>.

- ✓ ***Candida tropicalis***. A continuación, se observa la clasificación biológica y las características microscópicas y macroscópicas para esta especie.

- **Taxonomía⁵⁴**. La clasificación biológica de *Candida tropicalis* es la siguiente:

Reino: Fungi
 Subreino: Dikarya
 División: *Ascomycota*
 Subdivisión: *Saccharomycotina*
 Clase: *Saccharomycetes*
 Orden: *Saccharomycetales*
 Género: *Candida*
 Especie: *Candida tropicalis*

- **Características microscópicas y macroscópicas**. Se pueden observar células ovoides que pueden ser cortas o alargadas. Luego de varios días de incubación puede formar cadenas cortas de micelio⁵⁵. “Produce pseudomicelio abundante y ramificado, con verticilos de blastosporos dispuestos en cadenas simples, irregulares o ramificadas. El micelio verdadero puede estar presente en cultivo. Los blastosporos son ovoides o semiglobosos. El Clamidosporos en forma más o menos periforme (en gota o lágrima) puede estar formado”⁵⁶. Presenta colonias lisas, húmedas, de color blanco cremoso en medio PDA (Agar papa dextrosa).

⁵⁴ ITIS REPORT. *Candida tropicalis*. Taxonomix serial No. 194660. Disponible en: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=194660#null [en línea]

⁵⁵ CMPUJ. Ficha técnica *Candida tropicalis*. Colección de microorganismos. Pontificia Universidad Javeriana. Disponible en: Anexo 3.

⁵⁶ ANDRADE, M. Op.cit., p. 220.

Tabla 3. Resultados morfología *Candida tropicalis*.

Morfología	Resultado Morfológico
Clamidosporas	Negativo
Seudomicelios	Positivo
Tubos germinales	Negativo
Cápsula	Negativo

Fuente: PRATS, G. Microbiología clínica. Editorial medica panamericana. Madrid, España. Octubre 2007. P.98.

- **Generalidades de la levadura.** Crece a una temperatura de 28°C. La industria utiliza este microorganismo para la producción eficiente de dicarboxilicos de cadena larga (moléculas precursoras/moléculas intermedias) y xilitol. Conduce a la perdida de color en tintes industriales. Como es una levadura resistente a los metales, tiene potencial para la bioadsorción de cadmio y cobre⁵⁷.
- **Asimilación y fermentación de azúcares.** En la tabla 4 se observan los azúcares que es capaz de asimilar y fermentar la levadura *Candida tropicalis*.

Tabla 4. Resultado asimilación y fermentación de azúcares por *Candida tropicalis*.

Hidrato de carbono	Resultado de la asimilación	Resultado de la fermentación
Glucosa	Positivo	Positivo
Sacarosa	Positivo	Positivo
Lactosa	Negativo	Negativo
Xilosa	Positivo	Positivo
Maltosa	Positivo	Positivo
Galactosa	Positivo	Positivo
Rafinosa	Negativo	
Ureasa		Negativo

Fuente: Adaptado de: SAENZ, P. Clave dicotómica para la determinación de géneros de levaduras. Universidad de Murcia. Facultad de veterinaria. P. C-187. Disponible en: <http://revistas.um.es/analesumciencias/article/viewFile/101851/97021>.

1.1.7 Factores que influyen en la producción de xilitol. Al momento de realizar el proceso de producción de cualquier sustancia es importante tener en cuenta variables que afectan de manera trascendental el mismo, en el caso de la producción de xilitol, es importante tener en cuenta los siguientes factores.

⁵⁷ LIFE. Leading international fungal education. Fungal Infections. *Candida tropicalis*. Disponible en: <http://www.life-worldwide.org/fungal-diseases/candida-tropicalis1> [en línea]

1.1.7.1 Efecto de la temperatura. Tamburini, Costa, Marchetti y Pedrini⁵⁸ refieren que la temperatura es una de las condiciones que requiere más control en la velocidad de crecimiento del microorganismo, debido a que con una temperatura óptima la célula y las enzimas intracelulares logran captar y asimilar la xilosa necesaria del medio. Según estudios realizados a bajas temperaturas se tiene una menor disponibilidad de sustrato, por otro lado; a altas temperaturas posiblemente se pueden presentar inactivaciones celulares, por lo tanto, se logra un consumo hasta del 90% de xilosa en un rango de temperatura de 28°C a 37°C, por fuera de este intervalo disminuye drásticamente el rendimiento de xilitol.

1.1.7.2 Efecto del pH. Según Carrasco⁵⁹, Tamburini, Costa, Marchetti y Pedrini⁶⁰ el proceso de fermentación de la D-xilosa se ve afectado especialmente por el pH, dado que la velocidad y el volumen transportado de xilosa al interior de la célula dependen de las variaciones de pH externo. Las levaduras son organismos acidófilos, debido a que crecen bien en medio ácido; cuyo pH se encuentra entre 3,5 y 4 pero su umbral de tolerancia está en el rango de 2,5 a 8; pH que depende básicamente de la especie de levadura utilizada.

1.1.7.3 Efecto de la concentración inicial de xilosa. EL-Baz, Shetaia y Elkhoul⁶¹ determinaron que la formación de xilitol utilizando levaduras es sensible a la concentración de sustrato, de manera que influye directamente en el metabolismo de la xilosa y la secreción extracelular de xilitol. Concentraciones de xilosa extremadamente altas (más de 200 g / l) pueden reducir la acumulación de xilitol debido a que estos aumentos son perjudiciales para el rendimiento, ocasionando estrés al microorganismo por cantidad excesiva de azúcar en el medio y presión en las enzimas encargadas de metabolizar la xilosa.

1.1.7.4 Efecto de la oxigenación. “El oxígeno se considera la condición más delicada para el rendimiento, pues la producción de xilitol se da bajo condiciones limitadas de oxígeno. Por otra parte, la actividad del xilitol deshidrogenasa también se incrementa con la baja concentración de oxígeno. La producción de biomasa en las levaduras generalmente se ve favorecida por la aireación”.⁶²

⁵⁸ TAMBURINI, Elena, *et al.* Optimized Production of Xylitol from Xylose Using a Hyper-Acidophilic *Candida tropicalis*. Ferrara, Italia Jürg Bähler.; 2015. biom5031979.

⁵⁹ DOMÍNGUEZ CARRASCO, *op.cit.*, P.13

⁶⁰ TAMBURINI, Elena, *et al.* *Op.cit.*, P.2

⁶¹ A. F., EL-Baz, Y. M., Shetaia y R.R, Elkhoul. Xylitol production by *Candida tropicalis* under different statistically optimized growth conditions. Sadat, Egypt: Academic Journals, 2011.

⁶² SCOOG, *et al.* Effect of Oxygenation on Xylose Fermentation by *Pichia stipitis* citado por GONZÁLEZ HERNÁNDEZ, Juan Carlos, *et al.* Producción y Aplicaciones Biotecnológicas del Xilitol. Morelia, México: Biotecnología, 2011. Vol. 15 No. 2. 26 p.

1.1.7.5 Efecto del furfural, glicerol, urea, ácido acético y glucosa. Carrasco⁶³ enfatiza que los furanaldehídos son compuestos inhibidores que afectan tóxicamente el crecimiento celular de la levadura, inhibiendo la respiración y la fosforilación oxidativa. El glicerol funciona como un intermediario metabólico, formado en condiciones de estrés celular, exactamente por un proceso fisiológico para la regeneración de la coenzima NADH, cofactor esencial de la enzima xilosa reductasa. La urea funciona como fuente de nitrógeno que complementa el medio de cultivo, alcanzándose mayor producción de xilitol. El ácido acético es un fuerte inhibidor del metabolismo de la xilosa, debido a problemas en la absorción del sustrato por la célula, inhibiendo de igual manera la actividad de la enzima intracelular, XR cumple un papel fundamental en la conversión a xilitol, lo mismo ocurre con la presencia de glucosa en el medio, razón por la cual se logran mejores resultados en ausencia de esta hexosa, caso de las levaduras del género *Candida* particularmente. Algunas levaduras que ingieren glucosa necesitan metabolizarla y consumirla rápidamente, hasta que se logre una baja concentración de esta se da inicio al proceso de metabolismo de xilosa deseado.

1.2 MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

Los materiales lignocelulósicos se han convertido en fuente importante de estudio, debido a las propiedades que tienen sus componentes. “La lignocelulosa es el componente que mayor porcentaje en peso que posee la biomasa”⁶⁴; la biomasa lignocelulosica entendida como el conjunto de residuos de procesos industriales, agroindustriales, forestales, entre otros; los cuales son generados en grandes cantidades y desaprovechados al ser generalmente inertizados o eliminados mediante combustión⁶⁵; son residuos que producen problemas medioambientales al producir gases de efecto invernadero; por lo cual, a través de los años se han buscado métodos y diversos procedimientos en los cuales se aprovechen estos compuestos.

1.2.1 Celulosa. La celulosa es el componente que se encuentra en mayor cantidad en los materiales lignocelulósicos y también es uno de los componentes orgánicos más abundantes en la Tierra⁶⁶. Es considerado un biopolímero ya que forma parte

⁶³ DOMÍNGUEZ CARRASCO, op.cit., P.13-15

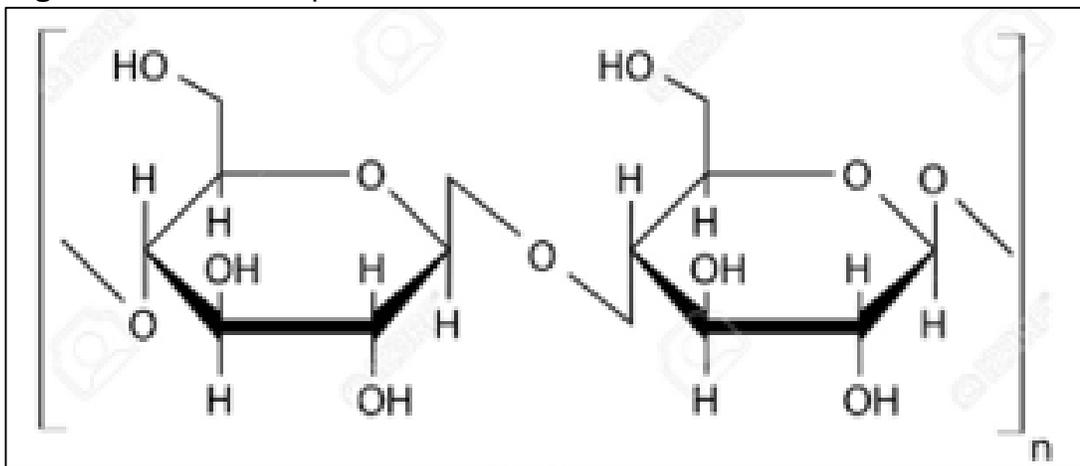
⁶⁴ DIAZ, J. Sistemas de energías renovables. Energía y agua. Capítulo 5: Aprovechamiento de biocombustibles. 5.6 Procesos de pretratamiento físicos, químicos y biológicos. Técnico superior en Energías Renovables. Ediciones Parainfo S.A. 1 Edición.2015. España. p. 177. Disponible en: https://books.google.com.co/books?id=sKR9CAAAQBAJ&pg=PA177&dq=materiales+lignocelulosicos&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=materiales%20lignocelulosicos&f=false

⁶⁵ Ibid. p.177

⁶⁶ HERNANDEZ, M. SASTRE, A. Tratado de nutrición. Editorial Diaz de santos. 1999. Capítulo 21. Las sustancias nutritivas: grupos y funciones. Clasificación de alimentos. p.329. Disponible en:

de estructuras biológicas vegetales⁶⁷, formado por subunidades de D-glucosa, unidas por β -1,4 glucosídicos, disposición bastante rígida, estable⁶⁸ y ordenada que le proporciona su inercia química⁶⁹. Posee dos estructuras una cristalina o nativa, caracterizada por un alto grado de cristalinidad u ordenamiento y de polimerización, por lo cual, es insoluble y otra amorfa o modificada, la cual es soluble y su grado de cristalinidad y polimerización es menor⁷⁰.

Figura 6. Estructura química de la celulosa.



Fuente: LEBEDEV, A. La fórmula química estructural del polímero de celulosa, ilustración 2D, vector, aislado en blanco. Disponible en: https://es.123rf.com/photo_27539074_la-formula-quimica-estructural-del-polimero-de-celulosa-ilustracion-2d-vector-aislado-en-blanco.html

1.2.2 Hemicelulosa. La hemicelulosa es una estructura compleja y heterogénea de carbohidratos, su estructura posee diferentes polímeros de pentosas y hexosas, principalmente D-xilosa, L-arabinosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa, y ácido D-galacturónico entrelazadas entre sí glucosídicamente que aparecen en las paredes celulares de forma amorfa⁷¹.

https://books.google.com.co/books?id=SQLNJOsZClwC&pg=PA329&dq=celulosa,+hemicelulosa+y+lignina&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=celulosa%2C%20hemicelulosa%20y%20lignina&f=false

⁶⁷ MEDINA, M. LARA, L. AGUILAR, C. DE LA GARZA, H. Aprovechamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol como carburante. Universidad autónoma de Coahuila Blvd. Venustiano Carranza. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Investigación de Alimentos. 2011. Disponible en: <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%206/4.html>

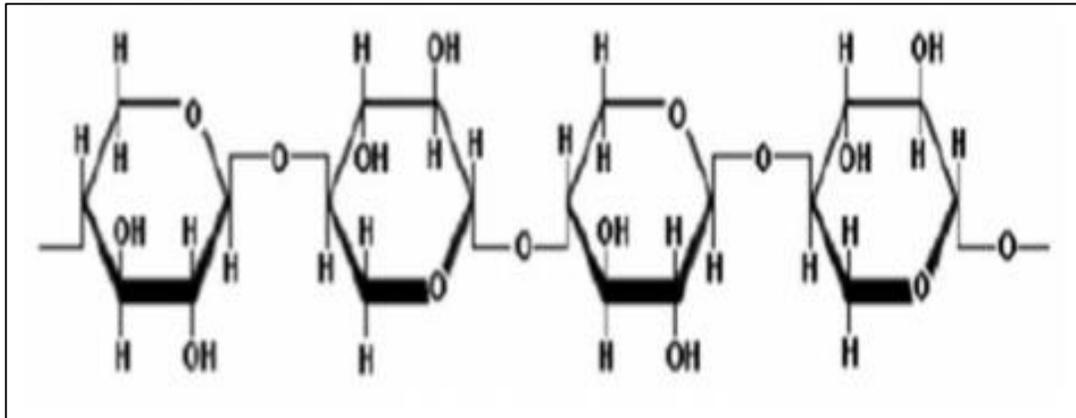
⁶⁸ SANCHEZ, A. GUTIERREZ, A. MUÑOZ, J. RIVERA, C. Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. Revista Tumbaga. 2010. [5] 61-91. p.62.

⁶⁹ HERNANDEZ, M. SASTRE, A. Op.cit., p. 329.

⁷⁰ ESPINOSA, F. Obtención de etanol mediante hidrólisis alcalina, enzimática y fermentación a partir del excedente orgánico del banano variedad *Musa paradisiaca*. Universidad central del Ecuador. Facultad de Ingeniería Química. Tesis de Grado. Quito, 2013. p. 7

⁷¹ Ibip. p. 8

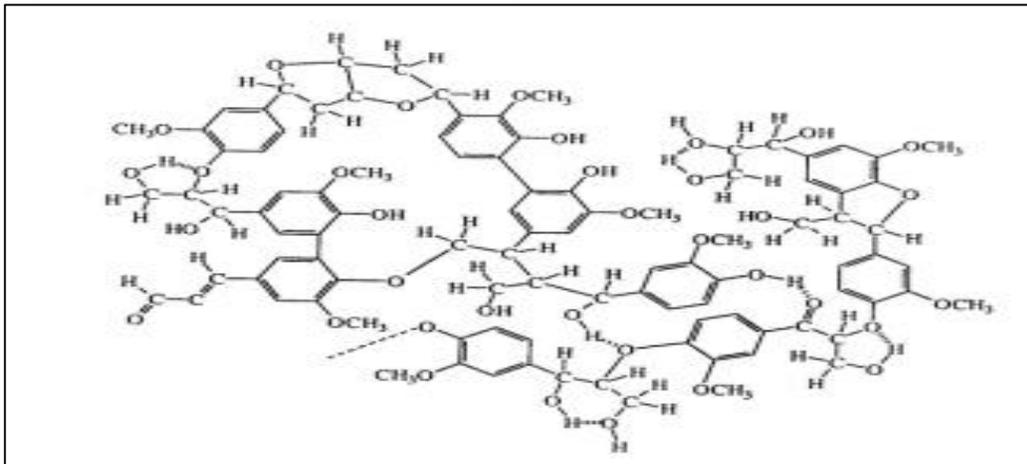
Figura 7. Segmento de la estructura química de la hemicelulosa.



Fuente: TAIZ, Lincoln y ZEIGER, Eduardo. Fisiología vegetal. 1. Universidad Jaume I. 2006.p. 50

1.2.3 Lignina. La lignina es un hetero polímero amorfo que consta de tres diferentes unidades de fenilpropano (p-coumaril, coniferil y sinapil alcohol) los cuales se mantienen unidos por diferentes enlaces; este no es soluble en agua y ópticamente inactivo⁷². “Esta imparte resistencia a la degradación microbiana de la madera. La íntima asociación espacial existente entre los polisacáridos y la lignina dentro de las paredes celulares de la madera provee una barrera protectora que impide la degradación de la celulosa⁷³.”

Figura 8. Estructura química de la lignina.



Fuente: TAIZ, Lincoln y ZEIGER, Eduardo. Fisiología vegetal. 1. Universitat Jaume I. 2006. p.51.

⁷² SANCHEZ, A. GUTIERREZ, A. MUÑOZ, J. RIVERA, C. Op.cit., p. 63.

⁷³ ESPINOSA, F. Op.cit., p. 8.

1.3 PIÑA (*Ananas comosus*)

La piña es una de las plantas y frutas tropicales más conocidas de las 2700 especies agrupadas en 56 géneros de la familia *Bromeliaceae*⁷⁴; “conociéndose alrededor de quince especies *Ananas*, principalmente: *Sativus* (sin semillas), *Comosus* (forma semillas capaces de germinar), y *Lucidus* (permite una recolección más fácil porque sus hojas no poseen espinas)”⁷⁵. La *Ananas comosus* es cultivada en regiones tropicales y subtropicales principalmente para alimento, ya que tiene una alta demanda tanto en forma fresca como procesada.

1.3.1 Piña Gold MD2. Este tipo de piña está catalogada como una fruta de lujo en los mercados externos. Presenta un sabor muy dulce y ligeramente ácido agradable al paladar; llega en su maduración a pesar 1,7Kg aproximadamente, presenta pencas mucho más largas que la perolera, no tiene ojos profundos sino más hacia lo pando⁷⁶. Esta se caracteriza por tener una cabeza acolchada, de color anaranjado y brillante cuando madura.⁷⁷ Su fruto es de corteza leñosa y olorosa, su color es verdoso, su pulpa es perfumada y carnosas⁷⁸. En Colombia a pesar de que se empezó a cultivar en grandes cantidades hace pocos años, se ha posicionado como una de las más cosechadas y consumidas.

Figura 9. Piña Gold MD2.



Fuente: CAMPO VERDE. md2 y cayena. Disponible en: <http://www.campoverdesa.com.mx/products.html>

⁷⁴ GARCIA, D. SERRANO, H. La pina, *Ananas comosus* (L.) Merr. (Bromeliaceae), algo más que un fruto dulce y jugoso. Laboratorio de Micropropagación y Propagación Vegetal. Departamento de Biología. Laboratorio de Biología Molecular. Departamento de Ciencias de la Salud UAM-I. 2005. p.55 Disponible en: <http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n56ne/pina.pdf>

⁷⁵ Ibip. p.55

⁷⁶ LA FINCA DE HOY. Conozca las diferencias entre variedades de piña oro miel y perolera. 26 de octubre. Episodio disponible en: <http://noticias.caracoltv.com/la-finca-de-hoy/conozca-las-diferencias-entre-variedades-de-pina-oro-miel-y-perolera>

⁷⁷ NEIRA, A. MARTINEZ, A. ORDUZ, J. Análisis del mercado de piña Gold y Perolera en dos principales centrales mayoristas de Colombia. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria*. 17(2):149-165. P.151. Mayo-agosto 2016. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v17n2/v17n2a02.pdf>

⁷⁸ Ibid. p. 151

1.3.2 Composición química. La Piña es una fruta rica en agua (Aprox 87% de la piña), aminoácidos, carbohidratos (Aprox 11% de la piña), ácidos orgánicos, vitaminas y minerales, aportando fibra a la dieta humana, nutrientes que se observan en el cuadro 2 de manera específica. “Se considera un alimento digestivo debido a su ingrediente activo la bromelaina, mezcla entre cinco enzimas proteolíticas que difieren una de otras por su capacidad de oxidar y reducir substratos específicos”⁷⁹. La cáscara y la corona de la piña están conformadas principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina compuestos no aptos para el consumo humano, pero si potencialmente aprovechables para la obtención de productos de valor agregado⁸⁰.

Cuadro 2. Composición química y nutricional de la piña.

Nutriente	Composición
Carbohidratos	Fructosa, glucosa y sacarosa.
Vitaminas	Tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), piridoxina (vitamina B6), biotina (vitamina B7), retinol (vitamina A), alfa tocoferol (vitamina E), fitomenadiona (vitamina K), betacaroteno, caroteno y tocoferol.
Minerales	Potasio, magnesio, calcio, fósforo, zinc, cloro, cobalto, cobre, flúor, hierro, yodo, manganeso, níquel, selenio y sodio.
Ácidos orgánicos	Ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico (vitamina C), ácido nicotínico (vitamina B3) y ácido pantoténico (vitamina B5).
Aminoácidos	Ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, arginina, cistina, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, tirosina, treonina, triptófano y valina.

Fuente: LOS ALIMENTOS. Información general acerca de la piña. Disponible en: <http://alimentos.org.es/pina>

⁷⁹ MONROY, J. GRANADOS, J. Diseño y construcción de una maquina despulpadora semi-automática para piña. Proyecto de grado para obtener el título de Ingeniero Mecatrónica. Universidad de San Buenaventura. Facultad de Ingeniería. Programa de Ingeniería Mecatrónica. Bogotá, D.C., Colombia. 2011. Disponible en: <http://biblioteca.usbbog.edu.co:8080/Biblioteca/BDigital/66021.pdf>

⁸⁰ JIMENEZ, J. Aprovechamiento de Residuos Celulósicos de piña para la producción de Carbón Activo. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Químicas. Programa educativo Ingeniería Ambiental. Tesis para acreditar la Experiencia Educativa: Experiencia Recepcional. Xalapa, Veracruz. Junio 2014. Disponible en: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/37824/1/jimenezbustamantejosemiguel.pdf>

A continuación, en la tabla 5 y anexo F se muestran los resultados obtenidos en diferentes estudios de caracterización en cuanto a composición de celulosa, hemicelulosa, lignina, entre otros; de partes de la piña Golden MD2.

Tabla 5. Composición de la cáscara de piña seca y molida variedad MD2.

Ensayo	resultado
Humedad	7,46% (±0,01)
Cenizas	4,25% (±0,01)
Solubilidad en agua fría	29,32% (±0,01)
Solubilidad en agua caliente	30,93% (±0,01)
Solubilidad ciclohexano-etanol	24,74% (±0,02)
Lignina	9,05% (±0,02)
α-celulosa	41,19% (±0,01)
Holocelulosa	65,61% (±0,01)
Xilano	28,40 g/L (±0,04)

Fuente: AMADOR, K. CARRILLO, O. ALVARADO, P. VEGA, J. Obtención de xilosa a partir de desechos lignocelulósicos de la producción y proceso industrial de la piña (*Ananas comosus*). Revista Uniciencia 26. p 75-89. Costa Rica. 2012.

En el estudio realizado en la ciudad de San José, Costa Rica, llamado Metaanálisis de los subproductos de piña (*Ananas comosus*) para la alimentación animal, se determinó la composición nutricional de la planta de piña y sus partes, como se observa en la tabla 6.

“En el caso de los valores obtenidos para la celulosa y la hemicelulosa, se recopiló información determinada bajo dos metodologías diferentes, para los análisis bromatológicos se utilizó la metodología de Van Soest y Robertson (1985) y en los trabajos con énfasis en la industria textil, papelería o de obtención de etanol o metanol, se utilizó la metodología descrita por Updegraff (1969) y Deschatelets y Yu (1986). En el caso de obtener un efecto significativo, según la parte de la planta, se realizó la prueba de Waller ($p < 0,05$) para la agrupación entre las medidas según su significancia”⁸¹.

⁸¹ Herrera, M. WingChing, R. Rojas, A. Meta-análisis de los subproductos de piña (*Ananas Comosus*) para la alimentación animal. López et al. Subproductos del cultivo de la piña. 2014. Disponible en: <http://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v25n2/a16v25n2.pdf>

Tabla 6. Composición nutricional de la planta de piña según la parte analizada y el estado del material. San José, Costa Rica. 2011.

Parte de la planta	Composición nutricional*											
	MS	PC	FDN	FDA	Celu- losa	Hemice- lulosa	Ligni- na	CNF	Ceni- zas	NDT	EN _L	EN _G
	(%)									(%)		
	% MS											
Observaciones	175	177	150	148	42	53	91	114	140	50	46	46
	(Mcal/kg MS)(3X)											
Planta entera	25,2bc	7,6bc	60,8ab	34,7b	37,7b	29,9a	6,6bc	21,9bc	7,3bc	63,8ab	1,39a	0,92a
Rastrojo	15,0c	10,1ab	53,4bc	32,6b	25,8c	17,3b	3,4c	24,7bc	9,5b	62,8ab	1,37abc	0,82ab
Corona	17,0bc	11,0a	59,3ab	35,5b	59,0a	17,5b	3,3c	22,8bc	7,9bc	66,6a	1,44ab	0,91a
Tallo	30,2b	3,7de	46,2c	20,7c	-	-	5,3bc	45,9a	3,4de	-	-	-
Raíces	59,1a	2,5e	70,9a	60,6a	-	-	17,5a	10,2c	15,9a	-	-	-
Cáscara y pulpa	29,5bc	8,2abc	63,9ab	34,3b	22,2c	27,7a	4,7bc	17,6c	8,8bc	60,2b	1,33bc	0,85bc
Pulpa	51,9a	5,9cd	53,2bc	23,7c	25,4c	29,5a	5,3bc	12,2c	3,0de	-	-	-
Cáscara	26,6bc	6,9bcd	54,8bc	20,8c	10,1d	5,8c	7,8b	37,5ab	5,2cd	59,2b	1,31c	0,71c
Corazón	21,9bc	2,1e	-	-	-	-	-	-	0,7e	-	-	-
Estado del material												
Seco	78,9a	6,2c	64,5a	29,8c	27,0a	32,6a	7,3a	18,2a	5,2c	61,7a	1,36a	0,78ab
Ensilado	15,7b	10,0a	57,1b	34,6a	25,7a	17,1b	3,6b	23,3a	9,9a	63,3a	1,38a	0,83a
Fresco	15,4b	9,1b	56,7b	32,4b	24,2a	17,6b	4,9b	22,9a	7,8b	61,1a	1,35b	0,74b

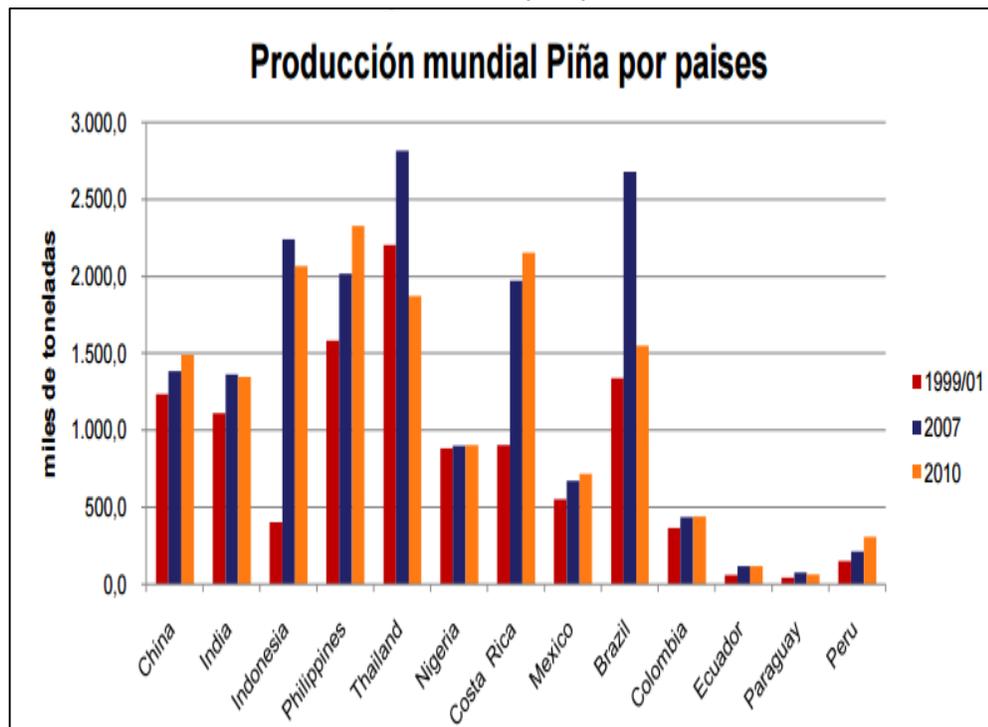
*MS= materia seca, PC= proteína cruda, FDN= fibra detergente neutro, FDA= fibra detergente ácida, CNF= carbohidratos no fibrosos, NDT= nutrientes digestibles totales, EN_L= energía neta para lactancia; EN_G= energía neta para ganancia. Letras diferentes en una misma columna difieren significativamente (p<0,05).

Fuente: Herrera, M. WingChing, R. Rojas, A. Metaanálisis de los subproductos de piña (*Ananas Comosus*) para la alimentación animal. López et al. Subproductos del cultivo de la piña. 2014.

1.3.3 Producción nacional. La piña es la segunda fruta tropical más importante en el mundo, las altas productividades del cultivo dependen principalmente del éxito que se tenga en el manejo de cada uno de los factores controlables, así como en el manejo de plagas y enfermedades⁸². Colombia es el segundo país a nivel Suramérica en producción de piña después de Brasil como se puede observar en la Grafica 1, reportando una producción de aproximadamente 500 miles de toneladas en el año 2010.

⁸² OLMOS, A. Gobernación de Casanare. Cadena regional de piña departamento de Casanare 2015. Secretaria de Agricultura Ganadería y Medio Ambiente. P. 3

Grafica 1. Producción mundial Piña por países.



Fuente: FAO

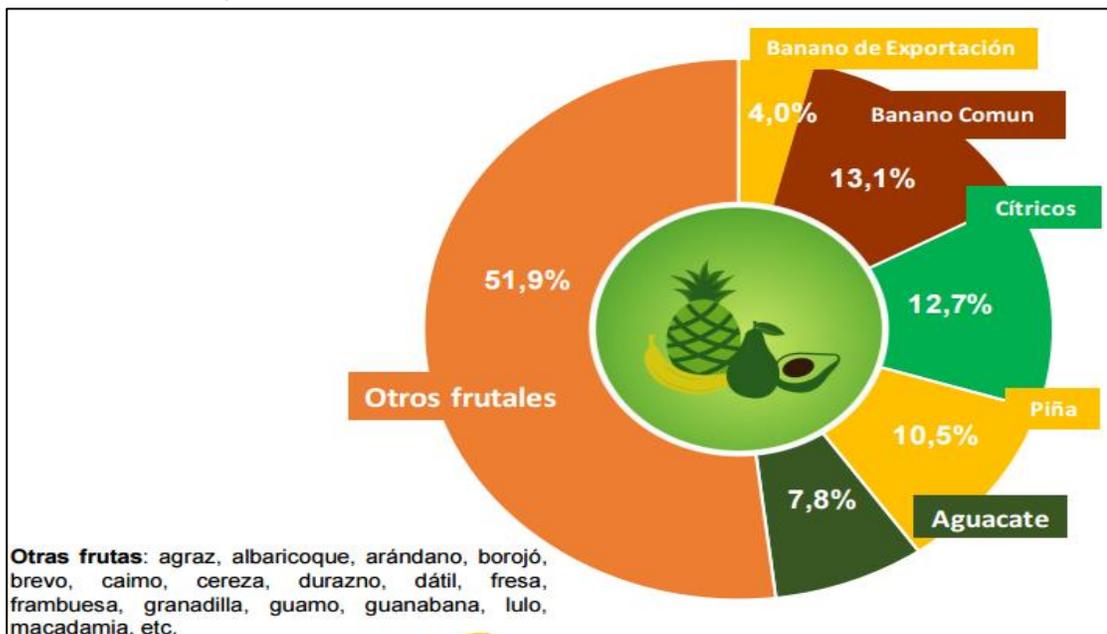
“Al revisar las exportaciones de piña por partida arancelaria, se encuentra que la piña fresca representa el 66% del total de piña exportada y el 1,5% del total de toneladas de frutas y hortalizas exportadas. El 34% restante de las exportaciones, según cifras del 2013 corresponden principalmente a las demás piñas tropicales (*Ananas*) preparadas o conservadas de otro modo (129,6 ton), piñas tropicales (*Ananas*), en agua con adición de azúcar u otro edulcorante, incluido el jarabe, preparadas o conservadas de otro modo (97,3 ton) y compotas, jaleas y mermeladas de piñas tropicales (*Ananas*), obtenidas por cocción, incluso con adición de azúcar u otro edulcorante (78,5 ton)”⁸³.

“La piña en Colombia ocupa el tercer puesto en producción de frutas con una producción anual promedio de 400.000 toneladas después de la producción de cítricos con una producción anual de 500.000 toneladas, según informes del DANE”⁸⁴.

⁸³ Ibid. p. 5

⁸⁴ Ibid. p. 7.

Figura 10. Participación (%) del área agrícola dedicada a cultivos de frutas en el área rural dispersa censada.



Fuente: MIN AGRICULTURA, DANE, 3 CENSO NACIONAL AGROPECUARIO. Censo Nacional Agropecuario 2014. Inventario agropecuario en las unidades de producción agropecuario (UPA). Disponible en: https://www.dane.gov.co/files/CensoAgropecuario/avanceCNA/PPT_9.pdf

Siendo la piña Gold MD2 la de mayor interés y que a través de los años se ha venido posicionando como una de las de mayor producción por su sabor, consistencia y durabilidad, además de ello, las plantas son de rápido crecimiento y rápida obtención de la fruta comercial, posee buen manejo postcosecha⁸⁵; Rómulo Villaroel afirma, “su sabor es mucho más dulce y es manejable técnicamente. No es muy vulnerable a plagas ni enfermedades de suelo como las otras variedades”⁸⁶.

⁸⁵ LOPEZ, L. RINCON, N. Estandarización de un método de extracción de zumo de piña. Universidad tecnológica de Pereira. Facultad de tecnología. Programa de especialización en procesos industriales agroalimentarios. Pereira, Colombia. 2016. Disponible en: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/7390/664804774B928.pdf?sequence=1>

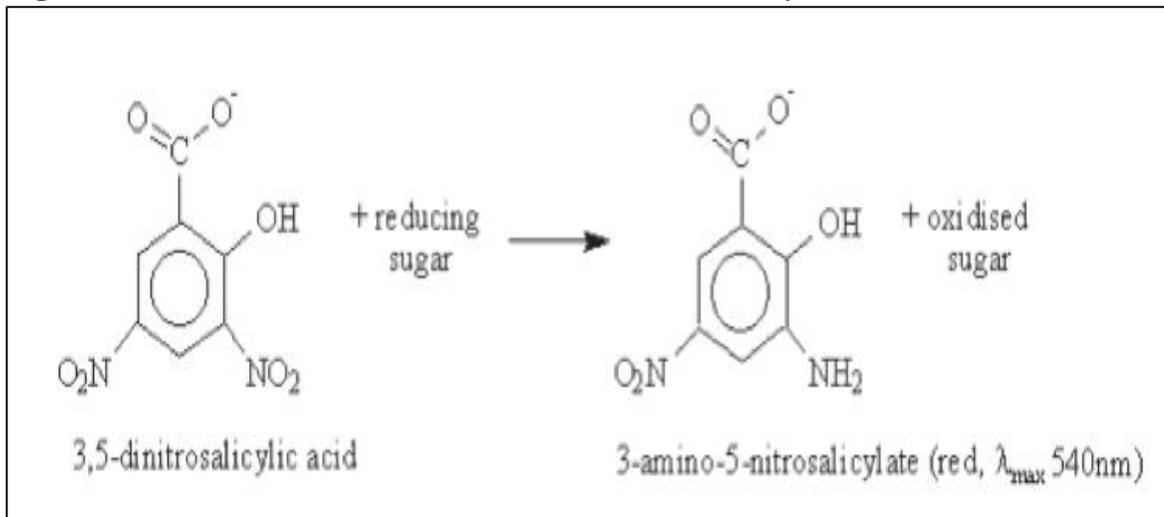
⁸⁶ Diario EL COMERCIO. Una piña extra dulce es la más cotizada. 26 de febrero 2011. Disponible en: <http://www.elcomercio.com/actualidad/negocios/pina-extradulce-mas-cotizada.html>.

1.4 MÉTODO ÁCIDO 3,5 DINITROSALICÍLICO (DNS) PARA LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Según Miller⁸⁷ el método DNS consiste en una reacción redox entre el reactivo DNS y los azúcares reductores presentes en la muestra de interés, este método prueba la presencia de grupos carbonilos libres.

El reactivo DNS está formado por ácido dinitrosalicílico, el cual actúa como oxidante, Sal de Seignette (Tartrato sodio-potasio), la cual evita que el oxígeno se disuelva en el reactivo e hidróxido de sodio el cual, regula el medio a condiciones alcalinas para que ocurra la reacción de óxido-reducción⁸⁸. El método se fundamenta en la reducción del ácido 3,5 dinitrosalicílico en presencia de azúcares reductores y exposición al calor a ácido 3-amino, 5-nitrosalicílico, compuesto cuya máxima absorción se presenta a una longitud de onda de 540 nm, longitud donde la concentración de azúcares reductores es proporcional al valor de absorbancia, de tal forma que a mayor concentración de azúcares se presenta mayor intensidad de coloración de la muestra.

Figura 11. Reacción Redox entre azúcares reductores y reactivo DNS.



Fuente: ENZINETICUPIIG. Bradford y DNS: Ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). [en línea]. Disponible en: <https://sites.google.com/site/enzineticupiig/bradford-y-dns>. Citado el 15 de abril de 2017.

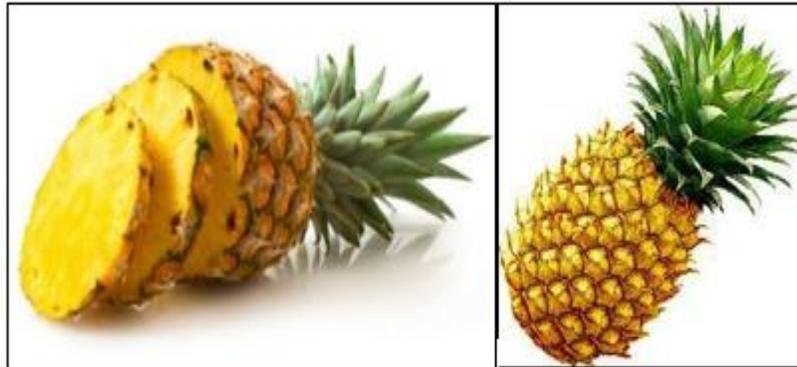
⁸⁷ MILLER, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, 1959. *Anal.Chem.* 31: P. 426-428.

⁸⁸ BELLO, Daniel., CARRERA, Emilia y DÍAZ, Yuset. Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método ácido 3,5 dinitrosalicílico. Cuba: Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, 2006. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/2231/223120664006.pdf>

2. OBTENCION DE MUESTRA DE PIÑA

La variedad de piña seleccionada para la obtención de la muestra, fue la MD2 más conocida como piña oro miel o Golden, híbrido que se caracteriza por su contenido de azúcares, agradable sabor y aroma dulce, razón por la cual se ha venido posicionando como una de las de mayor demanda en territorio colombiano y la más cotizada en el mercado externo; principalmente para la venta como “fruta lista para consumir” en puntos informales, cuya comercialización es especialmente en 3 presentaciones para consumo fresco, picada, en rodaja y jugos o néctares.

Figura 12. *Ananas comosus* variedad MD2.



Fuente: OLMUE, piña MD2 (oro miel). [en línea]. Citado el 24 de mayo de 2017. Disponible en: <http://www.olmue.com.co/producto-insumo/materia-prima-pina-oromiel/>

2.1 MADURACION CUALITATIVA

“La piña no es una fruta climatérica (es decir, madura después de ser cosechada), posee dos fases de maduración: 1) Fisiológica, que se realiza durante los procesos normales en la planta; y 2) Organoléptica, que es una restructuración metabólica y química que se realiza dentro del fruto, la denominación de organoléptica se determina por la influencia en los sentidos el color, sabor, olor y textura.”⁸⁹

El color de la cáscara es la principal señal del estado de madurez de la fruta, según la norma NTC 729-1⁹⁰, determinado sin la destrucción del fruto, la maduración organoléptica de esta inicia con el cambio de tonalidad de verde a amarillo que comienza en la base de la piña y avanza hasta la corona, “los cambios de color se

⁸⁹ SERRATO, Liliana. parámetros de comercialización de la piña md2 en los principales mercados hondureños, 2013. Disponible en: <http://pronagro.sag.gov.hn/dmsdocument/3360>

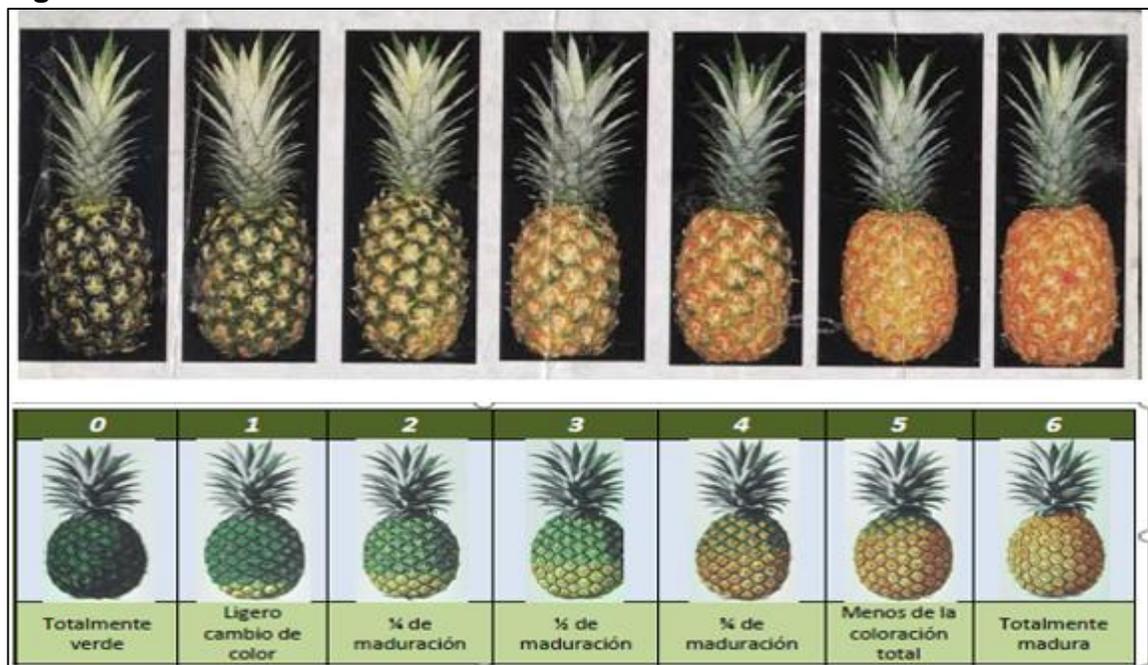
⁹⁰ INCONTEC. Norma técnica colombiana, NTC 729-1: frutas frescas. Piña. Especificaciones, Bogotá, D.C. 1996. P 4.

deben a procesos de degradación, consecuencia de la descomposición de la clorofila, disminuyendo gradualmente hasta desaparecer”⁹¹. “A un incremento de la síntesis de pigmentos de color amarillo, naranja y rojo, carotenoides y antocianinas que le dan un aspecto más atractivo a la piña.”⁹²

El desarrollo de frutículos es también un indicador del grado de madurez, a medida que esta se va dando los frutículos adquieren una apariencia plana. Estos dos factores de maduración son los que se tienen en cuenta con respecto a la cáscara.

2.1.1 Maduración por color de cáscara. A continuación, en la figura 13 se observa la gama de maduración de la cáscara de la *ananas comosus*.

Figura 13. Grados de maduración de la *Ananas comosus*.



Fuente: MASSEY. Piña tropical, *Ananas*, escala Traslucidez, escala colores, citado por SERRATO, Liliana. parámetros de comercialización de la piña md2 en los principales mercados hondureños, 2013. Disponible en: <http://pronagro.sag.gob.hn/dmsdocument/3360>

⁹¹ RODRIGUEZ, Sandra y PARRA, Henry. Manejo pot cosecha y evaluación de la calidad para la piña (*ananas comosus*). Que se comercializa en la ciudad de Neiva. Trabajo de grado ingeniero agrícola. Neiva: Universidad surcolombia. Facultad de ingeniería, 1994. 20 p.

⁹² TAIN; Yelene, GARCIA; Annia y PADRON, Jesús. Estudio de la variación del índice de color durante la conservación de la piña variedad cayena lisa a temperatura ambiente. Habana, Cuba: 2011, revista ciencias técnicas agropecuarias, vol 20.

De acuerdo con la figura 13 se estableció para la obtención de residuos un grado de maduración 4 a 5; $\frac{3}{4}$ de maduración a menos de la maduración total, grado de inclinación preferencial de venta en los puntos de adquisición, maduración donde se encuentra una adecuada concentración de azúcares que se desarrollan consistentemente con el paso del tiempo. “ $\frac{3}{4}$ es aquella en la que la coloración amarilla cubre del 51-80% de la superficie del cuerpo de la fruta”⁹³.

Según la norma NTC 729-1 la coloración seleccionada se reconoce porque “en el grado 4, la zona basal presenta mayor cantidad de ojos de coloración amarilla con visos anaranjados y muestra además ojos de color verde con leves tonos amarillos en la zona media y de la corona, en el grado 5 la zona basal y media se aprecia una coloración amarilla con visos anaranjados. En la zona de la corona aumenta la cantidad de ojos color verde amarillento”⁹⁴.

Previamente a la obtención se descartaron los grados 0 a 3 y 6. Los grados de 0 a 3 indican una piña verde o de ligera maduración, cáscara que no es viable debido a su temprana recolección, lo que la hace propensa a presentar problemas de pudrición, oscurecimiento, daño en los frutículos, presencia de mohos, daños fisiológicos y daños mecánicos; igualmente el grado 6, que indica piña totalmente madura, próxima a etapa de senescencia, cáscara que no se escogió para evitar una rápida descomposición.

El estado de madurez de la piña se puede confirmar por medio del contenido mínimo de sólidos solubles totales expresados como grado Brix, como se observa en la tabla 7. Para los grados seleccionados los grados brix se deben encontrar en un intervalo de 13,6 a 15,1⁹⁵

Tabla 7. Contenido mínimo de sólidos solubles expresado como grado Brix (°Brix).

Grado	0	1	2	3	4	5	6
°Brix (Min)	9,3	11,0	12,6	13,2	13,6	14,1	14,5
°Brix (Max)	11,5	12,9	13,5	13,8	14,3	15,1	15,6

Fuente: INCONTEC. Norma técnica colombiana, NTC 729-1: frutas frescas. Piña. Especificaciones, Bogotá, D.C. 1996. P 6.

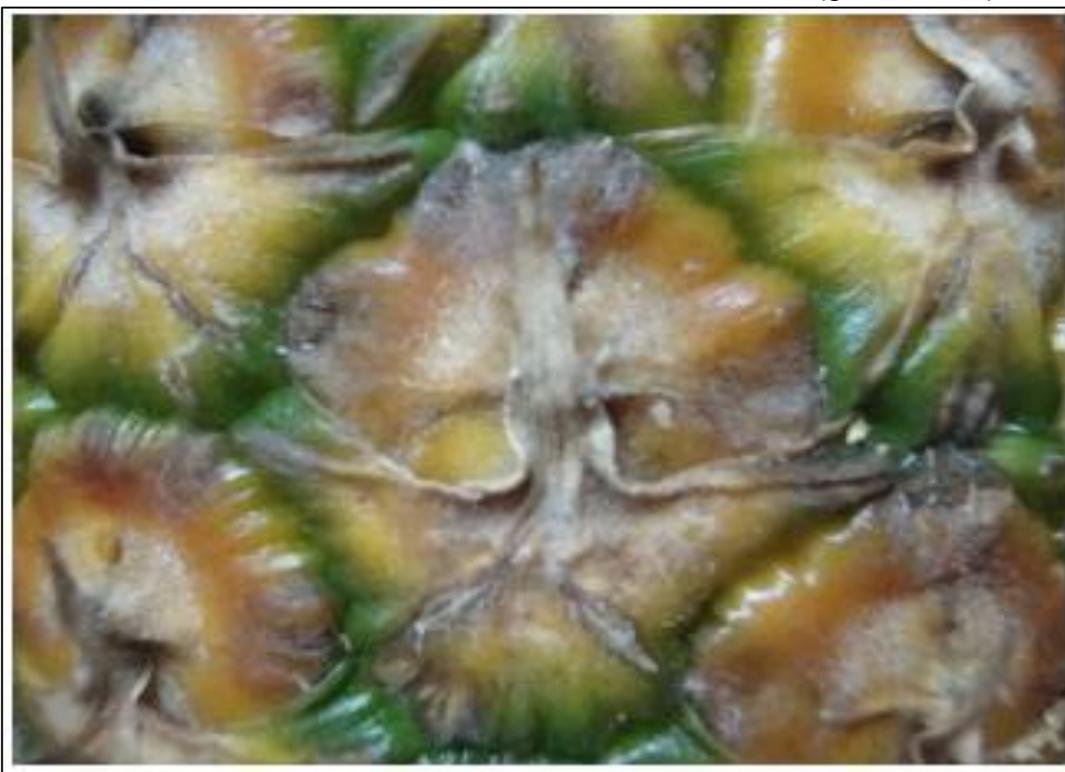
⁹³ SAGARPA ASERCA. Pliego de condiciones para el uso de la marca oficial México calidad suprema en piña. Citado el 24 de mayo de 2017. Disponible en: http://www.mexicocalidadsuprema.org/assets/galeria/PC_029_2005_Pina.pdf

⁹⁴ INCONTEC, OP.Cit., P. 5

⁹⁵ INCONTEC, OP.Cit., P. 6

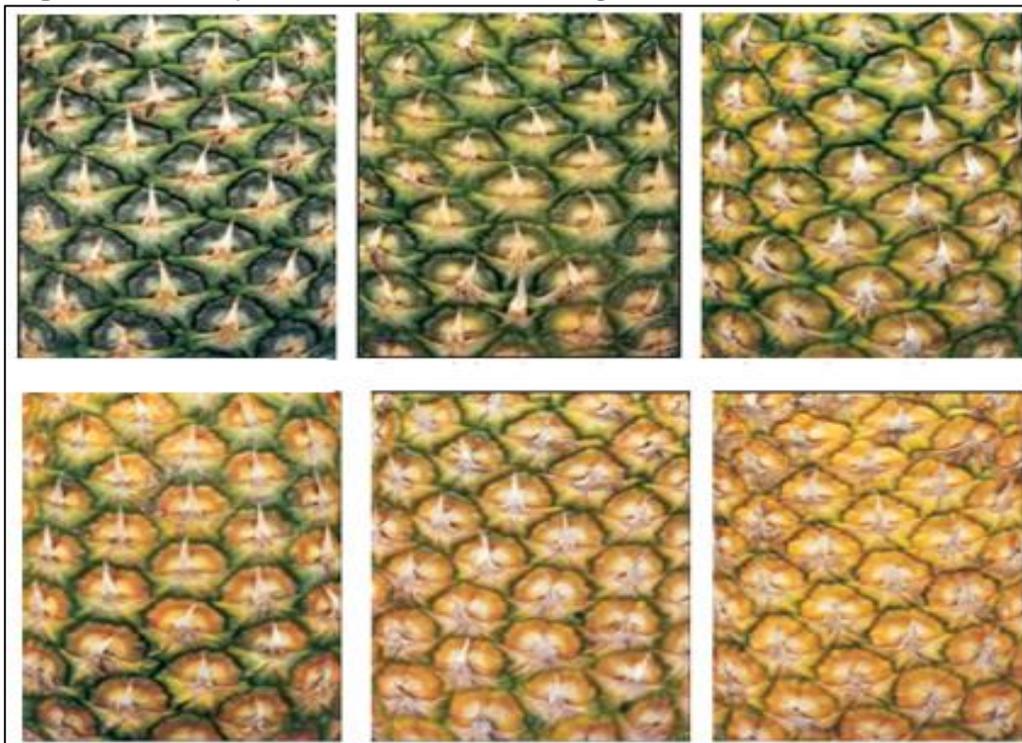
2.1.2 Frutículos. Más conocidos como brácteas o “ojos” de la cáscara de la piña, es importante tener en cuenta este factor para determinar la maduración deseada de esta y así proceder a la adquisición de sus residuos, se estableció que estos se deben encontrar prácticamente aplanados y grandes, como es común observarlos en las piñas maduras. En piñas verdes los frutículos presentan puntas salidas similar a las espigas, mientras que en piñas maduras estas espigas ya tienen la apariencia de pequeñas hojas secas adheridas a la piel de la piña que han perdido firmeza, las cuales se secan perdiendo la coloración verde y tornando a amarillas pálidas, todos los ojos se encuentran amarillos con remanentes de coloración verde alrededor de estos.

Figura 14. Apariencia de los frutículos en la maduración establecida para la obtención de residuos de cáscara de la *Ananas comosus* (grado 4 a 5).



Fuente: MASSEY, Vincent. Piña tropical, Ananas, escala Traslucidez, escala colores. [en línea]. Citado el 24 de mayo de 2017. Disponible en: <http://vmasseyors.blogspot.com.co/2011/12/pina-tropical-ananas-escala.html>

Figura 15. Comparación de frutículos de grado de madurez 1 a 6.



Fuente: BANACOL, Manual de buenas prácticas agrícolas para la producción de piña en costa rica [en línea]. Citado el 24 de mayo de 2017. Disponible en: http://cep.unep.org/repcar/proyectos-demostrativos/costa-rica-1/publicaciones_banacol/Manual%20BPA%20Banacol.pdf

2.2 OBTENCIÓN DE RESIDUOS Y MUESTREO

A continuación, se describe el proceso de obtención y el plan de muestreo para la adquisición de los residuos directamente del punto de venta, muestra seleccionada utilizada en su totalidad para llevar a cabo su completo secado, molienda y tamizado. Para iniciar el análisis de composición química y la respectiva transformación fisicoquímica que comprende las etapas de la producción de xilitol, se realiza una técnica de muestreo por cuarteo.

2.2.1 Proceso de obtención. Los residuos de la piña, exactamente cáscara, se adquirieron en la zona comercial de san Andresito San José de la ciudad de Bogotá D, C., estos se obtuvieron al azar de puestos ambulantes presentes en la vía pública de venta de frutas sin su corteza listos para consumir. Se encargaron a los vendedores de estos tenderetes, para que los residuos de piña fueran reunidos en bolsas aisladas de los residuos de otras frutas, recogidos entre las 9a.m-11:00 a.m., horario de mayor venta de estos productos y rango de tiempo adecuado para que

no tengan una larga exposición a microorganismos y se presente una acelerada degradación; la obtención de los residuos se desarrolla durante cuatro días. Posteriormente se realiza un muestreo selectivo, escogiendo material que cumpla con características bien definidas en cuanto a maduración y excluyendo los residuos inadecuados. Logrando obtener un peso total de 7 kg, cáscara que cumpla con todas las condiciones y parámetros de selección, posteriormente se picó en pequeños pedazos para facilitar su secado.

Imagen 1. Puntos de obtención de residuos de *Ananas comosus*.



Imagen 2. Residuos de cáscara de piña obtenidos.



2.2.2 Muestreo. Para la selección de la muestra se debe tener en cuenta el conocimiento claro de la fuente de obtención, las cáscaras provienen del mercado de alimentos consumidos al por menor, exactamente de alimentos de venta en la vía pública de un producto primario como es la piña.

Se lleva a cabo un muestreo selectivo, se escogen las cáscaras cuyas características corresponden a una piña MD2 madura, de grado 4 o 5 y de brácteas planas, además de ello se verifica que las cáscaras recogidas se encuentren sanas, es decir, no presenten estado de descomposición, daños por insectos, heridas, malos olores, libres de humedad externa anormal, con el fin de prevenir la presencia y crecimiento de microorganismos indeseados, evitando un rápido deterioro microbiológico o una posible fermentación indeseada. Esta inspección se realiza con ayuda de los sentidos (olfato, tacto y vista).

Se prefiere un tamaño de muestra de más de 5 kg, debido a la heterogeneidad del alimento del que proviene y a las pérdidas de masa que se presentan en el proceso de conservación y reducción de tamaño.

En el cuadro 3 se presentan las etapas del muestreo y la preparación de la muestra propuestas por Greenfield y Southgate⁹⁶, que se llevan a cabo para dar inicio al secado.

Cuadro 3. Etapas de muestreo y preparación de muestra.

Etapas	Descripción
1. Muestra primaria	Corresponde a la totalidad de cáscara de piña MD2 recogida al azar del conjunto total de residuos en cada punto de venta.
2. Muestra reducida	La muestra recolectada en cada punto de venta es reducida mediante muestreo selectivo, obteniendo la cáscara que cumple con el grado y características de maduración.

⁹⁶ GREENFIELD Y SOUTHGATE. Datos de composición de alimentos. Obtención, gestión y utilización. 2 ed. Roma: traducción española FAO, 2006. P 81.

Cuadro 3 (continuación).

Etapa	Descripción
3. Muestra compuesta	Se combinan las muestras reducidas de cada punto de venta, formando una mezcla de residuos de cáscara MD2 que cumple en su totalidad con los requisitos de maduración e higiene.
4. Muestra de laboratorio	Se obtiene un total de 7 kg de muestra, que es llevada al laboratorio para iniciar el proceso de secado en mufla y posteriormente realizar el proceso de molienda y tamizado.
5. Muestra analítica	Consiste en la muestra obtenida por técnica de cuarteo, a partir de la muestra de tamaño uniforme previamente seca y molida, siendo un tamaño de muestra de 23g para la caracterización química y 90g para la producción de xilitol en escala laboratorio.

2.2.3 Almacenamiento y conservación de muestra. El secado y la molienda son procesos de acondicionamiento que buscan la protección de la muestra de manera eficiente. Debido a que el análisis químico y la transformación de la muestra no es posible realizarla el mismo día de su obtención, es necesario conservarla adecuadamente para evitar cambios en su composición por acción de enzimas hidrolíticas y microorganismos, estos últimos crecen principalmente por la presencia de agua, razón por la cual es viable la realización de un secado extenso de la muestra.

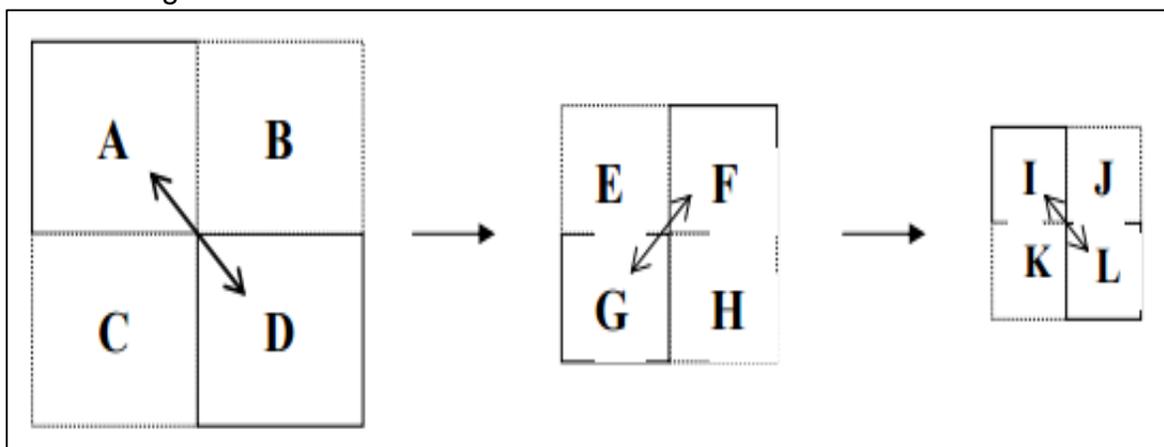
El almacenamiento de la muestra previamente seca, molida y tamizada se realiza por tamaño de partícula en frascos de vidrio, cerrados y esterilizados, que se llevan a refrigeración a una temperatura aproximada de 4°C, ofreciendo una protección adecuada contra la contaminación exterior.

2.3 TÉCNICA DE MUESTREO POR CUARTEO

La muestra analítica, la cual es representativa de la totalidad del conjunto de residuos recogidos, es obtenida mediante muestreo por cuarteo; técnica utilizada para lograr la cantidad necesaria de muestra molida y tamizada, destinada a la caracterización química y al pretratamiento básico.

Según Greenfield y Southgate⁹⁷ los lotes de muestras en piezas pequeñas (harina, arroz, legumbres, frutos pequeños, mezclas de unidades cortadas), como es el caso de los residuos de cáscara que se encuentran en estado harinoso, se reducen mediante cuarteo, cuyo principio es que la cuarta parte es representativa del todo para fines de análisis.

Figura 16. Procedimiento para la elaboración de la muestra analítica por medio de cuarteo diagonal.



Fuente: RIVERA, Luisa y GARCIA, Silvana. Actualización del manual del laboratorio de análisis de alimentos del programa de tecnología química de la universidad tecnológica de Pereira. Trabajo de grado tecnóloga química. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de tecnología, 2010. 29 p.

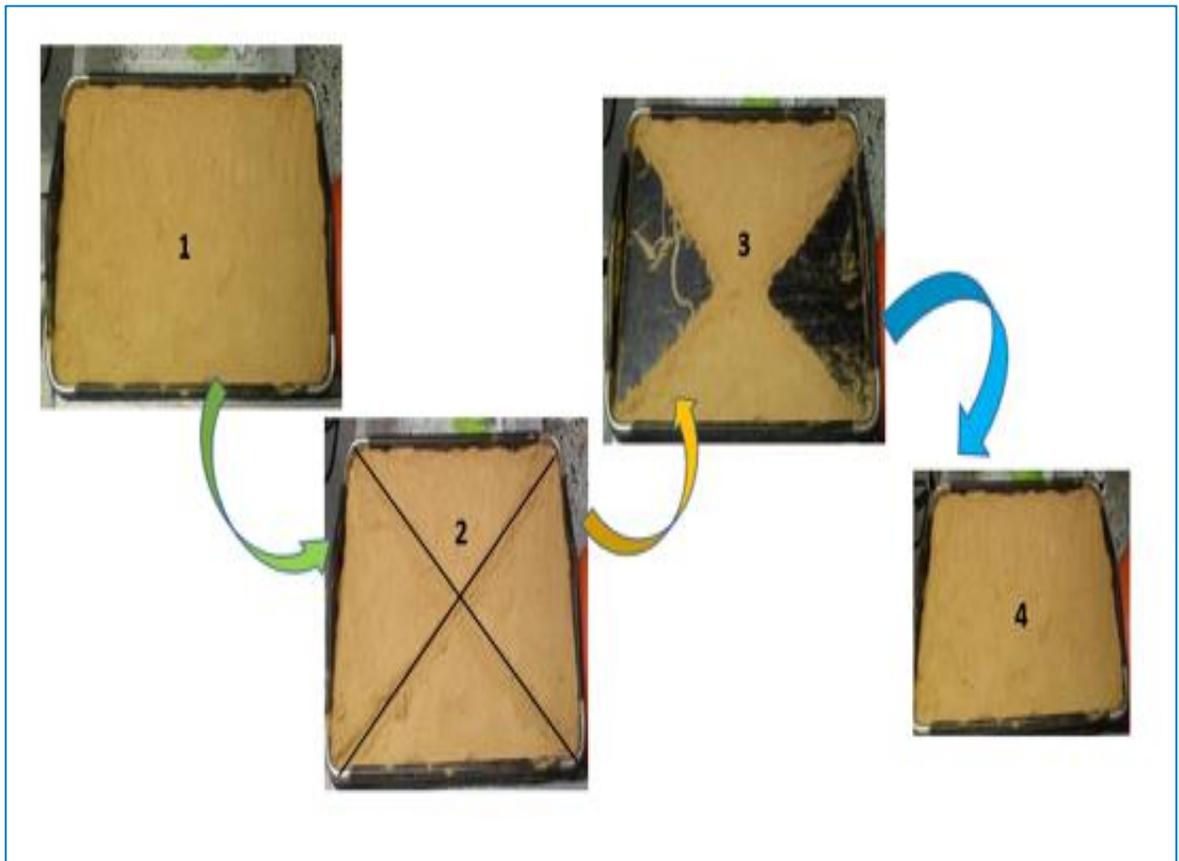
Con la totalidad de la muestra de cáscara molida y tamizada “se forma un montón uniforme sobre una superficie limpia e inerte y se revuelve varias veces con ayuda de una espátula, después de ello, se aplanan el montón en forma de figura simétrica y se divide en cuatro segmentos iguales; tomando dos segmentos opuestos y retirando los otros dos. Los segmentos seleccionados (A y D) se mezclan nuevamente y se reducen de la misma manera; proceso repetitivo hasta obtener la

⁹⁷ Ibid., P. 237

cantidad de muestra deseada”⁹⁸ 23g y 90g para la caracterización química y obtención de xilitol respectivamente.

A continuación, en la imagen 3 se observa el método de cuarteos diagonales para la elaboración de la muestra analítica. Esta técnica necesita la realización de un secado completo de los residuos de cáscara previo a su realización para tener un mínimo contenido de humedad y lograr una reducción de muestra eficiente.

Imagen 3. Proceso de reducción de muestra de cáscara de piña acondicionada por técnica de cuarteo.

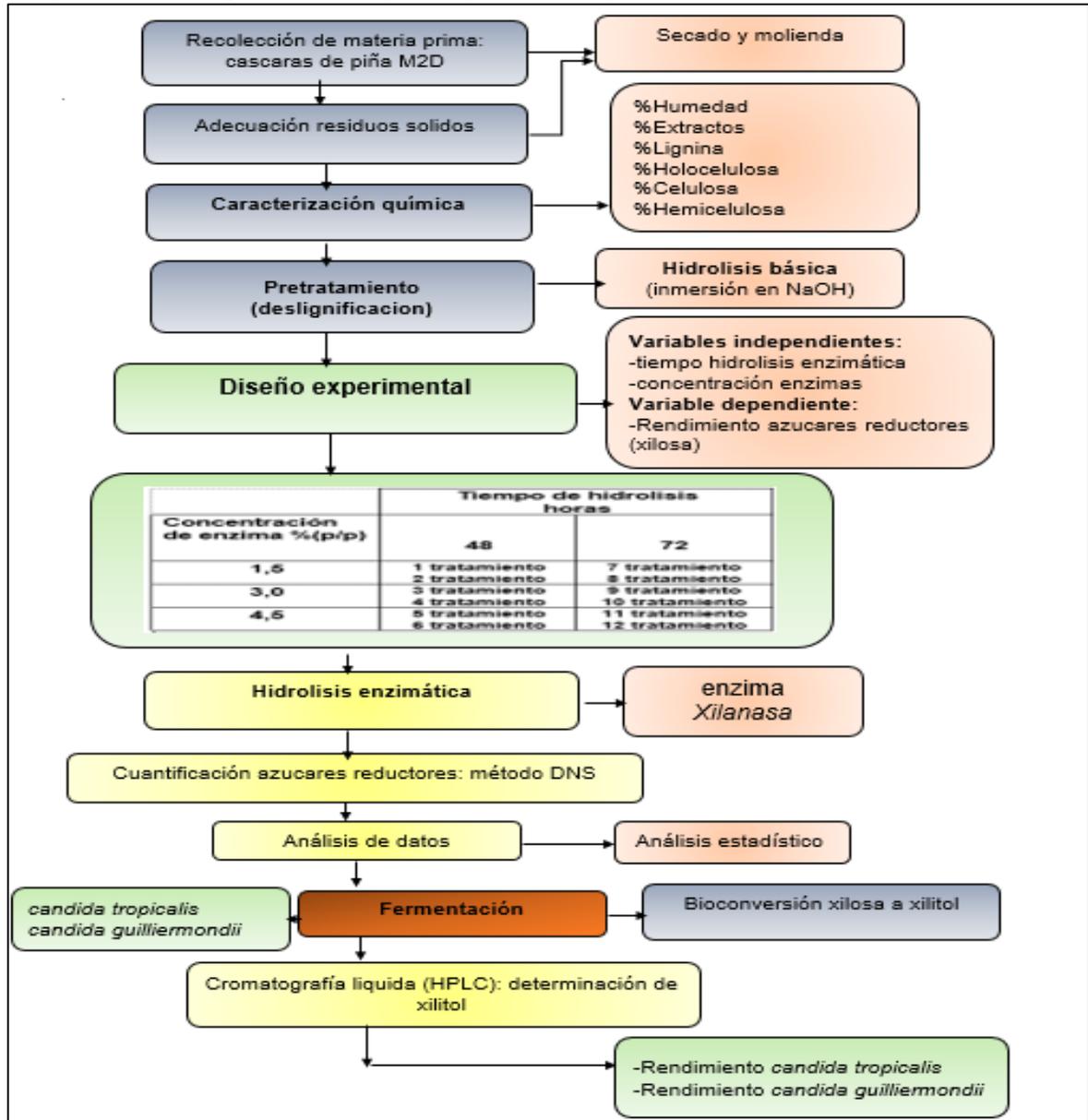


⁹⁸ Ibid., P. 237-238

3. METODOLOGÍA

La metodología experimental consta básicamente de 4 procesos, una adecuación de los residuos de la piña, caracterización de los mismos, hidrólisis de xilanos y bioconversión de xilosa a xilitol. A continuación, en el Esquema 1, se muestra el diagrama de proceso experimental para la producción biotecnológica de xilitol a partir de residuos de piña.

Esquema 1. Diagrama de flujo del proceso experimental.



3.1 PRETRATAMIENTO FÍSICO

Previamente al proceso de caracterización de los residuos de la piña, es necesario realizar un pretratamiento físico, que consta de un secado y una molienda, con los cuales se obtiene una muestra con facilidad de manejo para los procesos posteriores, ya que la fibra tendrá una humedad relativamente baja, logrando que no afecte los procesos químicos; igualmente se obtendrá un tamaño de muestra menor, facilitando la acción de sustancias químicas como las utilizadas en la caracterización y deslignificación; esto también beneficiara a la enzima, la cual, tendrá mejor área de contacto y acción en el proceso de hidrólisis enzimática, etapa de mayor importancia.

3.1.1 Secado. Antes de iniciar el secado, es necesario realizar un lavado de los residuos adquiridos en cada punto para remover posibles contaminantes, luego los 7 kg de cáscara de piña obtenidos se pican en pedazos parcialmente pequeños y se llevan a secado directo por medio de una mufla K114, marca Thermo Scientific y referencia 50047063, equipo en el cual se facilitará el control preciso de la temperatura y el espacio de trabajo, debido a su amplitud. El secado se realiza a una temperatura de 80 °C, temperatura recomendada para secar tejido vegetal, aquella que asegura la eliminación de humedad; cuidando de no provocar descomposición térmica, a temperaturas menores puede quedar humedad y a temperaturas más elevadas se puede ocasionar una posible termólisis, reacción que provoca descomposición indeseable en el material por excesos de calor⁹⁹. El secado se realiza por una duración de 10 horas por 3,5kg de residuos; cuyo fin es remover la mayor humedad posible de la fibra y así manejar pesos prácticamente secos, logrando una mayor exactitud y reacción en cada proceso.

3.1.2 Molienda y tamizado. Posteriormente al secado, se somete la fibra resultante a un proceso de molienda, haciendo uso de un molino de martillos (Siemens, motor 1LF3, 2 HP, 1710 RPM), con el objetivo de obtener un tamaño de partícula menor de los residuos y favorecer el contacto entre el sustrato y las sustancias químicas y biológicas que se utilizan. Posteriormente, se procede a conocer el tamaño de partícula obtenido de la fibra, pasando la muestra por un equipo de tamizado Pinzuar.LTDA, modelo P534, serie 15.1, voltaje de 110V. El tamizado consiste en una serie de mallas de tamices N° 18, 20, 35, 40, 45, 50, 60, 80 y 100; formadas por orden de tamaño y adición de una malla final en los fondos hasta conseguir en cada malla una muestra homogénea.

⁹⁹ RUIZ, N., *et al.* Laboratorio de calidad de maíz y análisis de tejido vegetal. México, D.F: CIMMYT, 2012. P 4.

Se utiliza 9 mallas de tamices con el fin de conseguir un tamaño de fibra adecuado y uniforme, se toma el referente de un tamaño de partícula <0,6mm ya que diversas investigaciones realizadas, aseguran que “existen diferencias significativas al utilizar tamaños de partículas entre 0,6mm y 1,18 mm, obteniéndose mayor liberación de azúcares durante la hidrólisis al utilizar 0,6mm como tamaño de partícula, esto se debe a que el proceso de molienda y pretratamiento del material vegetal permite incrementar la accesibilidad al sustrato, por el aumento del área de superficie disponible para la enzima; por lo tanto al disminuir el tamaño de las partículas aumenta el área de superficie específica y aumenta la liberación de azúcares durante la hidrólisis enzimática”¹⁰⁰.

3.2 CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS

Se toma fibra de un tamaño aproximado de 0,3-0,425 mm (obtenido en tamiz 40/45) y se realiza el muestreo por cuarteo descrito anteriormente, técnica repetitiva hasta obtener 23 gramos que es la cantidad necesaria para la realización de la caracterización química. El análisis comienza con la determinación de humedad, dado que es importante conocer el contenido en la fibra para realizar las pruebas posteriores. Después de ello, se somete la fibra a extracción de compuestos lipofílicos e hidrosolubles, ya que para la determinación del contenido de biopolímeros es necesario que la fibra esté libre de todo tipo de extracto. Se continúa con el análisis de lignina soluble e insoluble en ácido, y por último el análisis de holocelulosa y celulosa. Este análisis cuantitativo se realiza con el fin de emitir criterios de selección del pretratamiento y tener un prospecto del rendimiento de xilosa a obtener.

La caracterización química de la materia prima, para obtener el porcentaje de humedad, extraíbles, lignina, holocelulosa y celulosa se realiza utilizando la metodología de normas, NMX-F-083, TAPPI 204 os-76, TAPPI 222 om-02, ASTM D1104 Y ASTM D1103-60 respectivamente.

3.2.1 Determinación de humedad. Este análisis se realiza según la metodología de la norma NMX-F-083 ¹⁰¹, a continuación, se describen los instrumentos necesarios y el procedimiento a realizar. El porcentaje de humedad se calcula haciendo uso de la ecuación 1.

Muestra: Se tomaron 12,4 g de piña seca, previamente molida y tamizada por medio de un tamiz No. 40 y 45.

Previamente se lleva el crisol vacío a la mufla a 105 °C ± 0.5 por una hora, este se deja enfriar en desecador por 20 minutos. Se coloca la muestra de piña en el crisol,

¹⁰⁰ NIÑO, L. ACOSTA, A. GELVES, R. Op cit., P 317-318.

¹⁰¹ NMX-F-083. Normas Mexicanas. Alimentos. Determinación de humedad en productos alimenticios, 1986.

llevándose a la mufla a 105 °C ± 0.5 durante 2 horas, se traslada hacia un desecador por 20 minutos y se pesa el conjunto (muestra y crisol). Se repite el procedimiento anterior para el conjunto del crisol con la muestra introduciéndolo a la mufla con calentamientos de 2 horas hasta obtener peso constante.

Ecuación 1. Porcentaje de humedad.

$$\%Humedad = \frac{\text{peso del agua contenida}}{\text{peso de la muestra}} * 100$$

3.2.2 Determinación de extraíbles. La determinación de extraíbles se realiza según la metodología de la norma TAPPI 204 os-76 descrita por Fonseca¹⁰². El porcentaje de extraíbles se calcula haciendo uso de la ecuación 2.

Muestra: Se tomaron 7,5 g de piña seca, previamente molida y tamizada por medio de un tamiz No. 40 y 45, con humedad conocida.

Se deposita la muestra en un dedal de extracción, el cual se coloca en un equipo de extracción tipo Soxhlet con una mezcla de 200 mL de hexano y 150 mL de etanol, el cual funciona como solvente, se ajusta la llama de tal forma que recircule el solvente 3 veces por hora, es decir, cada 20 minutos. Después de aproximadamente 4 horas, el solvente se evapora en un 95% y se transfiere la muestra sin extraíbles a un crisol de peso conocido. Se seca en la mufla a 105 °C ± 3°C durante 4 horas. Se saca la muestra y se transfiere a un desecador por 20 minutos, se pesa y se continúa secando hasta peso constante.

Ecuación 2. Porcentaje de extraíbles.

$$\%Extraíbles = \frac{\text{peso seco de la muestra} - \text{peso seco de la muestra sin extracto}}{\text{peso seco de la muestra de piña}} * 100$$

3.2.3 Determinación de lignina insoluble en ácido y lignina soluble en ácido.

La determinación de lignina insoluble en ácido se realiza siguiendo la metodología de la norma TAPPI¹⁰³ T 222 om-02. El contenido total de lignina es la suma de los contenidos ácido-solubles y ácido-no solubles.

¹⁰² FONSECA MALDONADO, Mario Roberto. Determinación de la composición química de la madera de pino candelillo (pinus maximinoi h. e. moore) procedente de la finca río frío, tactic, alta verapaz. Trabajo de grado ingeniero químico. Guatemala: Universidad de san Carlos de Guatemala, Facultad de ingeniería, 2006. 70 P.

¹⁰³ TAPPI. Acid-insoluble lignin in wood and pulp. T 222 om-02. 2006

3.2.3.1 Lignina insoluble en ácido. Mas conocida como lignina klason, la cual se calcula empleando la ecuación 3.

Muestra: Se tomaron 500 mg de piña seca, previamente molida y tamizada por medio de un tamiz No. 40 y 45, libre de extraíbles y con humedad conocida.

La muestra de fibra se somete a una hidrólisis ácida con 5 mL de H₂SO₄ al 72 % a 30°C durante 1 hora. Después se diluye con agua destilada hasta obtener una concentración de H₂SO₄ al 4%, introduciéndose a baño de maría durante 1 hora a 110°C, se deja enfriar y reposar. Se filtra la suspensión en papel filtro previamente tarado contenido en un filtro de kitasato haciendo uso de bomba de vacío. El hidrolizado se guarda para posterior análisis de lignina soluble en ácido. Se lava el filtro con agua destilada hasta pH neutro y seca durante 4 horas a 100 °C, el peso final es la lignina insoluble en ácido.

Ecuación 3. Porcentaje de lignina insoluble en ácido.

$$\text{Lignina insoluble en ácido (\%)} = \frac{\text{peso de lignina}}{\text{peso seco de la muestra}} \times 100 \%$$

3.2.3.2 Lignina soluble en ácido. Este análisis se realiza siguiendo la metodología propuesta por la NREL (Laboratorio Nacional de Energía Renovable) y empleando la ecuación 4, basado en la norma TAPPI UM 250, adaptada por Triana.¹⁰⁴

Muestra: Hidrolizado obtenido en análisis de lignina insoluble en ácido.

Haciendo uso de un espectrofotómetro se mide la absorbancia a 205 nm del hidrolizado obtenido durante el análisis de la lignina Klason. Para el blanco se preparó una solución de 4 % (m/m) de H₂SO₄. Se determina la media de varias mediciones de absorbancia.

Ecuación 4. Porcentaje de lignina soluble en ácido.

$$\% \text{ Lignina soluble en ácido} = \frac{(A \times V)}{\xi \times m}$$

¹⁰⁴ Chemical Analysis and Testing Laboratory Analytical Procedures. National Renewable Resource Laboratory citado por TRIANA CARANTON, Cristian Fernando. Producción de etanol a partir de residuos provenientes del cultivo de café. Trabajo de posgrado, maestría ingeniero químico. Manizales: Universidad nacional de Colombia, 2010, 25 P.

Donde:

A = Absorbancia a 205 nm (AU)

V = Volumen final del filtrado (hidrolizado) (mL)

ξ = Coeficiente de extinción (1100 mL*AU/g)

m = Peso de la fibra seca inicial (g)

La anterior ecuación obedece a la ley de Beer-Lambert, expresión que relaciona la absorción de luz con las propiedades de la muestra (hidrolizado), la absorbancia de la muestra a 205 nm depende de la cantidad de especie absorbente con la que se encuentra la luz al pasar por la muestra, por lo tanto es necesario relacionar el volumen total de filtrado y el peso seco de la fibra analizada; que a su vez se relacionan con el coeficiente másico de absorción, más conocido como coeficiente de extinción, cuyo parámetro define la intensidad en que la muestra absorbe la luz a cierta longitud de onda por unidad de masa. La lignina presenta un coeficiente de extinción molar de 1100 mL*AU/g.

3.2.4 Determinación de holocelulosa. La determinación de holocelulosa se realiza siguiendo la metodología de la norma ASTM D1104, conocida como método de clorinación, descrito por Prinsen¹⁰⁵. La determinación del porcentaje de holocelulosa se lleva a cabo haciendo uso de la ecuación 5.

Muestra: Se usan 2.5 g de piña seca, previamente molida y tamizada por medio de un tamiz No. 40 y 45 libre de extractivos.

A la muestra se agregan 80 mL de agua destilada caliente, 0.5mL de ácido acético y 1 g de clorito de sodio. La mezcla se calienta en baño de maría a 70°C durante 1 hora en constante agitación, cumplido este tiempo se agrega nuevamente 0.5mL de ácido acético y 1 g de clorito de sodio y así sucesivamente cada hora. Hasta completar un total de 6 veces adicionados los dos reactivos incluyendo la adición inicial. La suspensión se filtra y lava con acetona y agua para posteriormente secarla, el peso final es la holocelulosa.

Ecuación 5. Porcentaje de holocelulosa.

$$\%Holocelulosa = \frac{\text{peso de holocelulosa}}{\text{peso seco de la muestra sin extractivos}} * 100$$

3.2.5 Determinación de celulosa y hemicelulosa. La determinación de celulosa se lleva a cabo siguiendo la metodología de la norma ASTM D1103-60 planteada

¹⁰⁵ PRINSEN, Pepijn. Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas. Trabajo fin de master. Sevilla: Instituto de recursos naturales y agrobiología de Sevilla (irnas), 2010, 46 P.

por Fonseca¹⁰⁶. Para la determinación del porcentaje de celulosa se emplea la ecuación 6.

Muestra: 1 g de holocelulosa obtenida en análisis de cuantificación de holocelulosa.

La muestra se transfiere a un beacker de 100 mL, agregándose 10 mL de NaOH al 17.5%, se agita y deja reposar por 2 min. Cumplidos los 2 minutos, se agregan nuevamente 5 ml de NaOH al 17.5%, se agita y deja reposar 5 minutos. Esta adición se realiza hasta completar 25 mL de NaOH en intervalos de 5 minutos, incluyendo la adición inicial. Después de ello, la mezcla se introduce en baño de maría a 20°C durante 30 minutos para un total de 45 minutos. Pasada la media hora se agrega 30 ml de agua destilada, se agita y deja reposar por 1 hora antes de realizar el filtrado. Se filtra al vacío con papel filtro previamente tarado, lavando con agua destilada y NaOH al 17.5 %, continuando con la aplicación de vacío. A la celulosa recogida se le agregan 15 mL de ácido acético al 10% y después de 3 minutos se continúa aplicando vacío para posteriormente retirar el ácido acético remanente y se efectúan lavados con agua destilada hasta que la concentración de ácido sea la mínima posible. La muestra de celulosa contenida en el papel filtro se lleva a una mufla a una temperatura de 80°C ± 5°C por 4 horas. Transferida a un desecador por 20 minutos y pesada. El proceso de secado se repite hasta peso constante.

Ecuación 6. Porcentaje de celulosa.

$$\%Celulosa = \frac{\text{peso crsiol con celulosa} - \text{peso crisol}}{\text{peso seco de la muestra de holocelulosa}} * 100$$

La cantidad de hemicelulosa es determina a través de la diferencia entre la cantidad inicial de holocelulosa y la cantidad de celulosa, empleando la ecuación 7.

Ecuación 7. Porcentaje de hemicelulosa.

$$\%Hemicelulosa = \frac{\text{peso de la holocelulosa} - \text{peso de la celulosa}}{\text{peso de la holocelulosa}} * 100$$

3.3 PRETRATAMIENTO QUÍMICO

En cuanto a la lignina, el pretratamiento alcalino puede causar su solubilización, redistribución y condensación. Estos efectos pueden disminuir o contrarrestar los efectos positivos de la remoción de lignina e hinchamiento de la celulosa y hemicelulosa, Otro aspecto importante del pretratamiento alcalino es el cambio que

¹⁰⁶ FONSECA, op.cit., P.77-79.

causa en la estructura de la hemicelulosa y celulosa especialmente a una forma que es más densa y termodinàmicamente más estable que la fibra sin tratamiento¹⁰⁷.

Existen otros pretratamientos, cuyo fin también es la deslignificación de la fibra, entre los cuales se encuentran la autohidrólisis, tratamiento con agua caliente, que utiliza agua comprimida, la explosión de vapor, proceso termomecanoquímico donde la descomposición de los componentes estructurales se ve favorecida por el calor en forma de vapor, el uso de líquidos iónicos y líquidos supercríticos que consisten en sales orgánicas con puntos de fusión por debajo de 100°C y agua supercrítica o dióxido de carbono supercrítico respectivamente¹⁰⁸. Pretratamientos cuya principal ventaja es la selectividad hacia hemicelulosa, pero que requieren de equipos, sustancias y condiciones de difícil manejo, como es principalmente altas presiones, razón por la cual la realización de un pretratamiento alcalino presenta viabilidad y acceso para su desarrollo en las instalaciones de experimentación, al manejar equipos y sustancias al alcance.

Se realiza hidrólisis alcalina o básica con NaOH como pretratamiento químico como se muestra en el esquema 2; basado en estudios realizados en diferentes materiales lignocelulósicos como eucalipto, madera pino, maíz, tallos de algodón, tallos de yuca, banano, materiales leñosos y tallos de girasol; teniendo en cuenta principalmente los estudios llamados “Obtención de etanol mediante hidrólisis alcalina, enzimática y fermentación a partir del excedente orgánico del banano variedad musa paradisiaca” y “Evaluación de Tres Métodos de Pretratamiento Químico sobre la Deslignificación de Tallos de Yuca” realizados por Fausto Espinosa y Juan Reales respectivamente; reportan que las mejores condiciones para la obtención de remoción de lignina y accesibilidad a la celulosa y hemicelulosa son 60°C, 2% de NaOH, durante 3h. Con relación 10g de sustrato con un tamaño de partícula <0,6mm en 100mL de solución.

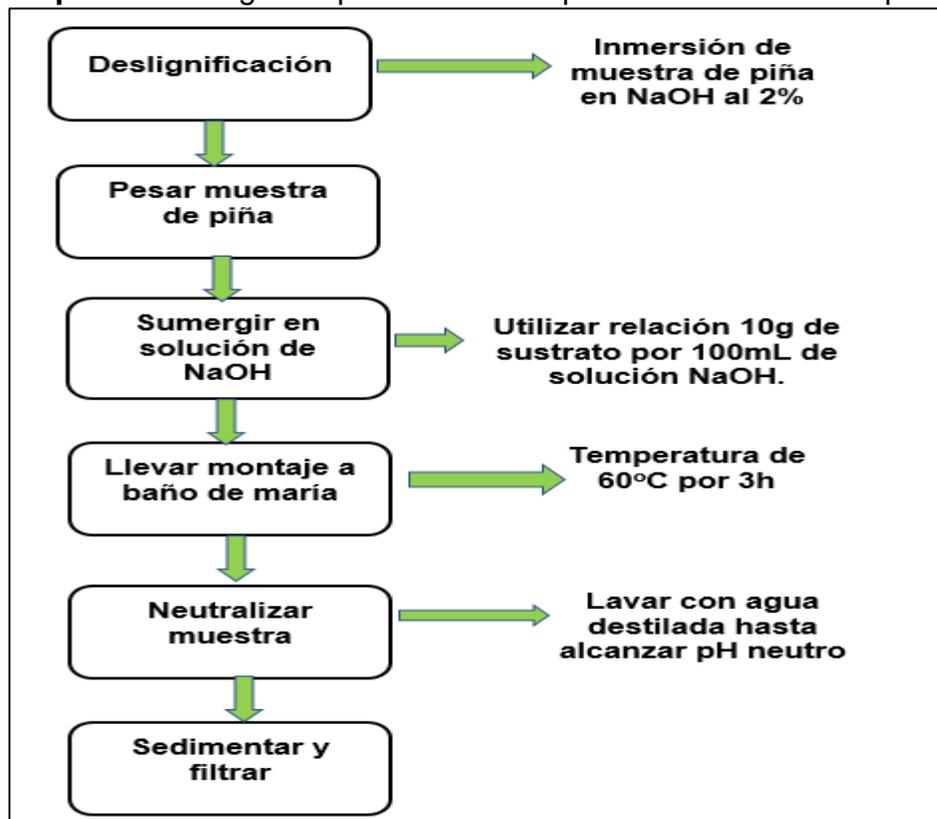
Se realizan 6 montajes de esta inmersión de fibra (utilizándose un tamaño de partícula de 0,18 mm, malla tamiz 80) en solución alcalina para un total de 90 gramos de muestra obtenida por muestreo de cuarteo sometida a pretratamiento químico, es decir; en cada montaje se sumergen 15 g de fibra en 150 mL de solución de NaOH. Se usa un total de 90g de muestra de piña debido a que no se conocen las pérdidas de fibra que con lleva el proceso y es necesario garantizar el valor de masa para realizar el diseño experimental del proceso de hidrólisis enzimática.

¹⁰⁷ CARDONA, Carlos y ORREGO, Carlos. Avances investigativos en la producción de biocombustibles. Manizales, caldas: 2009. P 178.

¹⁰⁸ DA SILVA, Silvio y KUMAR CHANDEL, Anuj. D- Xylitol Fermentative Production, Application and Commercialization: Market Trends. São Paulo, Brazil: springer, 2012, 13-20 P.

Teniendo en cuenta las condiciones anteriores mencionadas en las que los residuos deben ser sumergidos en solución de NaOH, se lleva a cabo el montaje con una agitación constante, usando como fuente de potencia una bomba de 5 W para los 6 recipientes que se unen en forma de anillo, los cuales se colocan en baño de maría. Posteriormente se neutraliza la muestra a través de lavados con agua destilada cuidando que no se maltrate la fibra, para luego sedimentar, eliminando el exceso de agua y realizando una filtración de la fibra húmeda en equipo de bomba de vacío; se realizan varios lavados hasta lograr pH neutro asegurando que no queden residuos del hidróxido, el cual, pueda afectar e inhibir la enzima utilizada en el proceso de hidrólisis.

Esquema 2. Diagrama pretratamiento químico de muestra de piña.



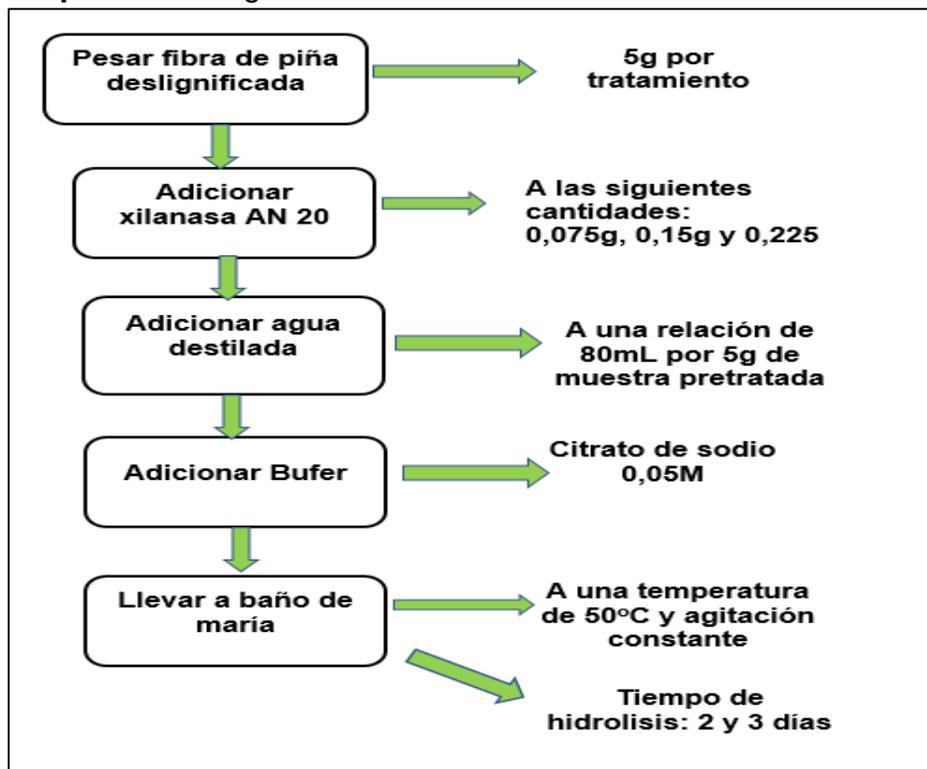
3.4 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La piña previamente pretratada tanto física como químicamente se somete a hidrólisis enzimática, proceso descrito en el esquema 3. Se toman 5g del sustrato deslignificado en la hidrólisis alcalina. En la hoja técnica de la enzima Xilanasa (Anexo G) se establece una temperatura óptima de operación entre 30 a 55°C, por lo cual se selecciona una temperatura de 50°C y un pH entre 4-7, por lo que se trabaja a 7. Esta recomienda una concentración de 15 a 25g / 50 – 100 kilos de

harina seca, como se trabajará una cantidad de solido pequeña comparado con la cantidad aconsejada y esta presenta un estado sólido con mayor dureza (piña) comparado con la harina estándar y tomando como referencia el estudio realizado por Fausto Espinosa en el banano *Musa paradisiaca* con las enzimas *Celulasas*; se realiza un diseño experimental, evaluándose diferentes concentraciones de 1,5%p/p de sustrato, 3%p/p de sustrato y 4,5%p/p de sustrato y tiempos de hidrólisis de 48 y 72 horas. Se controla el pH agregando 5mL de una solución buffer citrato de sodio 0,05M con un pH=7¹⁰⁹. Utilizando una relación de 5 gramos de fibra deslignificada por 80 mL de agua destilada inicialmente, verificando que el volumen de agua es suficiente, debido a la disipación y volatilización de esta con el paso del tiempo.

Los recipientes son colocados en baño de María, cada uno de ellos con agitación constante proporcionada por bombas de 5W, para garantizar una acción uniforme de la enzima en todos los sitios disponibles de la fibra, y así romper los enlaces de la fracción hemicelulosa y lograr una mayor eficiencia en la obtención de xilosa, azúcar de interés.

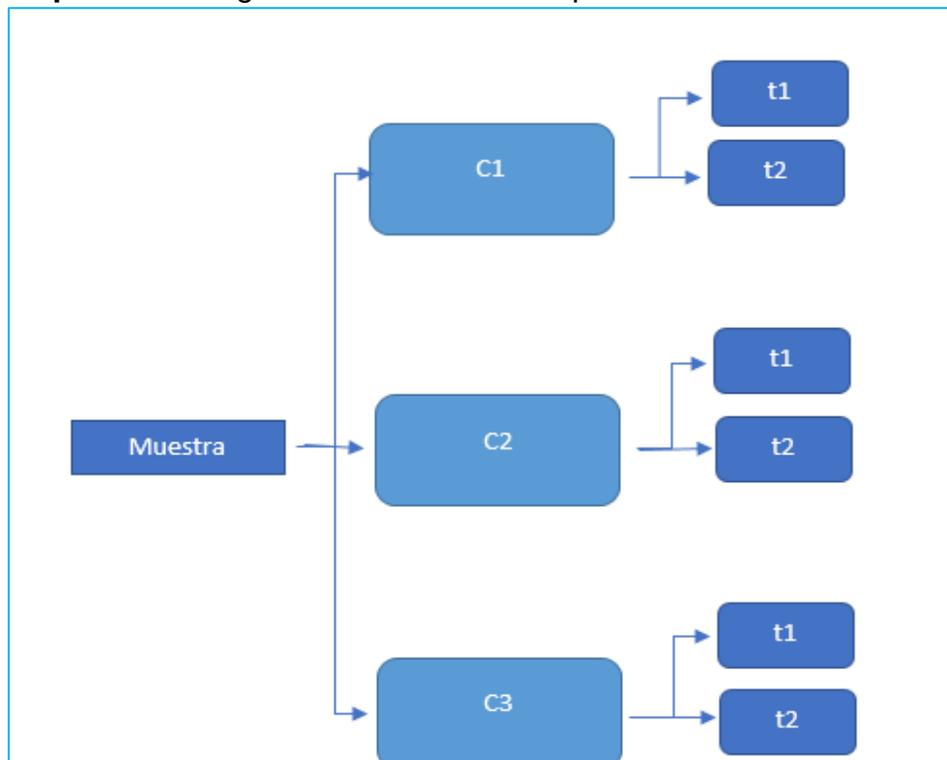
Esquema 3. Diagrama hidrólisis enzimática



¹⁰⁹ MONTAÑO, H. Producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico de Moringa Oleífera. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Departamento Ingeniería Mecánica y Mecatrónica. Bogotá, D.C. Colombia. 2014. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/45408/1/80765033.2014.pdf>

3.4.1 Diseño experimental para la hidrólisis enzimática. Se emplea un diseño experimental completamente aleatorizado, con un diseño factorial de 2 factores (3 niveles de concentración y 2 niveles de tiempo de hidrólisis) como se puede observar en el esquema 4, para evaluar el comportamiento de 6 muestras, cada una con su respectiva réplica para un total de 12 tratamientos, con el fin de obtener las condiciones óptimas y estimar el efecto de la combinación de estas en el proceso de hidrólisis enzimática de la fibra de piña, basando el resultado en favorecer la mayor cantidad de azúcares reductores medidos, especialmente xilosa. Para ello, se plantea la variación de la concentración de xilanasa y el tiempo de hidrólisis a condiciones de temperatura y pH de 50°C y 7, respectivamente. Cada muestra de fibra hidrolizada se somete a una valoración por el método DNS.

Esquema 4. Diagrama básico diseño experimental.



Donde:

C1 concentración de la enzima Xilanasa 1,5%p/p

C2 concentración de la enzima Xilanasa 3,0%p/p

C3 concentración de la enzima Xilanasa 4,5%p/p

t1 tiempo de hidrólisis enzimática 48h

t2 tiempo de hidrólisis enzimática 72h

3.4.1.1 Hipótesis. Se establece una hipótesis alterna y una hipótesis nula, hipótesis globales del análisis del diseño experimental.

- **Hipótesis general:** La concentración de azúcares reductores, especialmente xilosa, en la hidrólisis enzimática de los residuos de cáscara de piña se ve afectada por la concentración de la enzima, la duración de la hidrólisis y la interacción de ambas variables.
- **Hipótesis nula:** La concentración de azúcares reductores, especialmente xilosa, en la hidrólisis enzimática de los residuos de cáscara de piña no se ve afectada por la concentración de la enzima, la duración de la hidrólisis y la interacción de ambas variables.

3.4.1.2 Hipótesis estadísticas. Hipótesis relacionadas con el efecto de las variables independientes y su interacción.

A)

Ho: $\alpha=0$

Ho: No hay efecto del cambio de concentración de la enzima Xilanasas en la concentración de azúcares reductores (xilosa).

Hi: $\alpha \neq 0$

Hi: Hay efecto del cambio de concentración de la enzima Xilanasas en la concentración de azúcares reductores (xilosa).

B)

Ho: $\beta=0$

Ho: No hay efecto del cambio de tiempo de hidrólisis enzimática en la concentración de azúcares reductores (xilosa).

Hi: $\beta \neq 0$

Hi: Hay efecto del cambio de tiempo de hidrólisis enzimática en la concentración de azúcares reductores (xilosa).

C)

Ho: $\alpha*\beta=0$

Ho: No hay efecto de la interacción concentración de Xilanasa y tiempo de hidrólisis enzimática en la concentración de azúcares reductores (xilosa).

Hi: $\alpha\beta \neq 0$

Hi: Hay efecto de la interacción concentración de Xilanasa y tiempo de hidrólisis enzimática en la concentración de azúcares reductores (xilosa).

3.4.1.3 Variables. Son aquellas variables que tienen un efecto directo e indirecto en el análisis de diseño experimental.

➤ **Variables independientes:**

- Concentración enzima Xilanasa (FACTOR A)

- Tiempo de hidrólisis enzimática. (FACTOR B)

➤ **Variable dependiente** (Variable de respuesta):

-Concentración de azúcares reductores (xilosa).

➤ **Variables de ruido:**

- Origen vegetal de los residuos sólidos orgánicos de cáscara de piña.

- Exposición a microorganismos degradadores en el momento de la obtención de residuos.

- Proceso de deslignificación de la fibra de la piña.

- Error humano y del equipo en la toma de absorbancias (espectrofotómetro).

➤ **Variables controlables:**

- Temperatura de hidrólisis: 50°C

-pH:7.

-agitación constante.

3.4.1.4 Selección diseño experimental. Se realiza un diseño factorial de dos factores, el número de tratamientos a realizar se determina con la ecuación 8.

Ecuación 8. Numero de tratamientos diseño experimental.

$$NT = R * a * b$$

$$NT = 2 * 3 * 2 = 12 \text{ tratamientos}$$

Dónde: NT es el número de tratamientos, R el número de réplicas, a es el número de niveles de factor A y b el número de niveles de factor B.

Factor A: Concentración de enzima Xilanasa -----> niveles: 1.5, 3, 4.5 % p/p

Factor B: Tiempo de hidrólisis -----> 48, 72 horas.

3.4.1.5 Método e instrumento de medición de variable respuesta. La concentración de azúcares reductores se observará mediante el método DNS que se describe más adelante, consiste básicamente en el uso del reactivo preparado DNS, su reacción en presencia de azúcares reductores y luego la lectura de absorbancias haciendo uso de celdas y equipo de espectrofotometría, cuyo principal objetivo del método es analizar en la ecuación linealizada de xilosa previamente elaborada la mejor concentración de azúcares reductores obtenidos.

3.4.1.6 Análisis estadístico de resultados. Se realizará un análisis de varianza (ANOVA) desarrollado por Ronald Aylmer Fisher¹¹⁰, el cual permite evaluar la importancia de la concentración de la enzima y el tiempo de hidrólisis al comparar las medias de la concentración de azúcares reductores en los diferentes niveles de los factores.

3.5 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Para la determinación de azúcares reductores se lleva a cabo el método DNS. A continuación, según la técnica desarrollada por Miller¹¹¹ se muestra la preparación del reactivo y la metodología a realizar para el análisis cuantitativo en cada tratamiento de hidrólisis previamente realizado.

3.5.1 Preparación del reactivo ácido 3,5 dinitrosalicílico. El reactivo es preparado en caliente, pesando 0,5g de ácido 3,5 dinitrosalicílico, 15g de sal Rochelle (Tartrato de Na-K) y 0,8g de NaOH. Se disuelve el NaOH en 40mL de agua destilada, luego en agitación es agregado lentamente el tartrato de Na-K y se añade lentamente el ácido 3,5 dinitrosalicílico. El recipiente se pone en baño de maría a una temperatura de 80°C con agitación constante por aproximadamente una hora,

¹¹⁰ DELGADO, Rosario. Probabilidad y estadística para ciencias e ingenierías. ANOVA y diseño de experimentos. Barcelona: Delta publicaciones, 2008. P. 243.

¹¹¹ MILLER, OP. Cit., P. 426-428.

de manera que pasado este tiempo no se observen partículas sólidas de las sustancias utilizadas; se enfría el reactivo y se completa con agua destilada a un volumen de 50 mL, se filtra y almacena inmediatamente en frasco de ámbar debido a que este es sensible a la luz.

3.5.2 Cuantificación de azúcares. Se realiza mediante el método DNS, haciendo uso del reactivo previamente preparado, en tubos de ensayo se adicionan 0,5mL de cada una de las muestras hidrolizadas, de las cuales se desconoce la concentración de azúcar, se agrega 0,5mL de reactivo DNS, se calientan en baño maría a una temperatura de 80°C por 10 min. Cuando el ácido 3,5-dinitrosalisílico es reducido en presencia de calor, por el contacto con azúcares reductores, se desarrolla un cambio de color de amarillo a naranja ladrillo, se sumergen en agua fría por 10min y se agregan 5mL de agua destilada; el cambio de coloración puede determinarse por lecturas de densidad óptica, haciendo uso de equipo de espectrofotometría a una longitud de onda de 540nm. Es necesario preparar el blanco adicionando 0,5mL de agua destilada y 0,5mL de reactivo DNS en tubo de ensayo al cual se le realiza el mismo proceso descrito anteriormente.

3.5.3 Curva patrón de xilosa. Se prepara una solución patrón de xilosa cuya concentración es de 4 g/L, esta se diluye con agua destilada para obtener concentraciones de xilosa que van desde 0 a 2 mg/mL como se observa en la tabla 8. A cada disolución preparada se le mide la absorbancia a una longitud de onda de 540nm con el fin de realizar la linealización de la ecuación de xilosa, la cual, relaciona la absorbancia con la concentración de esta; obteniendo la ecuación de la recta que será de utilidad para determinar la concentración desconocida de azúcares reductores de cada muestra hidrolizada.

Tabla 8. Concentración de xilosa para obtener la ecuación de la recta para el método DNS.

No. dilución	Concentración De xilosa (mg/mL)	Agua (mL)	Xilosa (mL)
0	0 (blanco)	1,00	0
2	0,2	0,95	0,05
3	0,4	0,90	0,10
4	0,6	0,85	0,15
5	0,8	0,80	0,20
6	1	0,75	0,25
7	1,2	0,70	0,30
8	1,4	0,65	0,35
9	1,6	0,60	0,40
10	1,8	0,55	0,45
11	2	0,50	0,50

3.5.4 Determinación del grado de conversión y rendimiento de enzima. Para determinar el grado de conversión y rendimiento de la enzima Xilanasa AN 20 presentado en la etapa de hidrólisis enzimática, es necesario utilizar la ecuación 9 y ecuación 12 respectivamente¹¹², de igual manera se hace uso de la ecuación 10 y ecuación 11 para la determinación de azúcares reductores y de xilosa obtenible teóricamente.

Ecuación 9. Porcentaje grado de conversión.

$$\text{Grado de conversión (\%)} = \frac{\text{azúcares reductores producidos (mg)}}{\text{peso de sustrato (mg)}} * 100$$

Ecuación 10. Cantidad azúcares reductores.

$$\text{Cantidad azúcares reductores (mg)} = V.H * C.A.R$$

El peso de sustrato hace referencia a 5 g, cantidad de fibra utilizada en la hidrólisis enzimática, V.H es el volumen obtenido al final del proceso de hidrólisis y C.A.R corresponde a la concentración de azúcares reductores determinados mediante el método DNS. El grado de rendimiento hace referencia a la cantidad de azúcares a producir a partir de la cantidad teórica que es posible obtener. La hemicelulosa en su gran mayoría xilosa; azúcar cuya conversión ideal estimada durante la hidrólisis es de 0,852g de xilosa / g de hemicelulosa, es decir, “la concentración de xilosa representa un 85,2% del xilano potencial en el desecho de cáscara de piña”¹¹³.

Ecuación 11. Cantidad teórica de xilosa obtenible.

$$\begin{aligned} &\text{Cantidad teórica de xilosa obtenible (g)} \\ &= \text{peso de sustrato (g)} * 0,852 \frac{\text{g xilosa}}{\text{g hemicelulosa}} * C.H (\%) \end{aligned}$$

Donde *C.H* es el porcentaje de hemicelulosa presente en el sustrato en g de hemicelulosa / 100 g de sustrato.

¹¹² MALAGON M, Martha lucia. Obtención de etanol a partir de brócoli y cáscara de arveja empleando la enzima multifect 720 de carácter básico a nivel de laboratorio. Bogotá D.C: Fundación universidad de américa, 2008. P 4.

¹¹³ AMADOR, K. CARRILLO, O. ALVARADO, P. VEGA, J. Obtención de xilosa a partir de desechos lignocelulósicos de la producción y proceso industrial de la piña (*Ananas comosus*). Revista Uniciencia 26. p 83. Costa Rica. 2012.

Ecuación 12. Porcentaje de rendimiento hidrólisis enzimática.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{cantidad de azúcares reductores (mg)}}{\text{cantidad teórica de xilosa obtenible (mg)}} * 100$$

3.6 FERMENTACIÓN

Para llevar a cabo el proceso de fermentación es necesario realizar una activación de cepas y una pre-inoculación de estas en el hidrolizado que previamente debe ser esterilizado.

3.6.1 Esterilización del hidrolizado. Previo a la realización de la fermentación es necesario realizar la esterilización del hidrolizado, esto con el fin de garantizar que este no presente microorganismos que puedan llegar a afectar la fermentación con las levaduras respectivas. Se realiza la esterilización del hidrolizado y los recipientes que se utilizarán en la fermentación en una autoclave a 121°C por 1h, garantizándose la eliminación de microorganismos indeseados. La autoclave “es un sistema cerrado donde se forma vapor de agua que se somete a una presión elevada, una atmósfera, lo que hace que el agua alcance una temperatura de 121°C causando la desnaturalización de enzimas lo que conlleva a la muerte de los microorganismos y la destrucción de las esporas. Habitualmente, se esteriliza a 121°C durante 20-30 minutos”¹¹⁴.

3.6.2 Activación de levaduras. Se utilizan dos tipos de levaduras del género *Candida* de la colección de microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana, específicamente *Candida guilliermondii* CMPUJ H025 (Ficha técnica – Anexo H) y *Candida tropicalis* CMPUJ H029 (Ficha técnica – Anexo I), las cuales permanecen en agar PDA (Agar papa dextrosa) en nevera a una temperatura de 5°C para su conservación. Se realiza la activación de los microorganismos correspondientes, sembrando la levadura en medio de cultivo PDA fresco (Agar papa dextrosa), incubándose por un tiempo de 2 días (48 horas) a temperatura de 28°C. Las colonias de levadura se sembraron por el método de agotamiento¹¹⁵.

3.6.3 Activación de cepa en el hidrolizado. Se realiza la pre-inoculación del microorganismo en el caldo hidrolizado obtenido de los procesos realizados a la piña, el pretratamiento físico, químico e hidrólisis enzimática, para ello, se toma una azada del correspondiente microorganismo ya activo y se traspasa a un tubo de

¹¹⁴ EQUIPOS Y LABORATORIO DE COLOMBIA. Manejo del autoclave, desinfección y esterilización del laboratorio y sus materiales. Disponible en: http://www.equiposylaboratorio.com/sitio/contenidos_mo.php?it=3148 [en línea]

¹¹⁵ CMPUJ. Ficha técnica *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis*. Colección de microorganismos. Pontificia Universidad Javeriana. Disponible en: Anexo 8 y 9.

fermentación esterilizado, el cual contiene un 10% (20mL) del volumen total del hidrolizado a utilizar, por un tiempo de 15h y una temperatura de 28°C¹¹⁶, estas condiciones fueron determinadas teniendo en cuenta, el estudio realizado por T. Walther¹¹⁷ llamado “The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by *Candida tropicalis*”, en el cual realizan la pre-inoculación a una temperatura de 30°C, por un tiempo entre 14 -16 horas.

3.6.4 Fermentación. Posteriormente al cumplirse el tiempo de adaptación, se realiza el recuento en cámara de Neubauer y tinción de Gram, con el fin de obtener la concentración y viabilidad celular, para realizar la dilución necesaria de cada pre-inoculo, y así garantizar que se adicione la misma concentración de *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis* establecida en el volumen total del hidrolizado correspondiente y no se presenten microorganismos indeseados en el pre-inóculo.

Antes de realizar el recuento, es necesario diluir la muestra, lo cual permite un mejor conteo, en este caso, se realizaron diluciones seriadas hasta una base de 10⁻², ya que en esta dilución se observan de 10 a 20 células en cada cuadrante, las cuales pueden ser fácilmente contadas.

Se monta la cámara de Neubauer; son agregados 10µL de la muestra a través de una micropipeta (dilución en base 10⁻²) entre el espacio que queda entre la laminilla y la cámara. Con objetivo de 40x en el microscopio. Realizando el conteo de 5 cuadrantes, los cuatro extremos y uno central.

Después de ello, a través de la ecuación de la cámara de Neubauer (Ecuación 13), mostrada a continuación, se determina el volumen de pre-inóculo necesario para obtener una concentración inicial, en este caso, de 1*10⁷ células/ mL.

Ecuación 13. Concentración de células en conteo cámara de Neubauer.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{No. de Celulas contadas} * \text{Inverso del Factor de dilucion}}{\frac{\text{Número de cuadrantes contados}}{\text{Número de cuadrantes totales}} * \text{Factor de volumen}}$$

¹¹⁶ ALVARADO, A. Curador CMPUJ. Colección de microorganismos. Pontificia Universidad Javeriana. angela.alvarado@javeriana.edu.co

¹¹⁷ T. WALTHER, P. HENSIRISAK, F.A. AGBLEVOR. The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by *Candida tropicalis*. Department of Mechanical Engineering, Technical University of Dresden, Dresden, Germany. Department of Biological Systems Engineering, 212 Seitz Hall, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA 24061-0303, USA. Bioresource Technology 76 (2001) p. 213 ± 220.

El volumen previamente calculado se traspasa a un vaso de precipitado de 1000mL previamente esterilizado y se completa el volumen total de 200mL con caldo (hidrolizado); las levaduras a utilizar son aerobias, es decir, se desarrollan en presencia de oxígeno (aire). “En condiciones aerobias, la fermentación con xilosa es favorecida para el crecimiento celular, mientras que la levadura no puede usar xilosa bajo condiciones anaerobias estrictas. Por lo tanto, es necesario un control apropiado del oxígeno para una producción eficaz de xilitol.”¹¹⁸ Walther T¹¹⁹, estudio la influencia de la aireación y la concentración inicial de xilosa, en el estudio llamado “The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by *Candida tropicalis*”, en el cual se obtuvo el rendimiento máximo de xilitol de 0,7g/g manejándose una relación entre el caldo de fermentación y el volumen del recipiente de 1/2,5 y la mayor productividad de 0,9g/l*h manejándose una relación de 1/5, teniéndose en cuenta los resultados de este estudio y la experiencia de la curadora de microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana Angela Alvarado¹²⁰; se maneja una relación de 1/5, en este caso, por 200mL de cultivo deben haber 800mL de aire, los cuales se mezclarán con ayuda de la agitación; las condiciones de fermentación utilizadas son una temperatura entre 25°C a 28°C, agitación de 150 rpm y un tiempo de 4 días (96h)^{121,122}.

3.6.5 Seguimiento microscópico del crecimiento de levaduras. Se realiza un seguimiento del crecimiento y pureza de los microorganismos en el hidrolizado, a través de recuentos en la cámara de Neubauer y coloración Gram respectivamente. Utilizando el microscopio con objetivo 40x y 100x.

Para la realización del seguimiento del crecimiento de las levaduras, se toma un 1mL del caldo fermentado, de cada fermentación se realizan 2 réplicas técnicas, es decir, se sacan 3 muestras de 1mL del cultivo, tomando exactamente 1μL para cada una, se realizan diluciones seriadas hasta una base de 10⁻²; obtenidos los 10μL de cada replica se adicionan 5μL de azul de metileno, cuya función es teñir las células que no presentan viabilidad, posteriormente se monta la cámara de Neubauer, se agrega con ayuda de una micropipeta la dilución realizada anteriormente, entre el espacio que queda entre la laminilla y la cámara. Realizando el conteo de 5 cuadrantes, los cuatro extremos y uno central, utilizando objetivo de 40x en el

¹¹⁸ N.L. MOHAMAD, S.M MUSTAPA, M.N MOKHTAR. Xylitol Biological Production: A Review of Recent Studies. Department of Process and Food Engineering, Faculty of Engineering, Universiti Putra Malaysia, Selangor, Malaysia. Copyright © Universiti Putra Malaysia ISSN: 8755-9129 print / 1525-6103 online DOI: 10.1080/87559129.2014.961077. Food Reviews International, 31:74–89, 2015.

¹¹⁹ T. WALTHER, P. HENSIRISAK, F.A. AGBLEVOR. Op.cit., p. 215-216.

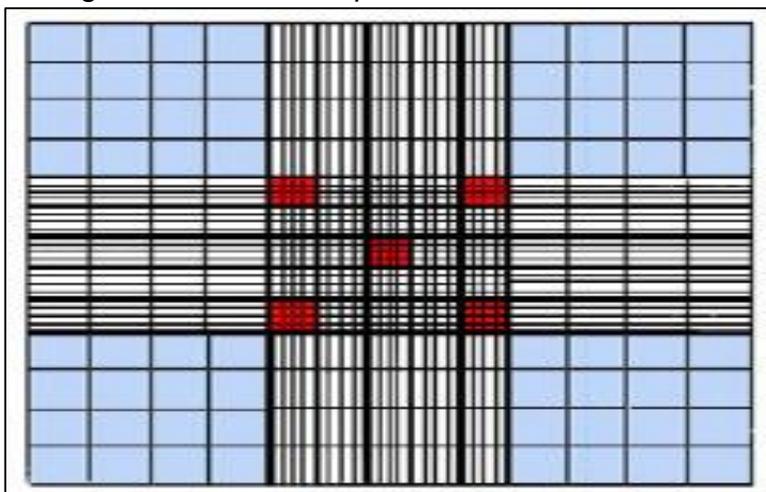
¹²⁰ ALVARADO, A. Op.cit.

¹²¹ Ibid.

¹²² BUITRAGO, J. ESCOBAR, A. Op.cit., p. 34.

microscopio. Es importante tener en cuenta que el volumen efectivo de trabajo para realizar la totalidad de conteos es máximo el 10% del volumen total de fermentación, es decir, 20mL. En la figura 17 se muestran resaltados los cuadrantes utilizados en el seguimiento microscópico.

Figura 17. Cuadrantes cámara de Neubauer utilizados en seguimiento microscópico.



Fuente: OVERBLOG. Cámara de Neubauer, recuento de eritrocitos. Disponible en: <http://uriel-93.overblog.com/article-29526447.html>

Para la verificación de la pureza del hidrolizado, se realiza coloración Gram, la cual consiste en colocar una gota del caldo fermentado en un portaobjetos, posteriormente se colorea con Gram de violeta por un tiempo de 1min, retirándose el exceso, seguidamente de Lugol de Gram por 1min, retirándose el exceso y finalmente etanol-cetona por 30s igualmente retirándose el exceso, se lava y retira el colorante en exceso con agua destilada, y finalmente se colorea con fucsina de Gram, se retira el sobrenadante y se deja secar a temperatura ambiente. Después de ello, se realiza la verificación de pureza en el microscopio con objetivo 100x. Este procedimiento se realiza cada 24h.

3.7 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN HPLC

La muestra obtenida del fermentado es enviada a un laboratorio, en este caso, al LIAC (Laboratorio Instrumental de Alta Complejidad) de la Universidad de la Salle, para el análisis de determinación de xilitol por cromatografía líquida de alta resolución HPLC.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 PRETRATAMIENTO FÍSICO

A continuación, se observa la cantidad de residuos de piña obtenidos en cada proceso de pretratamiento físico y se analizan las principales pérdidas presentadas en cada uno de estos.

4.1.1 Secado. Durante el proceso de secado se observa una evidente reducción del tamaño de la cáscara, la razón es que esta estaba unida a pulpa residual que quedaba en el momento del pelado de la piña y por la pérdida de humedad intrínseca de la fibra. La reducción de humedad en los alimentos, especialmente naturales es necesaria para la conservación de estos, aún más cuando partes retiradas del alimento quedan expuestas a una rápida degradación, pues al reducir el contenido de agua se elimina la posibilidad de un deterioro biológico de los residuos. De los 7Kg de residuos de piña obtenidos, se obtuvieron 4328g (4,33Kg aproximando) debido principalmente a las pérdidas generadas en el secado, ya que esta es una fruta que contiene alto % de humedad. El proceso de secado necesitó de dos procesos de secado de residuos, una por día para un total de 20 horas de secado de la totalidad de residuos obtenidos.

El porcentaje de humedad de la totalidad de residuos obtenidos se determina haciendo uso de la ecuación 1, cuyo valor resultante fue 38,14%, correspondiente a 2,7Kg de humedad, donde esta superó la tercera parte de la masa total de la muestra recolectada.

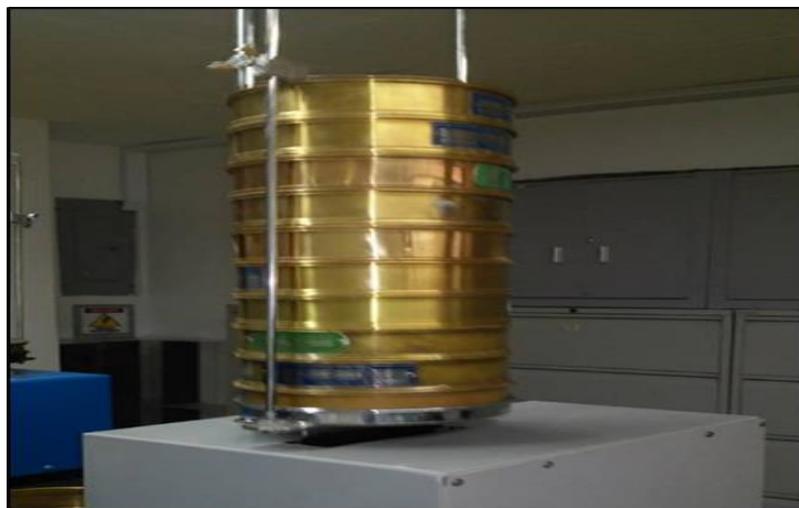
4.1.2 Molienda y tamizado. Posteriormente al secado, se molieron los 4328g resultantes de residuos de piña, montaje que se puede ver en la imagen 4, la muestra después de la molienda fue de 3808g, en dicho proceso se generaron pérdidas, esto se debió a que el molino al realizar la alimentación de la muestra desprendía parte de la misma debido a la fuerza y velocidad con la que este actuaba, por material particulado fino que escapaba de este y por fallas de precalentamiento; parte de la muestra quedaba adherida a la malla por pegajosidad de esta, presentada también por presencia de humedad residual en la fibra; ocasionando pastosidad de esta y adherencia al equipo, de igual manera el motor presento paradas, por lo que necesito de mantenimiento en medio de la molienda, generando pérdidas significativas de fibra al realizar el arreglo de este.

Imagen 4. Proceso de molienda de la cáscara de piña.



En cuanto al tamizado se utilizó la siguiente secuencia de malla de tamices 18, 20, 35, 40, 45, 50, 60, 80 y 100, en la imagen 5 se observa el montaje de estas. inicialmente se tomaron las mallas 18,20,35, 45 y 50, pero debido a que en el tamiz 50 no se recolectaba una muestra homogénea y uniforme fue necesario adicionar las demás mallas, logrando obtener en la malla 40/45 el tamaño de partícula adecuado para el análisis de caracterización química ($<0,5$ mm) y en la malla 80 partícula completamente uniforme ($<0,2$ mm) para dar inicio al pretratamiento químico. Las pérdidas obtenidas en este proceso de separación de tamaños se deben a errores humanos en la manipulación de la muestra, principalmente al momento de pasar la muestra de una malla a otro y al realizar el almacenamiento por tamaño.

Imagen 5. Proceso de tamizado de fibra previamente molida.



La masa y tamaño de partícula obtenida en el proceso de molienda y en cada uno de los tamices utilizados se observan en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados obtenidos de la molienda y tamizado de muestra obtenida de piña.

Malla N°	g de muestra obtenido en cada malla	Tamaño de partícula obtenido (µm)	Tamaño de partícula obtenido (mm)
18	1161	1000	1
20	411	850	0,850
35	951	500	0,500
40	189	425	0,425
45	225	355	0,355
50	137	300	0,300
60	147	250	0,250
80	397	180	0,180
100	25	150	0,150
Fondo	40		
Total	3683g		

Como se mencionó anteriormente, se obtuvieron diferentes tamaños de partícula, como se observa en la imagen 6; para los procesos posteriores de hidrólisis química, enzimática y fermentación se utiliza un tamaño de partícula de 0,18 mm, obtenidos en la malla tamiz 80. Se escoge este tamaño de partícula, porque es menor a los 0,6mm; con lo cual se garantiza que haya una buena accesibilidad al sustrato, permitiendo un buen contacto enzima-sustrato, lo cual, aumenta la liberación de azúcares durante la hidrólisis.

Imagen 6. Muestra de fibra piña seca, molida y tamizada.



4.2 CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS

A continuación, se muestra detalladamente los cálculos a realizar para la determinación del porcentaje de humedad, componentes extractivos, lignina, holocelulosa, celulosa y hemicelulosa presente en los residuos de cáscara de piña.

4.2.1 Porcentaje de Humedad. A continuación, se observan los respectivos datos y el cálculo para la determinación de porcentaje de humedad.

-Peso de la muestra: 12,4 g

-Peso del crisol: 29,0736 g

-Peso de la muestra + peso del crisol: 41,4736 g

• *Peso de la muestra + peso crisol, después del secado:*

1. 40,6279 g, después de 2 horas de secado

2. 40,6143 g, después de 4 horas de secado

3. 40,6075 g (peso constante), después de 6 horas de secado

-Peso de la muestra seca: 11,5339 g

$$\%Humedad = \frac{(12,4 - 11,5339)g}{12,4 g} * 100 = \boxed{6,98\%}$$

En la imagen 7, se muestra la fibra de piña después de introducirla en la mufla por periodos de 2 h, obteniéndose un peso constante a las 6 horas de secado.

Imagen 7. Muestra de fibra de piña después de 6 horas de secado.



4.2.2 Porcentaje de extraíbles. A continuación, se observan los respectivos datos y el cálculo para la determinación de porcentaje de extraíbles.

Peso de muestra: 7,5 g

Al conocer ya la humedad que es del 6,98%, se tiene en cuenta para la muestra anterior, por lo tanto, la muestra para análisis de extraíbles sin humedad es 6,94g.

En la imagen 8, se puede observar el montaje soxhlet con la muestra depositada en un dedal y la mezcla de hexano y etanol necesaria para la determinación de extraíbles.

Imagen 8. Montaje soxhlet para la eliminación de extraíbles de la piña.



El peso de la muestra libre de extraíbles sin secar fue de 6,9765 g, se secó en un total de 4 horas, pesando cada hora hasta obtener peso constante.

1. 5,3985 g
2. 5,1461 g
3. 5,1299 g
4. 5,1023 g (peso constante)

$$\%Extraibles = \frac{6,9368g - 5,1023g}{6,9368g} * 100 = \boxed{26,44 \%}$$

La muestra libre de extraíbles y peso constante se observa en la imagen 9.

Imagen 9. Muestra de piña libre de componentes extractivos.



4.2.3 Porcentaje de Lignina. Corresponde al porcentaje de lignina insoluble en ácido y lignina soluble en ácido.

4.2.3.1 Lignina insoluble en ácido. A continuación se observan los respectivos datos y el cálculo para la determinación de porcentaje de lignina insoluble en ácido.

Peso muestra libre de extraíbles: 0,5 g
 Peso muestra sin humedad: 0,4651 g
 Peso lignina+ papel filtro sin secar: 0,64 g
 Peso seco de lignina + papel filtro: 0,37 g
 Peso papel filtro: 0,35 g

$$\% \text{ Lignina insoluble en ácido} = \frac{0,02 g}{0,4651 g} * 100 = \boxed{4,3\%}$$

En la imagen 10, se puede ver la lignina insoluble en ácido seca, extraída después de los procesos de hidrólisis ácida, filtrado, lavado y secado.

Imagen 10. Lignina insoluble en ácido (klason) seca.



4.2.3.2 Lignina soluble en ácido. Después del proceso de hidrólisis ácida y filtrado, el hidrolizado obtenido mostrado en la imagen 11, es sometido al análisis de lignina soluble, a través de mediciones de absorbancia utilizando una longitud de onda de 205nm en el espectrofotómetro.

Imagen 11. Hidrolizado (filtrado) obtenido en análisis lignina insoluble en ácido.



Volumen hidrolizado (filtrado): 80 mL

Se tomaron 5 datos de absorbancia los cuales fueron:

1. 0,798 AU

2. 0,767 AU

3. 0,774 AU

4. 0,770 AU

5. 0,767 AU

Al promediarlas se obtiene una absorbancia de 0,7752 AU

$$\% \text{ Lignina soluble en ácido} = \frac{(0,7752 \text{ AU} \times 80 \text{ ml})}{(1100 \text{ ml} \cdot \text{AU/g} \times 0,5 \text{ g})} \times 100 = 11\%$$

Porcentaje total de lignina= 15,3%

4.2.4 Porcentaje de holocelulosa. Al agregar las cantidades correspondientes a la muestra de piña de agua destilada, ácido acético y clorito de sodio; la mezcla es calentada en baño de maria como se observa en la imagen 12, durante 1h a 70°C en constante agitación. Después de ello, se agrega nuevamente ácido acético y clorito de sodio cada hora, hasta completar 6 veces adicionados estos componentes.

Imagen 12. Calentamiento de muestra de piña con clorito de sodio y ácido acético.



Peso seco muestra sin extractivos: 2,5g

Peso vidrio reloj: 34,85g

Peso vidrio reloj+ Holocelulosa previamente secada: 35, 85g

Peso Holocelulosa: 1g

$$\%Holocelulosa = \frac{1 \text{ g}}{2,5 \text{ g}} * 100 = \boxed{40\%}$$

4.2.5 Porcentaje de celulosa y hemicelulosa. A continuación se observan los respectivos datos y los calculos para la determinación de porcentaje de celulosa y hemicelulosa.

Peso vidrio reloj con celulosa: 35,1389g

Peso vidrio reloj: 34,8584g

Peso seco muestra holocelulosa: 1g

$$\%Celulosa = \frac{35,1389-34,8584}{1 \text{ g}} * 100 = 28,05\%$$

Al realizar el respectivo proceso de determinación de celulosa, descrito en el numeral 3.2.5., se obtiene celulosa seca, la cual se observa en la imagen 13.

Imagen 13. Celulosa seca.



Peso celulosa: 0,2805g

Peso seco muestra holocelulosa: 1g

$$\%Hemicelulosa = \frac{1g-0,2964}{1g} * 100 = \boxed{71,95\%}$$

- Del 40% de la holocelulosa contenida en la cáscara un 28,05% es celulosa, es decir 0,2805g y el 71,95% es hemicelulosa, es decir 0,7195g.

Los resultados calculados anteriormente de la caracterización se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Composición química de la muestra de piña MD2 obtenida.

Componentes	Composición (%) p/p peso seco
Humedad	6,98
Extraíbles	26,44
Insoluble en ácido	4,30
Lignina	15,30
Soluble en ácido	11
Holocelulosa	40
Celulosa	11,22
Hemicelulosa	28,78
Total	89,14

En la tabla 10 se observa que el porcentaje de contenido de humedad es un valor que se asemeja al valor teórico (tabla 5) correspondiente a la cáscara de piña MD2, este valor se debe al contenido intrínseco normal de la fibra y a humedad residual, pues antes de la molienda se realizó un secado en mufla de la cáscara que se encontraba unida a pulpa, esta última es la parte de la piña que contiene más humedad; por el contrario, la cáscara es la ración que presenta mayor dureza y por su extenso secado resultó prácticamente deshidratada. Es importante conocer su contenido antes de su uso en los demás análisis para evitar problemas que produzcan cambios al iniciar los tratamientos químicos que permitirán cuantificar cada componente.

En cuanto a los extraíbles se observa una importante presencia de estos, siendo aproximadamente más de la cuarta parte de la totalidad de composición de la fibra, los extraíbles están conformados por proteínas, vitaminas, lípidos, minerales, clorofila y esencias responsables de la coloración amarilla-verdosa extraída y el aroma dulce desprendido en el momento de la extracción, causado también por el valor apreciable de lignina determinada, dado que está formada por la extracción irreversible del agua de los azúcares, creando compuestos aromáticos. “Las sustancias extraíbles con disolventes son, principalmente, terpenos, resinas, fenoles y algunos otros incluidos hidratos de carbono de bajo peso molecular o

lignina soluble. El conjunto de todos ellos se conoce como componentes secundarios”¹²³.

La lignina es una de las columnas que soporta los tejidos de la planta, es importante que su concentración sea significativa para beneficios de la planta, debido a que esta permite que la cáscara sea mucho más fuerte y resistente a la intemperie, el 15,3% significa que no todos los enlaces están disponibles para atraer la humedad¹²⁴, lo que contribuye a explicar porque estas especies presentan buena estabilidad a la degradación. Para los objetivos del proyecto no es favorable que la cantidad de lignina sea mayor a la observada en la tabla 5, razón por la cual la deslignificación fue una etapa necesaria e incondicional para poder realizar la hidrólisis enzimática, debido a que el valor obtenido superó al valor teórico de esta, etapa que está unida al pretratamiento realizado para alcanzar altos rendimientos de conversión de sustrato.

En esta tabla también se puede observar que el contenido de holocelulosa en la cáscara de piña es de un 40%, la holocelulosa está constituida por celulosa y hemicelulosa; al determinar el contenido de celulosa se obtiene que en 1g de holocelulosa tiene 0,2805g correspondiendo a un 11,22% del 40%, lográndose calcular la hemicelulosa, la cual dio como resultado 0,7195g y un porcentaje del 28,78%. La cantidad de hemicelulosa obtenida comparada con las maderas duras 24-40%¹²⁵ es similar, en cuanto a la celulosa esta da un valor menor con respecto a las maderas (40-55%)¹²⁶, esto se puede deber a que la corona de la piña contiene más hemicelulosa, y los residuos recogidos tenían combinación de ambas.

El resultado obtenido de hemicelulosa favorece el estudio realizado, ya que este es el componente de interés, puesto que las enzimas actúan sobre el para obtener xilosa.

4.3 PRETRATAMIENTO QUÍMICO (DESLIGNIFICACIÓN)

Se realiza el montaje de la hidrólisis alcalina como proceso de deslignificación como se observa en la imagen 14; después de realizado el proceso se observa como se muestra en la imagen 15 un hinchamiento de la fibra, teniendo lugar reacciones de saponificación y solvatación¹²⁷; provocando un estado de inflamación, el cual facilita

¹²³ BARROSO, Miguel. Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería. Madrid: universidad politécnica de Madrid, 2010. 74 P.

¹²⁴ LA GUÍA. Lignina-la química de la madera. Disponible en: <http://quimica.laguia2000.com/elementos-quimicos/lignina-la-quimica-de-la-madera>. [en línea]

¹²⁵ MONTAÑO, H. op.cit., P.10. Tabla 3.1. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en residuos agrícolas comunes y basuras.

¹²⁶ Ibid. P.10.

¹²⁷ NIÑO, L. ACOSTA, A. GELVES, R. Op cit., P 318

la accesibilidad de enzimas y bacterias a la matriz celulósica y hemicelulósica, ideal para este caso. Además de ello, solubiliza la lignina para separar la fracción fermentable de la no fermentable.

En la totalidad de la fibra pretratada se genera una pérdida del olor característico de la piña y una coloración completamente café de la muestra, se realizó 4 veces el lavado y la sedimentación de la fibra hasta alcanzar pH neutro ($\text{pH}=7$) en los que además de regular el grado de basicidad se remueve la coloración café hasta obtener una muestra translúcida y cristalina.

Imagen 14. Montaje pretratamiento químico (designificación).



Imagen 15. Fibra designificada.



4.4 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

En esta etapa es de suma importancia mantener el control de la temperatura, pH y agitación de los 12 tratamientos, como se puede observar en la imagen 16 del montaje realizado; es necesario adicionar 80 mL de agua a las muestras que se desmontaron a los 3 días, dado que se consideró que la fibra debía estar completamente sumergida en la fase acuosa, para garantizar una mejor agitación, movilidad y contacto entre sustrato-enzima; en la ficha técnica de la xilanasas no se encontró detalle alguno sobre el volumen de agua que se debía utilizar para la hidrólisis; es necesario la adición de buffer debido a que el pH tiende a subir a 8, pH que se encuentra fuera del umbral de aceptación de la enzima.

Pasados los 3 días y finalizado el tratamiento de hidrólisis, se observa un cambio notable en la apariencia y estado de la solución, inicialmente se presenta la fase líquida y la fase sólida de la fibra completamente separadas y diferenciadas, luego de la hidrólisis se obtuvo una solución menos heterogénea donde es evidente la interacción entre el agua, la fibra y la enzima; resultando una muestra viscosa, densa y glutinosa, el olor percibido de los hidrolizados fue olor madera. Para la cuantificación de azúcares fue necesario centrifugar las muestras, utilizando el sobrenadante en las medidas de absorción, desechando el precipitado mediante el lavado de los tubos de la centrifuga, donde quedó completamente adherido.

Imagen 16. Montaje diseño experimental de la hidrólisis enzimática.

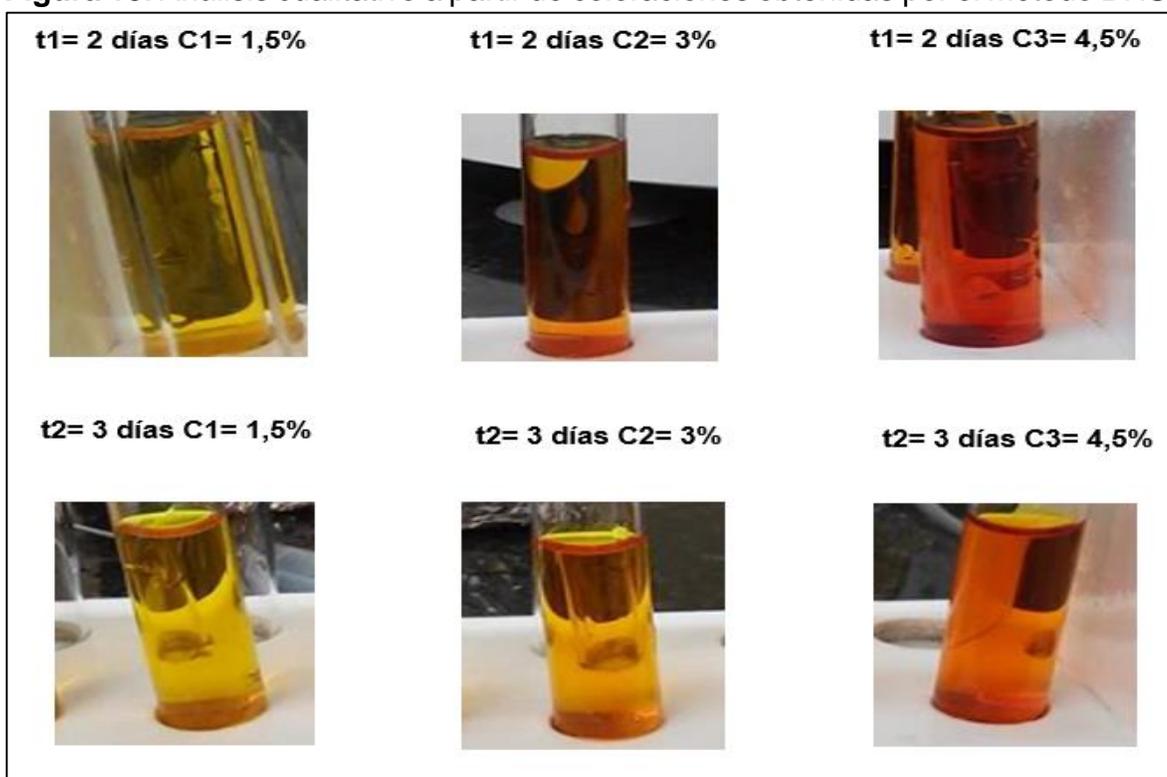


4.5 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES MEDIANTE MÉTODO DNS

La determinación de azúcares reductores por el método DNS permite realizar un análisis básico cualitativo y un completo análisis cuantitativo de la presencia principalmente de xilosa, azúcar obtenido debido a la acción específica de la enzima xilanasa. Cualitativamente se observa un cambio de color al momento de someter las muestras a calentamiento con DNS, concluyendo que entre más intensa es la coloración mayor es la presencia de azúcares reductores; mediante este análisis no se evidencia la cantidad de xilosa obtenida, ni el valor de pureza de la misma, cuantitativamente se logra obtener la cuantificación de los azúcares reductores presentes como son principalmente xilosa, glucosa y arabinosa, azúcares que son aprovechados por el microorganismo para la producción de xilitol.

4.5.1 Análisis cualitativo de azúcares reductores. Se realiza un análisis cualitativo en cada una de las muestras sometidas a determinación de azúcares reductores, este análisis se desarrolla con respecto a resultados colorimétricos, como respuesta del contacto entre el reactivo DNS y los azúcares reductores presentes.

Figura 18. Análisis cualitativo a partir de coloraciones obtenidas por el método DNS.



4.5.1.1 Análisis a los 2 días, variando concentración de Xilanasa 1,5%p/p; 3%p/p y 4,5%p/p. Las muestras de piña tratadas mediante hidrólisis enzimática, a un tiempo de 2 días y variando la concentración de enzima a 1,5%p/p, 3%p/p y 4,5%p/p evidencian una coloración de amarillo a naranja ladrillo, donde se muestra cualitativamente la presencia de xilosa en cada muestra. Se observa tonalidad amarilla, es decir, menor cantidad de azúcares reductores a una concentración de enzima de 1,5%p/p; se observa tonalidad más intensa para la concentración de enzima 4,5%p/p; indicando mayor presencia de azúcares reductores. Concluyendo que 2 días es el tiempo adecuado, en el que la Xilanasa desempeña favorablemente su actividad enzimática y al aumentar la concentración de enzima aumenta la concentración de azúcares obtenidos. “La actividad enzimática es favorable en tiempos en los que la enzima consume sustrato en cantidades mesurables, esta es proporcional al tiempo de reacción cuando no ocurre saturación de la enzima por el sustrato, al ocurrir la saturación se provoca la pérdida de proporcionalidad”¹²⁸, posible razón por la cual se obtienen mejores resultados en el menor tiempo. De igual forma se observa en el estudio realizado por Lima, Ingram y Smirnova¹²⁹ una comparación de conversión de celulosa en rangos de tiempo de 48h y 72h, donde alcanzaron la mejor conversión del 90% a las 48h.

4.5.1.2 Análisis a los 3 días, variando concentración de Xilanasa 1,5% p/p; 3% p/p y 4,5% p/p. Las muestras sometidas a hidrólisis enzimática por 3 días, y de igual manera variando las concentraciones; se evidencia una menor concentración de xilosa al trabajar con 1,5%p/p de concentración de Xilanasa y una mayor concentración al trabajar con 4,5%p/p como se observa en la figura 18. Concluyendo que independientemente del tiempo de hidrólisis, la concentración de azúcares reductores aumenta con el aumento de concentración de enzima, donde se presenta una relación directamente proporcional entre estas dos variables.

4.5.1.3 Análisis con concentración 1,5% p/p de Xilanasa y variando tiempo 2 y 3 días. Al manejar una concentración de enzima de 1,5% p/p y variando el tiempo 2 y 3 días, se observa en la figura 18 tonalidades amarillas en esta concentración, pudiéndose concluir que en los dos tiempos de hidrólisis se presenta baja concentración de azúcares reductores; principalmente se evidencia una tonalidad más clara a los 3 días. En este caso, a medida que aumenta el tiempo de hidrólisis disminuye la concentración de xilosa; cualitativamente se detalla menor rendimiento

¹²⁸ WEB DEL PROFESOR. Enzima catalasa: actividad enzimática. factores que la afectan. determinación de la constante de michaelis-menten. efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática. Disponible en: <http://webdelprofesor.ula.ve/farmacia/gmendez/manuales%20PDF/EXPERIMENTO%205%20CATALASA%2006-04.pdf>

¹²⁹ LIMA, Juan., INGRAM., Thomas Y SMIRNOVA, Irina. Hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica: diseño de proceso y optimización de parámetros. Guatemala: facultad de ingeniería, Universidad del valle de Guatemala, Revista 21.

de azúcares a una concentración de enzima 1,5% p/p y un tiempo de hidrólisis de 3 días, de la totalidad de tratamientos realizados.

4.5.1.4 Análisis con concentración 3% p/p de Xilanasa y variando tiempo 2 y 3 días. Al manejar una concentración de xilanasa de 3%p/p y variando el tiempo de hidrólisis, se observa una disminución de azúcares reductores al aumentar el tiempo de hidrólisis, obteniendo en esta concentración menor presencia de azúcares a los 3 días. En la figura 18, se evidencia una disminución de tonalidad de naranja ladrillo a naranja claro que corresponde a 2 y 3 días respectivamente. Concluyendo una relación inversamente proporcional entre el tiempo de hidrólisis y la concentración de azúcares reductores.

4.5.1.5 Análisis con concentración 4,5% p/p de Xilanasa y variando tiempo 2 y 3 días. En la figura 18, se observa que a una concentración de 4,5%p/p de enzima, se obtiene la mayor presencia de azúcares reductores, evidenciando la tonalidad más intensa entre estas dos muestras de la totalidad de tratamientos, siendo de mayor rendimiento la muestra de concentración 4,5% p/p de enzima y un tiempo de 2 días de hidrólisis, que de igual forma por análisis cuantitativo presentó la mayor cantidad de azúcares. A los 3 días se tiene una menor tonalidad, concluyendo que al aumentar el tiempo de hidrólisis la enzima no trabaja favorablemente; esto puede ser causado por una desnaturalización al saturar la actividad enzimática por una mayor exposición sobre la fibra de piña. “El efecto del tiempo sobre la actividad de una enzima se puede dividir en tres etapas: la primera en la cual la velocidad de la reacción se mantiene constante en el tiempo de incubación (velocidades iniciales); la segunda en la cual la velocidad de la reacción comienza a disminuir; y la tercera en que la velocidad cae a cero. Cabe mencionar que las enzimas son proteínas por lo que las exposiciones de tiempos prolongados a temperaturas mayores de 5° C producirán su denaturación”¹³⁰.

4.5.2 Concentración de xilosa. Se realizaron dos lecturas de absorbancias de las diluciones de xilosa preparadas, con el fin de obtener la absorbancia promedio de cada dilución de concentración conocida. En la realización del método DNS se contempló la gama de coloración observando el aumento de la intensidad de color a medida que aumentaba la concentración de xilosa, como se observa en la imagen 17. Los datos de absorbancia obtenidos para las diferentes concentraciones se presentan en la tabla 11. En la gráfica 2 se encuentra la linealización de la curva de concentración de xilosa.

¹³⁰ AQFSESIONES. Enzimas: Factores que afectan la actividad de las enzimas. [en línea]. Disponible en: <http://aqfsecciones.blogspot.com.co/p/enzima.html>

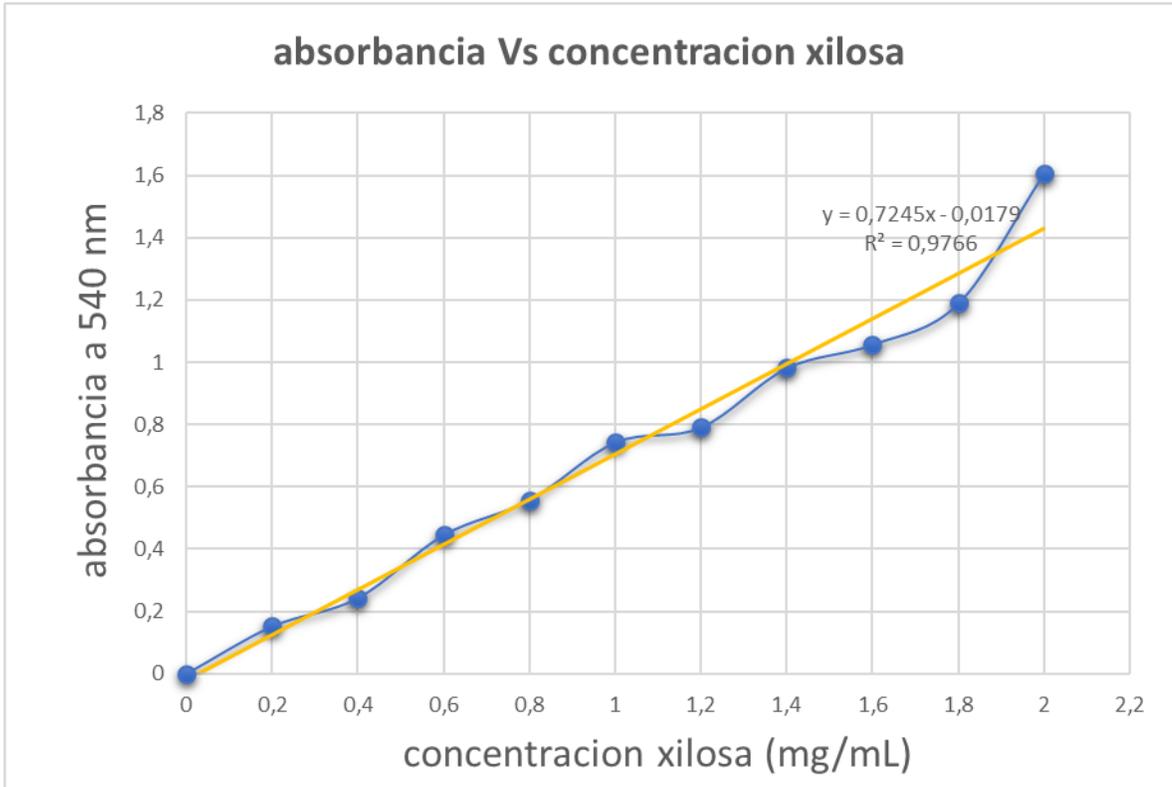
Tabla 11. Absorbancias obtenidas para diferentes concentraciones de xilosa.

Concentración xilosa (mg/mL)	Absorbancia 1 (AU)	Absorbancia 2 (AU)	Promedio de absorbancia (AU)
0	0	0	0
0,2	0,158	0,147	0,1525
0,4	0,261	0,226	0,2435
0,6	0,440	0,452	0,4460
0,8	0,565	0,550	0,5575
1,0	0,807	0,680	0,7435
1,2	0,848	0,735	0,7915
1,4	0,927	1,037	0,9820
1,6	1,041	1,074	1,0575
1,8	1,131	1,249	1,1900
2,0	1,607	1,609	1,6080

Imagen 17. Concentraciones de xilosa analizadas por método DNS.



Grafica 2. Curva de calibración y linealización ecuación azúcares reductores (xilosa).



La ecuación de la recta para el análisis DNS y obtención de concentración de azúcares reductores se observa en la ecuación 14.

Ecuación 14. Ecuación lineal de concentración de xilosa.

$$concentracion\ azúcares\ reductores = \frac{absorbancia + 0,0179}{0,7245}$$

4.5.3 Cuantificación de azúcares reductores en los diferentes tratamientos del diseño experimental. Se realizaron 2 lecturas de absorbancia para cada uno de los 12 hidrolizados, para un total de 24 absorbancias tomadas por espectrofotometría, datos que se utilizarán como réplicas para el análisis estadístico. A continuación, en la tabla 12, se muestran los valores de absorbancias obtenidos para cada uno de los tratamientos realizados con su respectivo valor de la réplica.

Tabla 12. Absorbancias obtenidas de la totalidad de tratamientos del diseño experimental de la hidrólisis enzimática.

Muestras originales					Réplicas muestras			
Conc. Enzima %P/P	2 días		3 días		2 días		3 días	
	Abs 1	Abs 2	Abs 1	Abs 2	Abs 1	Abs 2	Abs 1	Abs 2
1,5	0,121	0,130	0,118	0,090	0,097	0,113	0,042	0,032
3,0	0,360	0,410	0,053	0,060	0,165	0,221	0,071	0,063
4,5	0,470	0,542	0,423	0,433	0,440	0,413	0,213	0,140

Haciendo uso de la ecuación 14, se procede a calcular la concentración de xilosa respectiva para cada absorbancia, resultados que se observan en la tabla 13 y con las concentraciones obtenidas se continua con el análisis del diseño experimental.

Tabla 13. Concentraciones de azúcares reductores obtenidas a partir de la ecuación de calibración de xilosa.

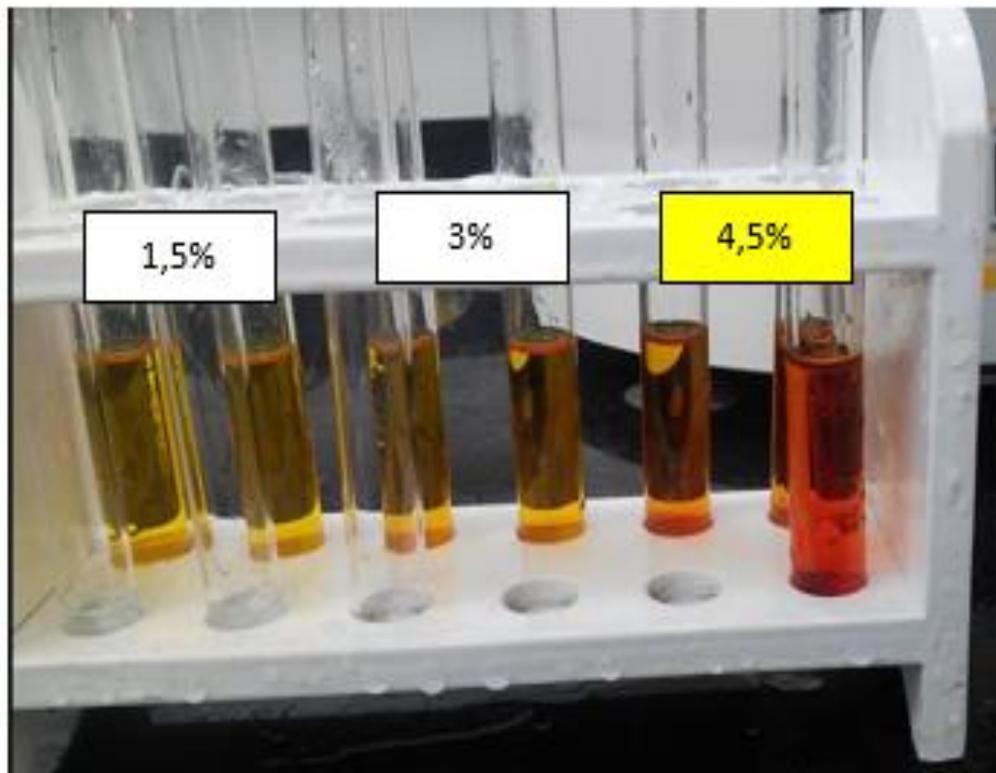
Muestras originales					Réplicas muestras			
Conc. Enzima %P/P	2 días		3 días		2 días		3 días	
	Concentración azúcares reductores (mg/mL)							
	1	2	1	2	1	2	1	2
1,5	0,192	0,204	0,188	0,149	0,159	0,181	0,083	0,069
3,0	0,522	0,591	0,098	0,108	0,252	0,330	0,123	0,112
4,5	0,673	0,773	0,609	0,622	0,632	0,595	0,319	0,218

Mediante el proceso de determinación de azúcares reductores se evidencia un bajo rendimiento del proceso de hidrólisis enzimática. Observando en la tabla 13 las concentraciones obtenidas, las cuales son bajas. Estos valores se deben a la heterogeneidad del xilano constituyente de la fracción hemicelulósica y al uso de una única enzima, la Xilanasas. “La hidrólisis de xilanos requiere de la acción sinérgica de un sistema complejo de enzimas, cuya interacción ataca la cadena principal, con las que desprenden los grupos laterales unidos a los residuos de xilosa. Las enzimas que actúan sobre la cadena principal son las endo- β -1,4-xilanasas, β -1,4-xilosidasas, y probablemente exoxilanasas, adicional a esto dependiendo de la fuente de xilanos, las enzimas requeridas para atacar los grupos

laterales son α -L-arabinosidasas y α -D-glucuronidasas”¹³¹. Se observa que las mejores condiciones de hidrólisis enzimática son 4,5% p/p de concentración de Xilanasas y un tiempo de hidrólisis de 2 días, valores que se emplearán para la muestra sometida a fermentación, dado a que son las condiciones que muestran mayor obtención de azúcares reductores.

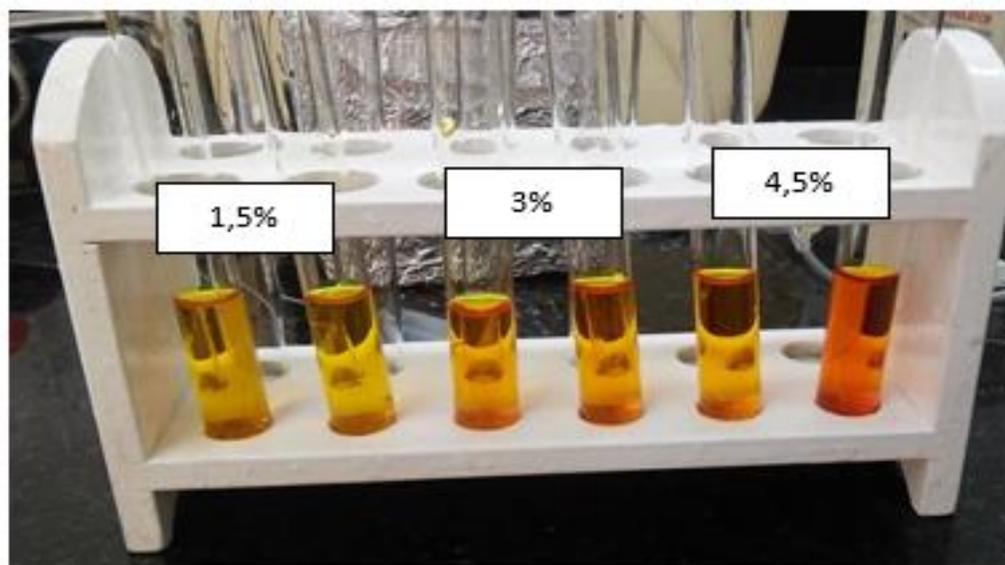
En general se observan mejores resultados de rendimiento de azúcares reductores en las muestras cuyo tiempo de hidrólisis fue de 2 días, tiempo en el que la enzima evidenció un mejor comportamiento con las condiciones y con el sustrato, mientras que en las muestras cuyo tiempo de hidrólisis fue de 3 días; se presentaron inconvenientes por evaporación de la fase acuosa, generando una posible saturación de la enzima a causa del sustrato. A continuación, en la imagen 18 y 19 se observa el análisis de coloración y absorbancia realizado mediante método DNS.

Imagen 18. Método DNS para muestras con 2 días de tiempo de hidrólisis.



¹³¹ LOERA CORRAL, Op.cit.

Imagen 19. Método DNS para muestras con 3 días de tiempo de hidrólisis.



4.5.4 Grado de conversión y rendimiento de la enzima Xilanasa AN 20 durante el proceso de hidrólisis. Al determinar el grado de conversión y el porcentaje de rendimiento, se obtienen resultados bajos y con poca viabilidad industrial del proceso de hidrólisis enzimática, debido a que no se logra superar el 0,9% de conversión de sustrato para la producción de azúcares como se observa en la tabla 15. En la tabla 16 se evidencia que el rendimiento no fue superior al 4%, obteniendo como mayor rendimiento en la conversión de hemicelulosa a celulosa un valor de 3,568%, que corresponde a la hidrólisis cuya concentración de enzima fue de 4,5%p/p y 2 días de tratamiento. A continuación, se presenta en la tabla 14 los valores de volumen final de hidrolizado y la concentración de azúcares reductores obtenidos, teniendo en cuenta únicamente los datos de las muestras originales para los cálculos.

Tabla 14. Resultados azúcares reductores mediante el método DNS.

Tratamiento original	Volumen final hidrolizado (mL)	Concentración promedio de azúcares reductores (mg xilosa/mL)
1,5%, 2 días	58	0,198
3,0%, 2 días	61	0,557
4,5%, 2 días	60,5	0,723
1,5%, 3 días	70,8	0,169
3,0%, 3 días	67,5	0,103
4,5%, 3 días	65,3	0,616

Haciendo uso de las ecuaciones 9 y 10, se procede a determinar el grado de conversión. A continuación, se presenta la muestra de cálculo para la combinación 1,5% de concentración de enzima y 2 días de hidrólisis enzimática.

$$\begin{aligned} \text{Cantidad azúcares reductores (mg)} &= 58 \text{ mL} * 0,198 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \\ &= \boxed{11,484\text{mg}} \end{aligned}$$

$$\text{Grado de conversión (\%)} = \frac{11,484 \text{ mg}}{5000 \text{ mg}} * 100 = \boxed{0,229\%}$$

Tabla 15. Resultados de la conversión de la enzima Xilanasa AN 20 durante la hidrólisis.

Tratamiento original	Volumen final hidrolizado (mL)	Concentración promedio de azúcares reductores (mg xilosa/mL)	Grado de conversión (%)
1,5%, 2 días	58	0,198	0,229
3,0%, 2 días	61	0,557	0,679
4,5%, 2 días	60,5	0,723	0,875
1,5%, 3 días	70,8	0,169	0,239
3,0%, 3 días	67,5	0,103	0,139
4,5%, 3 días	65,3	0,616	0,804

Aplicando las ecuaciones 11 y 12, se determina el rendimiento. A continuación, se presenta la muestra de cálculo para la combinación 1,5%p/p de concentración de enzima y 2 días de hidrólisis enzimática.

$$\begin{aligned} \text{Cantidad teórica de xilosa obtenible (g)} \\ &= 5 \text{ (g)} * 0,852 \frac{\text{g xilosa}}{\text{g hemicelulosa}} * 0,2878 \frac{\text{g hemicelulosa}}{\text{g sustrato}} \end{aligned}$$

$$\text{Cantidad teórica de xilosa obtenible (g)} = \boxed{1,226 \text{ g xilosa}}$$

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{11,484 \text{ mg}}{1226 \text{ mg}} * 100 = \boxed{0,937\%}$$

Tabla 16. Rendimiento hidrólisis enzimática con base a la cantidad de hemicelulosa disponible en la fibra.

Tratamiento original	Rendimiento (%)
1,5%, 2 días	0,937
3,0%, 2 días	2,771
4,5%, 2 días	3,568
1,5%, 3 días	0,976
3,0%, 3 días	0,567
4,5%, 3 días	3,281

En el proyecto realizado por Santos y Zabala¹³², llamado “Evaluación de la producción de etanol a partir de residuos orgánicos y sus diferentes mezclas, generados en la empresa de alimentos S.A.S” determinaron el % de grado de conversión y % de rendimiento de la enzima Multifect B durante el proceso de hidrólisis, enzima que actuó sobre diferentes sustratos como son los residuos de mora, mango, lulo, limón, maracuyá y mezclas de estos, de manera similar obtuvieron resultados bajos, con un valor máximo de 0,533% y 6,51% de grado de conversión y rendimiento respectivamente para la mezcla limón- lulo, donde evidenciaron la poca viabilidad comercial de estos resultados.

En el caso del proyecto realizado por Malagón¹³³, llamado “Obtención de etanol a partir de brócoli y cáscara de arveja empleando la enzima Multifect 720 de carácter básico a nivel de laboratorio” se presentaron resultados apreciables para el grado de conversión en el proceso de hidrólisis enzimática, de un 14,2% para la cáscara de arveja 13,4% para el brócoli en un tiempo de 24 horas.

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DISEÑO EXPERIMENTAL DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Como ya se mencionó, se realiza un análisis de varianza (ANOVA), con el cual se puede evaluar el efecto de la concentración de la enzima, del tiempo de hidrólisis y de la interacción de ambas condiciones en la concentración de azúcares reductores. Se utiliza las tablas de distribución F, con un nivel de significancia de 0,05, es decir; un 95% de confiabilidad de la prueba. En la tabla 17 se observan los datos de concentración de azúcares reductores unificados por bloques, cada bloque conformado por los valores resultantes en la interacción de condiciones de igual forma se encuentran valores relacionados a sumatorias de estos para la iniciación

¹³² SANTOS, Judith Y ZABALA, Diego. Evaluación de la producción de etanol a partir de residuos orgánicos y sus diferentes mezclas, generados en la empresa de alimentos S.A.S. Trabajo de grado ingeniero químico. Bogotá, D.C: Fundación Universidad de América. Facultad de ingenierías, 2016. 79 P.

¹³³ MALAGON, OP.Cit., P. 8.

del análisis estadístico experimental. La tabla 18 muestra cálculos del análisis ANOVA, valores necesarios para realizar la distribución F, datos que se observan en la tabla 19.

Tabla 17. Datos de concentración de azúcares reductores con relación a concentración de enzima, tiempo de hidrólisis y cálculos de análisis de bloques.

Concentración Enzima (FACTOR A)	Tiempo de hidrólisis (FACTOR B)		y _i **	
	2 días	3 días		
1,5% p/p	0,192	0,188	y ₁ **= 1,225	
	0,204	0,149		
	0,159	0,083		
	0,181	0,069		
3.0% p/p	y ₁₁ *=0,736	y ₁₂ *=0,489		
	0,522	0,098		
	0,591	0,108		
	0,252	0,123		
	0,330	0,112		
4,5% p/p	y ₂₁ *=1,695	y ₂₂ *=0,441		y ₂ **=2,136
	0,673	0,609		
	0,773	0,622		
	0,632	0,319		
	0,595	0,218		
	y ₃₁ *=2,673	y ₃₂ *=1,768	y ₃ **=4,441	
y [*] j [*]	y [*] 2 [*] =5,104	y [*] 3 [*] =2,698	y ^{***} =7,802	

A continuación, se realizan los cálculos para el análisis ANOVA, se hace uso de la ecuación 15 a la ecuación 24.

Ecuación 15. Suma cuadrados totales.

$$SCT = \sum \sum y_{ij}^2 - \left(\frac{y_{***}^2}{N} \right)$$

Ecuación 16. Suma cuadrados entre factor A (tiempo hidrólisis).

$$SCE_A = \frac{1}{b \cdot n} \sum y_{i**}^2 - \left(\frac{y_{***}^2}{N} \right)$$

Ecuación 17. Suma cuadrados entre factor B (concentración enzima).

$$SCE_B = \frac{1}{a * n} \Sigma y_{*j}^2 - \left(\frac{y_{***}^2}{N} \right)$$

Ecuación 18. Suma cuadrados entre interacción tiempo de hidrólisis y concentración de enzima.

$$SCE_{AB} = \frac{1}{n} \Sigma y_{ij}^2 - \left(\frac{y_{***}^2}{N} \right) - SCE_A - SCE_B$$

Ecuación 19. Suma cuadrados dentro tratamientos-error residual.

$$SCD_{ER} = SCT - SCE_A - SCE_B - SCE_{AB}$$

Ecuación 20. Cuadrados medios entre tiempo de hidrólisis.

$$CME_A = \frac{SCE_A}{a - 1}$$

Ecuación 21. Cuadrados medios entre concentración de enzima.

$$CME_B = \frac{SCE_B}{b - 1}$$

Ecuación 22. Cuadrados medios entre interacción tiempo de hidrólisis y concentración de enzima.

$$CME_{AB} = \frac{SCE_{AB}}{(a - 1)(b - 1)}$$

Ecuación 23. Cuadrados medios dentro tratamientos-error residual.

$$CMD_{ER} = \frac{SCD_{ER}}{(ab) * (n - 1)}$$

Ecuación 24. Cuadrados medio total.

$$CMT = \frac{SCT}{(N - 1)}$$

Dónde:

- y_{ij} es cada uno de los valores de la variable respuesta
- N es el número total de datos (24 valores),
- b es el número de niveles del factor B
- n es el número de réplicas por tratamiento
- y_{ij}^* es la suma de datos en cada bloque
- y_i^{**} es la suma de los y_{ij}^* horizontalmente
- a es el número de niveles del factor A
- y_j^* es la suma de y_{ij}^* verticalmente
- y^{***} es la suma de los y_j^* o de los y_i^{**}

Tabla 18. Tabla análisis ANOVA.

Fuentes de variación	Suma cuadrados	Grados libertad	Cuadrados medios
Entre concentración de enzima	$SCE_A = 0,6869$	$a-1= 2$	$CME_A=0,3435$
Entre tiempo hidrólisis	$SCE_B = 0,2412$	$b-1= 1$	$CME_B = 0,2412$
Entre interacción tiempo-concentración	$SCE_{AB} = 0,0654$	$(a-1) * (b-1) = 2$	$CME_{AB} = 0,0327$
Dentro tratamientos error residual	$SCD_{ER} = 0,2299$	$a*b*(n-1) = 18$	$CMD_{ER} = 0,0128$
Total	$SCT = 1,2235$	$N-1=23$	$CMT = 0,0532$

Se realizan cálculos de distribución F, haciendo uso de la ecuación 25 a la ecuación 27.

Ecuación 25. Distribución F, tiempo de hidrólisis.

$$FA = \frac{CME_A}{CMD_{ER}}$$

Ecuación 26. Distribución F, concentración de enzima.

$$FB = \frac{CME_B}{CMD_{ER}}$$

Ecuación 27. Distribución F, interacción tiempo de hidrólisis y concentración de enzima.

$$FAB = \frac{CME_{AB}}{CMD_{ER}}$$

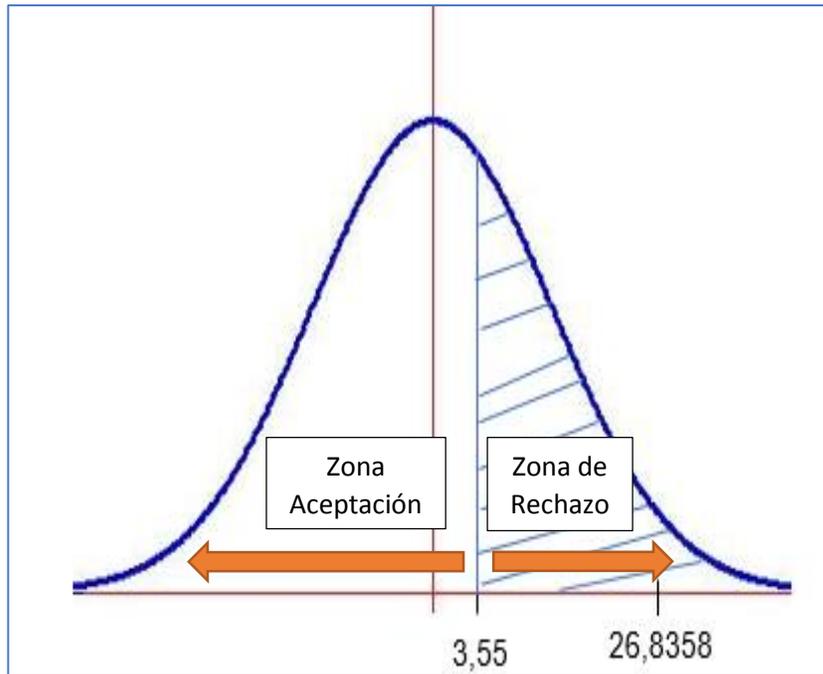
Tabla 19. Distribución F.

Distribución F (calculada)	Distribución F (tablas)
$FA = 26,8359$	$FTA_{0,05,2,18} = 3,55$
$FB = 18,8438$	$FTB_{0,05,1,18} = 4,41$
$FAB = 2,55470$	$FTAB_{0,05,2,18} = 3,55$

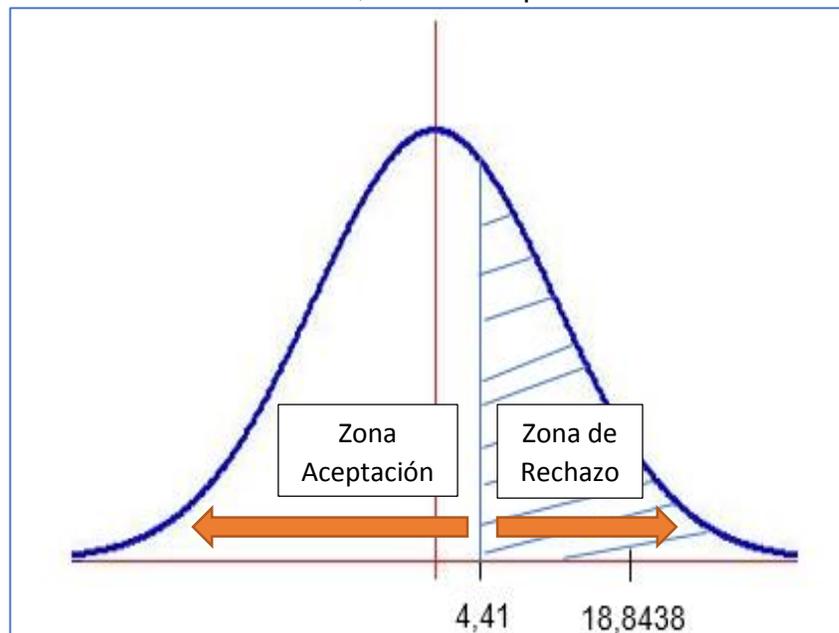
En las gráficas 3, 4 y 5, se observa la distribución de Fisher para cada uno de los factores analizados, observando el contraste de las hipótesis planteadas. la distribución F “es una técnica que permite detectar la existencia o inexistencia de diferencias significativas entre muestras diferentes y que es, por tanto, esencial, en todos aquellos casos en los que se quiere investigar la relevancia de un factor en el desarrollo y naturaleza de una característica”¹³⁴

¹³⁴ UNIVERSIDAD DE VALENCIA. Distribución F de Snedecor. [en línea]. Disponible en: <https://www.uv.es/ceaces/normaMu/f/f.htm>

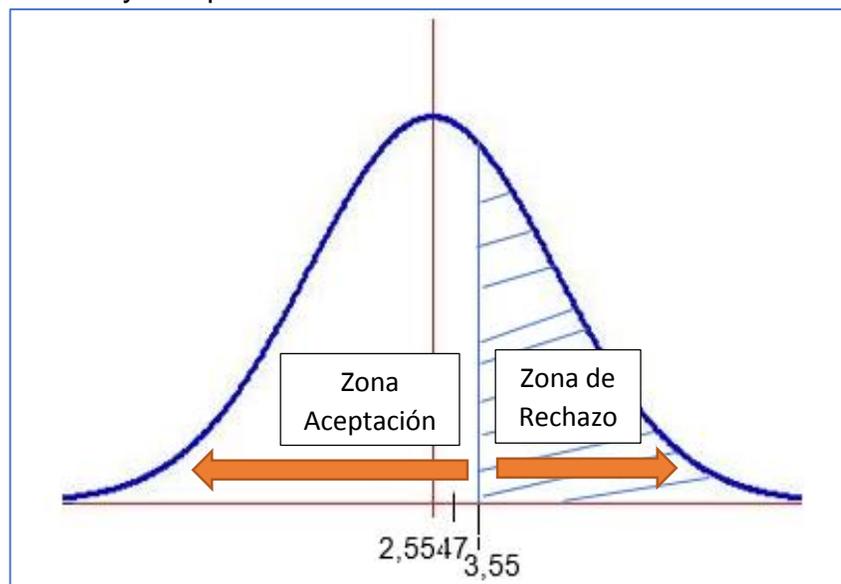
Grafica 3. Distribución F, factor concentración de enzima.



Grafica 4. Distribución F, factor tiempo de hidrólisis.



Grafica 5. Distribución F, interacción concentración de enzima y tiempo de hidrólisis



De acuerdo con las gráficas 3, 4 y 5 se observa que las hipótesis H_0 para el factor A=No hay efecto del cambio de concentración de la enzima Xilanasa en la concentración de azúcares reductores(xilosa) y H_0 para el factor B=No hay efecto del cambio de tiempo de hidrólisis enzimática en la concentración de azúcares reductores (xilosa) son rechazadas, al quedar el valor calculado de distribución F dentro de la zona de rechazo, mientras que la hipótesis H_0 correspondiente a la interacción del factor A y B= No hay efecto de la interacción concentración de Xilanasa y tiempo de hidrólisis enzimática en la concentración de azúcares reductores (xilosa) es aceptada, al quedar el valor calculado de distribución F fuera de la zona de rechazo, por lo tanto, según el análisis estadístico de la hidrólisis enzimática, hay efecto de la concentración de enzima y del tiempo de hidrólisis, pero no de la interacción de estos en la concentración de azúcares reductores como variable respuesta, razón por la que se observa que la concentración de enzima de 4,5%p/p y tiempo de hidrólisis 2 días son las mejores condiciones de hidrólisis.

4.7 FERMENTACIÓN

Este proceso tiene como fin la obtención de xilitol, a partir de xilosa; a través de levaduras del genero *Candida*, en este caso, *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis*, ya que, "las especies que han reportado mayores productividades y rendimiento son *Candida tropicalis*, *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus*, *Candida guilliermondii*, *Debaryomyces hansenii* y *Candida parapsilopsis*, fluctuando los

rendimientos de xilitol respecto a la xilosa entre 0,73-0,88% y las productividades entre 1,73 y 3,15g/L*h¹³⁵.

4.7.1 Activación de levaduras. En la imagen 20 se observa como fueron entregadas las levaduras *Candida guilliermondii* y *tropicalis* en medio de cultivo PDA por la colección de microorganismos de la Pontificia Universidad Javeriana. Siendo estas almacenadas en nevera a 4°C hasta su utilización.

Imagen 20. Levaduras de *Candida guilliermondii* CMPUJ H025 y *Candida tropicalis* CMPUJ H029.



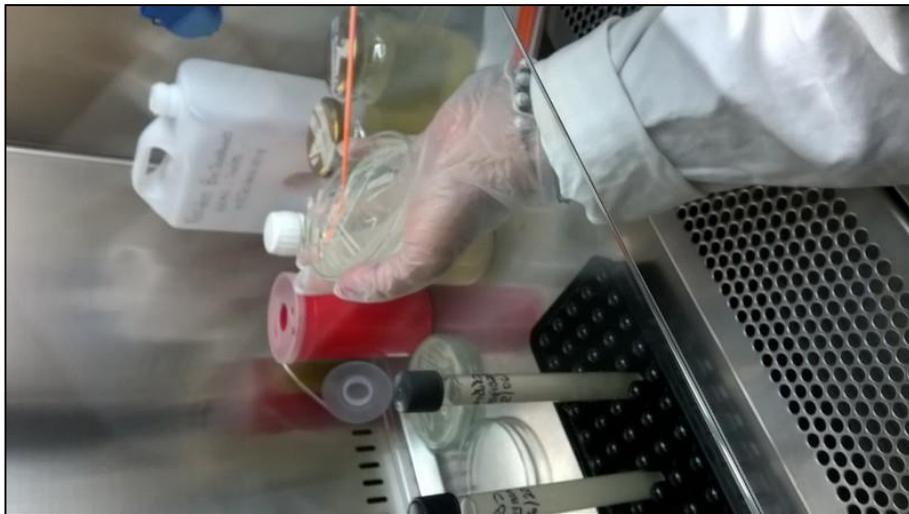
Para la activación de las levaduras es necesario realizar la siembra de las mismas en un medio de cultivo puro y seco, como el que se observa en la imagen 21; esta siembra se realiza tomando una azada de la levadura correspondiente y por el método de agotamiento, como se observa en la imagen 22.

¹³⁵ GONZALEZ, J. ALVAREZ, M. ORNELAS, L. ZAMUDIO, M. Producción y aplicaciones biotecnológicas del Xilitol. Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Morelia; Avenida Tecnológico 1500. C. P. 58120. Morelia, Mich, México. Revista de Biotecnología, Año 2011, Vol. 15 No. 2. P.25

Imagen 21. Medio de cultivo PDA (Agar papa dextrosa) puro y fresco.



Imagen 22. Siembra de levadura *Candida guilliermondii* y *tropicalis* en medio de cultivo PDA respectivo.



Como se puede observar en la imagen 23 la activación de las levaduras se dio correctamente. En el medio que contiene *Candida guilliermondii* se observan colonias húmedas, con apariencia cremosa y color blanco, características macroscópicas comunes de esta. En el medio que contiene *Candida tropicalis* se observan colonias húmedas, con apariencia más cremosa comparado con la *guilliermondii* y color blanco, características macroscópicas comunes de esta.

Imagen 23. *Candida guilliermondii* y *tropicalis* después de tiempo de incubación.



4.7.2 Activación de cepas de *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis* en hidrolizado de piña. El sustrato, en este caso a descomponer son azúcares entre los cuales se encuentran xilosa y glucosa. La activación toma un tiempo de 12 horas a una temperatura de 28°C en una incubadora como se puede observar en la imagen 24, tiempo y temperatura adecuado para garantizar que cada levadura fue inoculada a la totalidad del volumen (200mL) en fase activa de crecimiento y en fase reproductiva en un volumen de caldo previo, de manera que al iniciar la fermentación las levaduras se encuentren en completa viabilidad y crecimiento, impidiendo que se produzca el crecimiento de otros microorganismos, especialmente bacterias.

Posteriormente a este tiempo, el microorganismo se adapta a su nuevo medio de crecimiento. La muestra toma una apariencia cremosa y de tonalidad totalmente blanca como se observa en la imagen 25.

Imagen 24. Incubadora utilizada para garantizar una adecuada temperatura de activación de cepas.

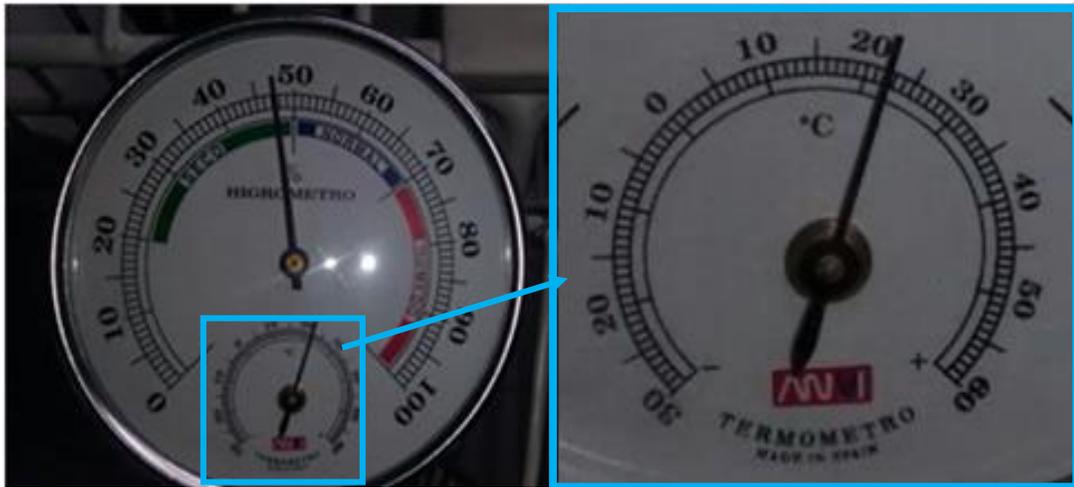


Imagen 25. Activación de levaduras en hidrolizado de piña.



4.7.3 Fermentación. Al momento de empezar el proceso de fermentación en si, lo ideal es que durante la activación se haya presentado la fase de latencia y las levaduras comiencen este proceso en fase exponencial de crecimiento y en fase reproductiva. Este proceso se realizó en el laboratorio clínico García y Asociados S.A.S., laboratorio el cual cuenta en su área de microbiología con un termohigrometro, como el que se puede observar en la imagen 26, con el cual se mide la temperatura tres veces al día (mañana, tarde y noche), garantizándose que la temperatura siempre se encuentre entre un rango de 24-28°C.

Imagen 26. Termohigrometro utilizado para medir la temperatura.



4.7.3.1 Concentración inicial de inóculo. Para dar inicio al proceso de fermentación es necesario ajustar la concentración inicial de cada inóculo de levadura *Candida tropicalis* y *Candida guilliermondii*, como ya se mencionó anteriormente. Se determina la concentración de pre-inóculo y se calcula el volumen necesario de este para preparar 200mL de caldo con una concentración inicial de 1×10^7 células/mL en el montaje de fermentación de cada levadura, como se observa en la imagen 27.

Imagen 27. Montaje fermentación *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis*.



En la tabla 20 y 21 se muestran la cantidad de células contadas en el pre-inóculo de *Candida guilliermondii* y *tropicalis* respectivamente; a continuación, se realizan los cálculos para la determinación del volumen necesario de pre-inóculo para preparar el caldo con la concentración de microorganismo deseada.

Tabla 20. Conteo celular inicial, *Candida guilliermondii*.

Cuadrante	Cuadrante	Cuadrante	Cuadrante	Cuadrante	Total, células
1	2	3	4	5	
12	14	16	14	13	69

Concentración (células/mL):

$$\text{Concentración} = \frac{\text{No. de Células contadas} * \text{Inverso del Factor de dilución}}{\frac{\text{Número de cuadrantes contados}}{25} * \text{Factor de volumen}}$$

$$\text{Concentración} = \frac{\text{No. de células contadas} * \text{Inverso del Factor de dilución}}{\frac{5}{25} * 1 * 10^{-4} \text{mL}^3}$$

$$\text{Concentración} = \frac{\text{No. de células contadas} * \text{Inverso del Factor de dilución}}{2 * 10^{-5}}$$

Invirtiendo:

$$\text{Concentración} \left[\frac{\text{número células}}{\text{mL}} \right] = \frac{\text{No. de células contadas} * 50000}{\text{Factor de dilución}}$$

Concentración celular de *Candida guilliermondii*:

$$\begin{aligned} \text{Concentración} \left[\frac{\text{número células}}{\text{mL}} \right] &= \frac{69 \text{ células} * 50000 \text{mL}^{-1}}{10^{-2}} \\ &= \boxed{3,45 * 10^8 \text{ células/mL}} \end{aligned}$$

Tabla 21. Conteo celular, activación *Candida tropicalis*.

Cuadrante	Cuadrante	Cuadrante	Cuadrante	Cuadrante	Total, células
1	2	3	4	5	
6	8	8	6	9	37

Concentración celular de *Candida tropicalis*:

$$\begin{aligned} \text{Concentración} \left[\frac{\text{número células}}{\text{mL}} \right] &= \frac{37 \text{ células} * 50000 \text{mL}^{-1}}{10^{-2}} \\ &= \boxed{1,85 * 10^8 \text{ células/m}} \end{aligned}$$

Tabla 22. Concentración de células posterior a la activación de levaduras.

Levadura	Conteo	Diluciones	Concentración (células/mL)
<i>guilliermondii</i>	69	2	$3,45 * 10^8$
<i>tropicalis</i>	37	2	$1,85 * 10^8$

Para obtener un caldo de 200 mL con una concentración de 10.000.000 células/mL de *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis* se realizan los siguientes cálculos:

- *Candida guilliermondii*:

$$\begin{aligned} v1 * c1 &= v2 * c2 \\ v1 * 345.000.000 &= 200 \text{mL} * 1 \times 10^7 \end{aligned}$$

$$v1 = 5,80 \text{ mL}$$

Se toman 5,80mL de pre-inóculo y se completa con 194,2mL de caldo de piña estéril

- *Candida tropicalis*:

$$v1 * c1 = v2 * c2$$
$$v1 * 185.000.000 = 200\text{mL} * 1 \times 10^7$$
$$v1 = 10,80 \text{ mL}$$

Se toman 10,80mL de pre-inóculo y se completa con 189,2mL de caldo de piña estéril.

4.7.3.2 Coloración Gram. Al realizar la coloración Gram se observa que no se desarrollan impurezas y tampoco hay presencia de microorganismos no deseados, esto se puede evidenciar en las imágenes 28 y 29.

Imagen 28. Coloración Gram *Candida guilliermondii* pre-inoculada.

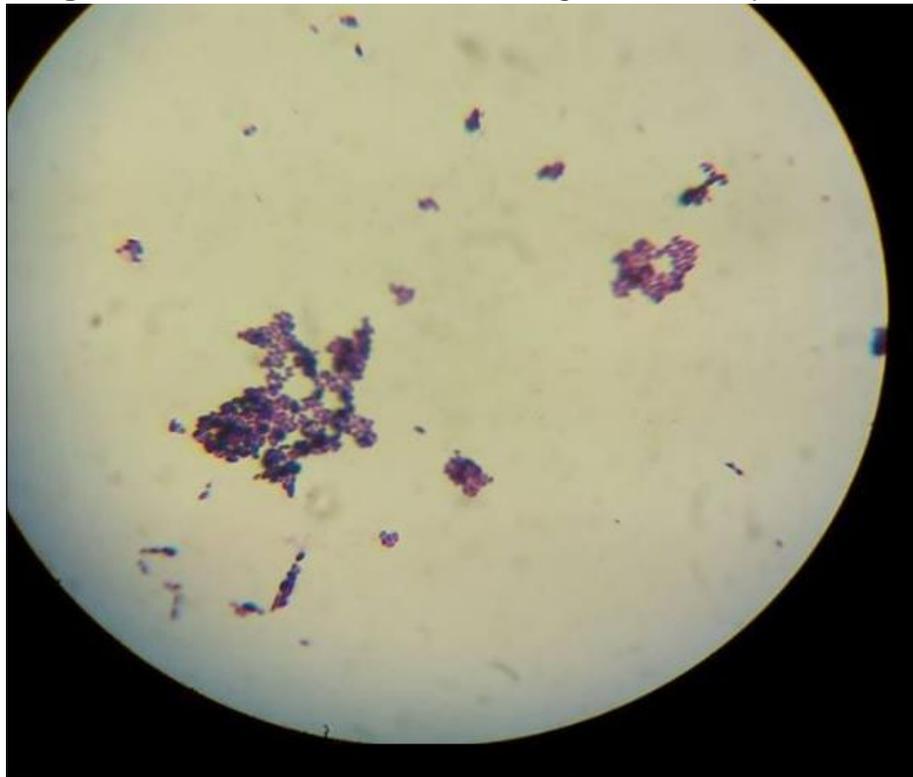


Imagen 29. Coloración Gram *Candida tropicalis* pre-inoculada.

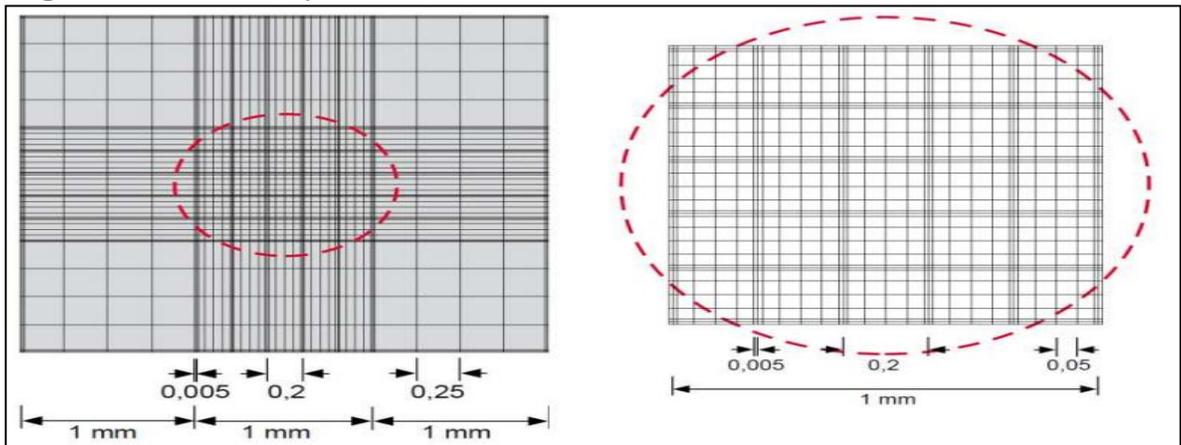


4.7.3.3 Seguimiento microscópico del crecimiento de levaduras. A continuación, se presenta la muestra de cálculo para determinar la concentración celular del crecimiento de levaduras dado en las dos fermentaciones, cada una con dos réplicas técnicas en el momento de realizar los conteos. En las curvas de crecimiento, se observan las fases de desarrollo de cada levadura y se determina el tiempo al cual se detiene el crecimiento microbiano de cada levadura.

La totalidad de células contadas por medio de cámara Neubauer para cada fermentación y cada una de sus réplicas en intervalos de 12 horas se muestran en los anexos 10 y 11; en el tiempo cero la concentración de las dos levaduras es de 1×10^7 células/mL, concentración inicial.

El conteo es realizado en cinco cuadrantes del cuadrado central de la cámara Neubauer que está conformado por 25 cuadrados en total, los cinco cuadrantes utilizados son los de cada vértice y el cuadrante central. La cámara tiene una medida de 3x3 mm, constituida por 9 cuadrantes grandes en total, cada uno de estos con una medida de 1x1 mm como se muestra en la figura 19, resaltando el cuadrante utilizado para la realización de conteos.

Figura 19. Cuadrilla y medidas de la cámara de Neubauer.



Fuente: INIBIOMA, curso teórico-práctico sobre microscopía y recuento de levaduras para productores de cerveza. Bariloche, Argentina. Disponible en: <http://www.somoscervecedores.com/wp-content/uploads/2014/11/Teorica-Curso-Microscopio-La-Plata-2014-V5.pdf>.

Cada uno de los cinco cuadrantes tiene una superficie de $0,04 \text{ mm}^2$, se tiene una profundidad de $0,1 \text{ mm}$; que corresponde a la distancia encontrada entre la cámara y el portaobjetos, por lo tanto, el volumen total de conteo celular es el siguiente:

$$\text{Volumen total} = \text{cuadrantes utilizados} * \text{profundidad} * \text{superficie cuadrante}$$

$$\text{volumen total} = 5 * 0,1\text{mm} * 0,2 \text{ mm} * 0,2 \text{ mm}$$

$$\text{volumen total} = 0,02 \text{ mm}^3 = 0,00002\text{mL}$$

4.7.3.3.1 Concentración celular *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis* durante la fermentación. Para determinar la concentración celular en cada intervalo de tiempo, se utiliza la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{células}}{\text{mL}} = \frac{\text{No. de células contadas}}{\text{Factor de dilución} * \text{Volumen total}}$$

A continuación, se realiza una muestra de cálculo para la determinación de la concentración celular de la primera réplica técnica de *Candida guilliermondii* a las 12 horas de fermentación.

$$\frac{\text{células}}{\text{mL}} = \frac{61 \text{ células}}{10^{-2} * 0,00002\text{mL}} = 3,05 \times 10^8 \text{ células/mL}$$

En la tabla 23, se observan todos los valores obtenidos de concentración celular durante el proceso de fermentación de la levadura *Candida guilliermondii*, con su correspondiente replica.

Tabla 23. Concentración de células en la fermentación con *Candida guilliermondii*.

Tiempo (hora)	Réplica técnica	No. de células contadas	Diluciones	Concentración (células/mL)	Log células/mL
0	R.1	-----	-----	$1,00 \cdot 10^7$	7,00
	R.2	-----	-----	$1,00 \cdot 10^7$	7,00
	R.3	-----	-----	$1,00 \cdot 10^7$	7,00
12	R.1	61	2	$3,05 \cdot 10^8$	8,48
	R.2	58	2	$2,90 \cdot 10^8$	8,46
	R.3	59	2	$2,95 \cdot 10^8$	8,47
24	R.1	63	2	$3,15 \cdot 10^8$	8,50
	R.2	60	2	$3,00 \cdot 10^8$	8,48
	R.3	52	2	$2,60 \cdot 10^8$	8,41
36	R.1	64	2	$3,20 \cdot 10^8$	8,51
	R.2	62	2	$3,10 \cdot 10^8$	8,49
	R.3	53	2	$2,65 \cdot 10^8$	8,42
48	R.1	73	2	$3,65 \cdot 10^8$	8,56
	R.2	82	2	$4,10 \cdot 10^8$	8,61
	R.3	71	2	$3,55 \cdot 10^8$	8,55
60	R.1	73	2	$3,65 \cdot 10^8$	8,56
	R.2	87	2	$4,35 \cdot 10^8$	8,64
	R.3	76	2	$3,80 \cdot 10^8$	8,58
72	R.1	99	2	$4,95 \cdot 10^8$	8,69
	R.2	97	2	$4,85 \cdot 10^8$	8,69
	R.3	97	2	$4,85 \cdot 10^8$	8,69
84	R.1	95	2	$4,75 \cdot 10^8$	8,68
	R.2	95	2	$4,75 \cdot 10^8$	8,68
	R.3	96	2	$4,80 \cdot 10^8$	8,68
96	R.1	91	2	$4,55 \cdot 10^8$	8,66
	R.2	88	2	$4,40 \cdot 10^8$	8,64
	R.3	92	2	$4,60 \cdot 10^8$	8,66

En la tabla 24, se observan todos los valores obtenidos de concentración celular durante el proceso de fermentación de la levadura *Candida tropicalis*, con su correspondiente replica.

Tabla 24. Concentración de células en la fermentación con *Candida tropicalis*.

Tiempo (hora)	Réplica técnica	conteos	diluciones	Concentración (células/mL)	Log células/mL
0	R.1	-----	-----	$1,00 \cdot 10^7$	7,00
	R.2	-----	-----	$1,00 \cdot 10^7$	7,00
	R.3	-----	-----	$1,00 \cdot 10^7$	7,00
12	R.1	46	2	$2,30 \cdot 10^8$	8,36
	R.2	48	2	$2,40 \cdot 10^8$	8,38
	R.3	48	2	$2,40 \cdot 10^8$	8,38
24	R.1	57	2	$2,85 \cdot 10^8$	8,45
	R.2	54	2	$2,70 \cdot 10^8$	8,43
	R.3	56	2	$2,80 \cdot 10^8$	8,45
36	R.1	57	2	$2,85 \cdot 10^8$	8,45
	R.2	61	2	$3,05 \cdot 10^8$	8,48
	R.3	58	2	$2,90 \cdot 10^8$	8,46
48	R.1	71	2	$3,55 \cdot 10^8$	8,55
	R.2	66	2	$3,30 \cdot 10^8$	8,52
	R.3	59	2	$2,95 \cdot 10^8$	8,47
60	R.1	70	2	$3,50 \cdot 10^8$	8,54
	R.2	73	2	$3,65 \cdot 10^8$	8,56
	R.3	72	2	$3,60 \cdot 10^8$	8,56
72	R.1	85	2	$4,25 \cdot 10^8$	8,63
	R.2	93	2	$4,65 \cdot 10^8$	8,67
	R.3	88	2	$4,40 \cdot 10^8$	8,64
84	R.1	92	2	$4,60 \cdot 10^8$	8,66
	R.2	88	2	$4,40 \cdot 10^8$	8,64
	R.3	87	2	$4,35 \cdot 10^8$	8,64
96	R.1	88	2	$4,40 \cdot 10^8$	8,64
	R.2	85	2	$4,25 \cdot 10^8$	8,63
	R.3	83	2	$4,15 \cdot 10^8$	8,62

“La mayoría de levaduras se reproducen asexualmente por gemación, en este proceso se forma una pequeña protuberancia en la periferia de la célula, esta protuberancia se agranda hasta alcanzar casi el tamaño de la célula madre al irse llenando de material citoplasmático de esta. El material nuclear se replica por mitosis y una parte pasa a la célula hija, luego se forma la pared que divide las dos células y la célula hija se desprende de la célula madre”¹³⁶.

Las levaduras presentan dos fases de vida, la trofofase en la que los microorganismos crecen de forma logarítmica, donde inicialmente la célula consume nutrientes y genera un crecimiento celular en tamaño, para que luego el microorganismo presente gemación y la idiofase, fase que corresponde a la producción de metabolitos secundarios, donde el microorganismo no crece, pero sigue metabólicamente activo¹³⁷.

La trofofase y la idiofase son fases equivalentes a las fases de crecimiento en un sistema cerrado en medio líquido como son la fase de latencia; en la que el microorganismo se adapta al medio para crecer, fase exponencial; en la que las células presentan su mayor actividad metabólica presentando un crecimiento logarítmico, fase estacionaria; aquella donde el número de muertes microbianas compensa el de células nuevas y la población se estabiliza y por último la fase de muerte, en la que el número de muertes supera el número de nuevas células formadas¹³⁸.

En las gráficas 6, 7 y 8, se muestra la curva de crecimiento de la levadura *Candida guilliermondii*, en el proceso de fermentación, utilizando como sustrato caldo hidrolizado de piña. La fase de latencia no es notoria, ya que, para la preparación del crecimiento del microorganismo y adaptación al nuevo medio, es decir, la pre-inoculación, se traspasó una azada, desconociéndose la concentración de microorganismo inicial utilizado; después de cumplidas las 12 horas de adaptación, se realiza el conteo respectivo del pre-inóculo comenzando la fermentación con una concentración inicial de levadura de 1×10^7 células/mL. En las 3 gráficas, se observa que el crecimiento microbiano fue notorio a las 12 horas de tratamiento, cumpliéndose satisfactoriamente la fase de crecimiento exponencial.

¹³⁶ GARCIA, Vera. Introducción a la microbiología. Reproducción levaduras. 2 ed. San José, Costa Rica: editorial EUNED, 2004. P 109.

¹³⁷ MATEOS, Pedro. Producción industrial de metabolitos secundarios. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Pedro_Mateos2/publication/261983344_Produccion_Industrial_de_Metabolitos_Secundarios/links/Odeec5360d3a08a9fc000000/Produccion-Industrial-de-Metabolitos-Secundarios.pdf

¹³⁸ TORTORA, Gerard., CASE, Christine y FUNKE, Berdell. introducción a la microbiología. Fases de crecimiento. 9 ed. Madrid: editorial medica panamericana. S.A, 2007. P 177.

Grafico 6. Curva de crecimiento *Candida guilliermondii*, primera réplica técnica de fermentación.

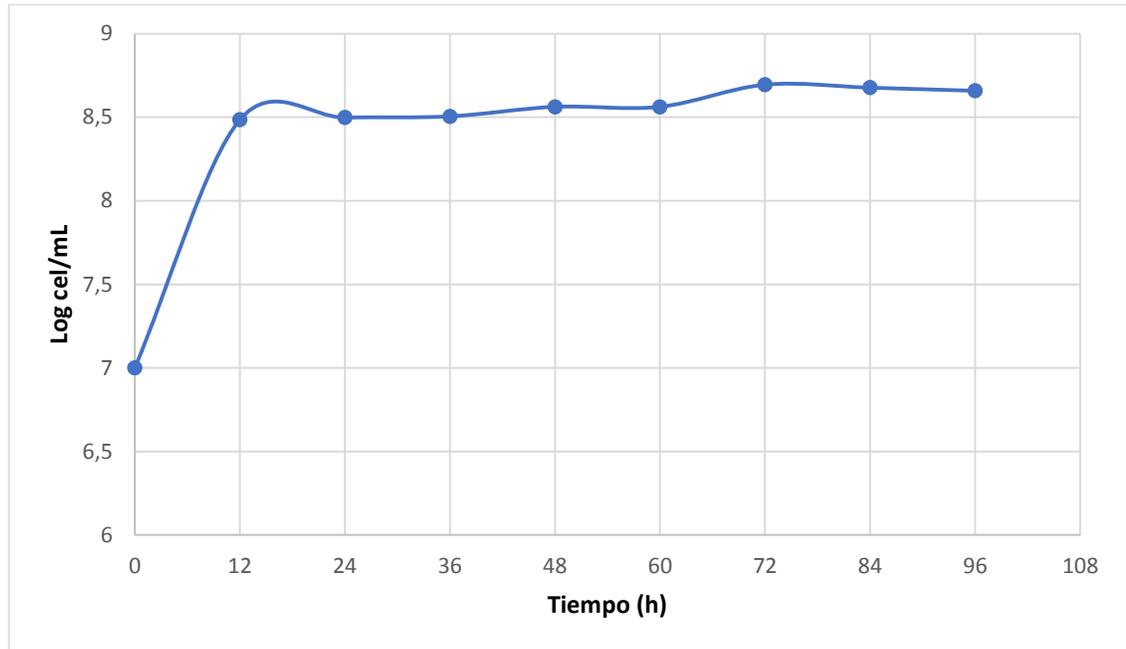


Grafico 7. Curva de crecimiento *Candida guilliermondii*, segunda réplica técnica de fermentación.

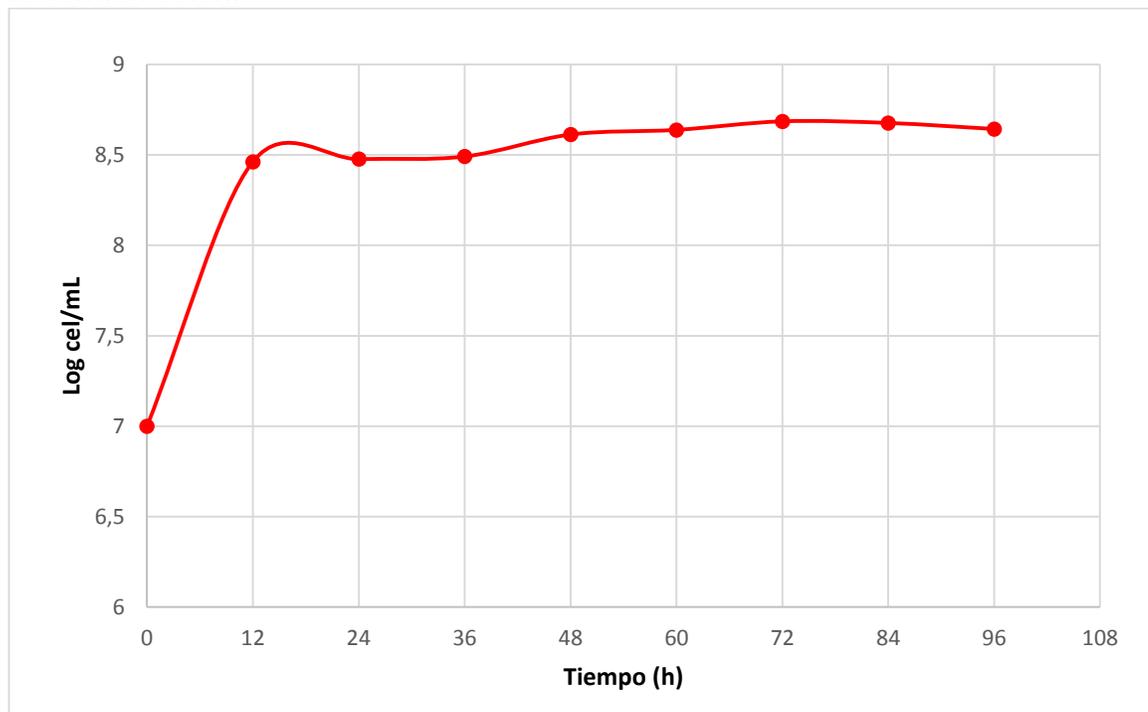
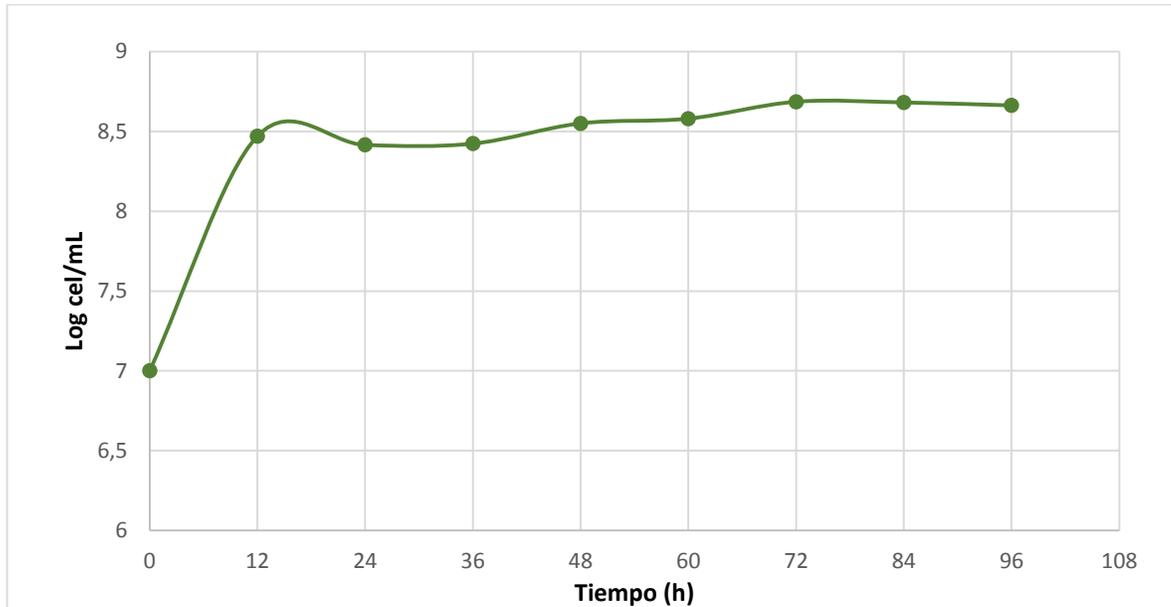


Grafico 8. Curva de crecimiento *Candida guilliermondii*, tercera réplica técnica de fermentación.



En las gráficas 9, 10 y 11, se muestra la curva de crecimiento de la levadura *Candida tropicalis*, en el proceso de fermentación, utilizando como sustrato caldo hidrolizado de piña, al igual que en la levadura *Candida guilliermondii*. La fase de latencia no es notoria, ya que al igual que para la levadura *Candida guilliermondii*, para la pre-inoculación, se traspasó una azada, desconociéndose la concentración de microorganismo inicial utilizado; después de cumplidas las 12 horas de adaptación, se realiza el conteo respectivo del pre-inóculo comenzando la fermentación con una concentración inicial de levadura de 1×10^7 células/mL. En las 3 gráficas, se observa que el crecimiento microbiano fue notorio en el rango de tiempo de 0 a 18 horas aproximadamente de tratamiento, lo cual, representa la fase de crecimiento exponencial.

Concluyendo que para las dos levaduras utilizadas; durante la fase exponencial, el medio de cultivo proporcionó los requerimientos que necesitaba la levadura para su crecimiento; además de poseer las condiciones adecuadas de temperatura, aireación y agitación. Después de 17-18 horas aproximadamente, se puede observar el comienzo de la fase estacionaria, en la cual, el número de células se vuelve constante; estableciéndose un equilibrio entre el número de células que mueren y el número de células que se forman, esto se presenta debido a factores como, el descenso de nutrientes, la falta de espacio y oxígeno, y la acumulación de productos metabólicos tóxicos. No es notoria una fase de muerte, ya que se finalizó el proceso de fermentación a las 96 horas.

Grafico 9. Curva de crecimiento *Candida tropicalis*, primera réplica técnica de fermentación.

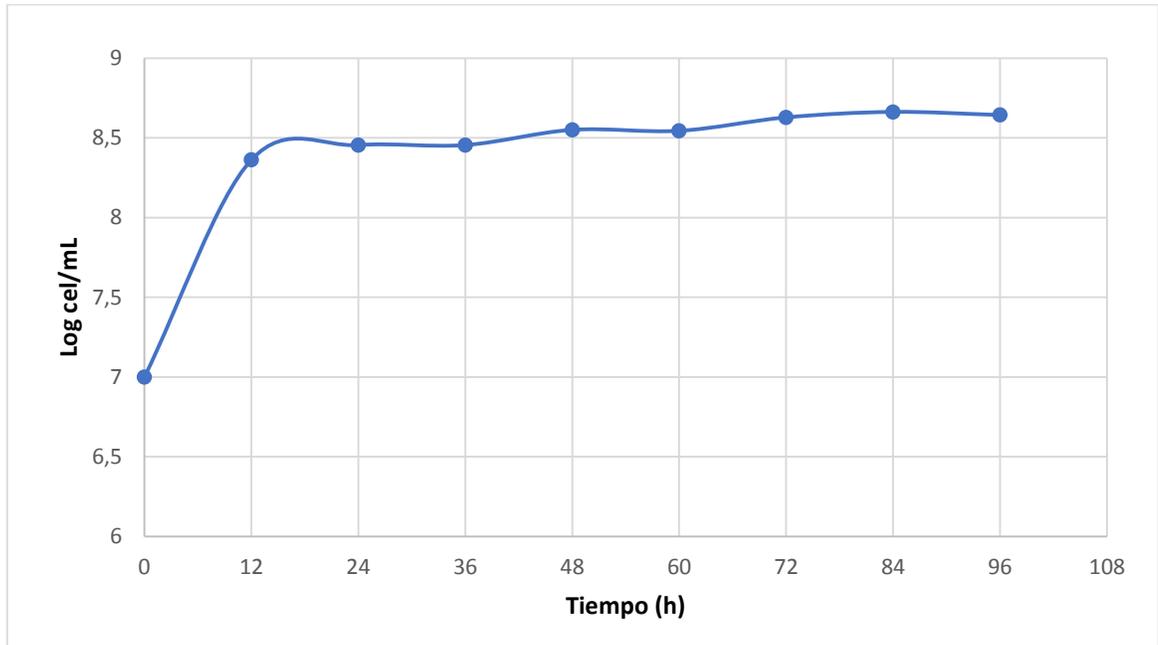


Grafico 10. Curva de crecimiento *Candida tropicalis*, segunda réplica técnica de fermentación.

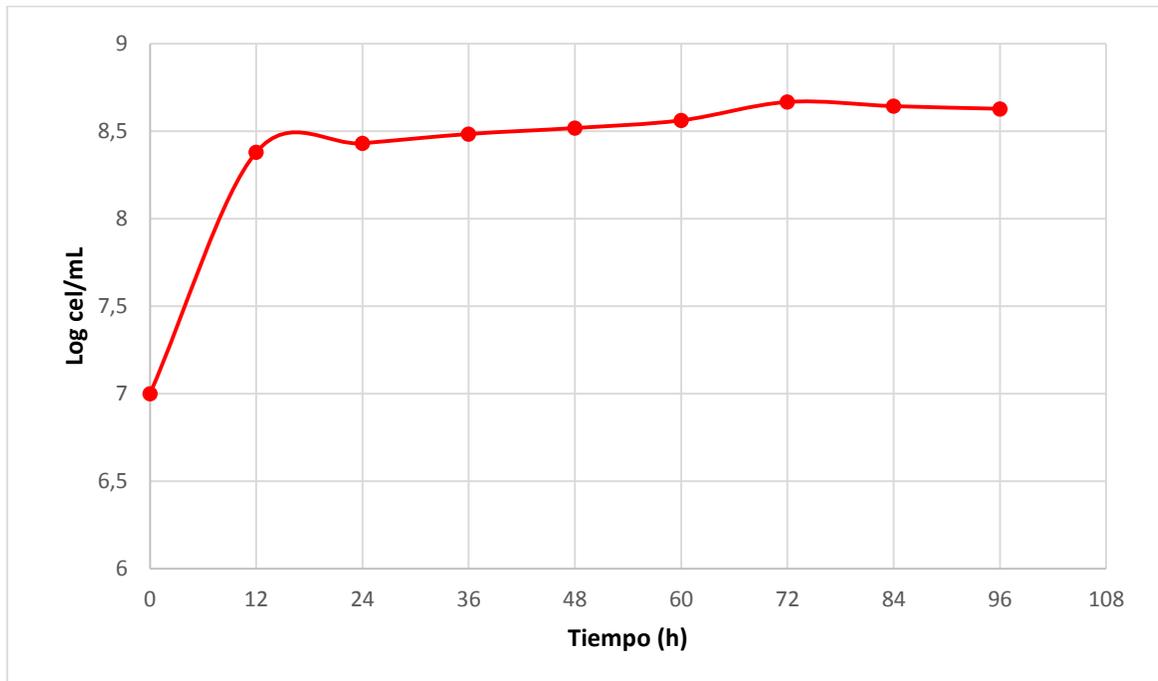
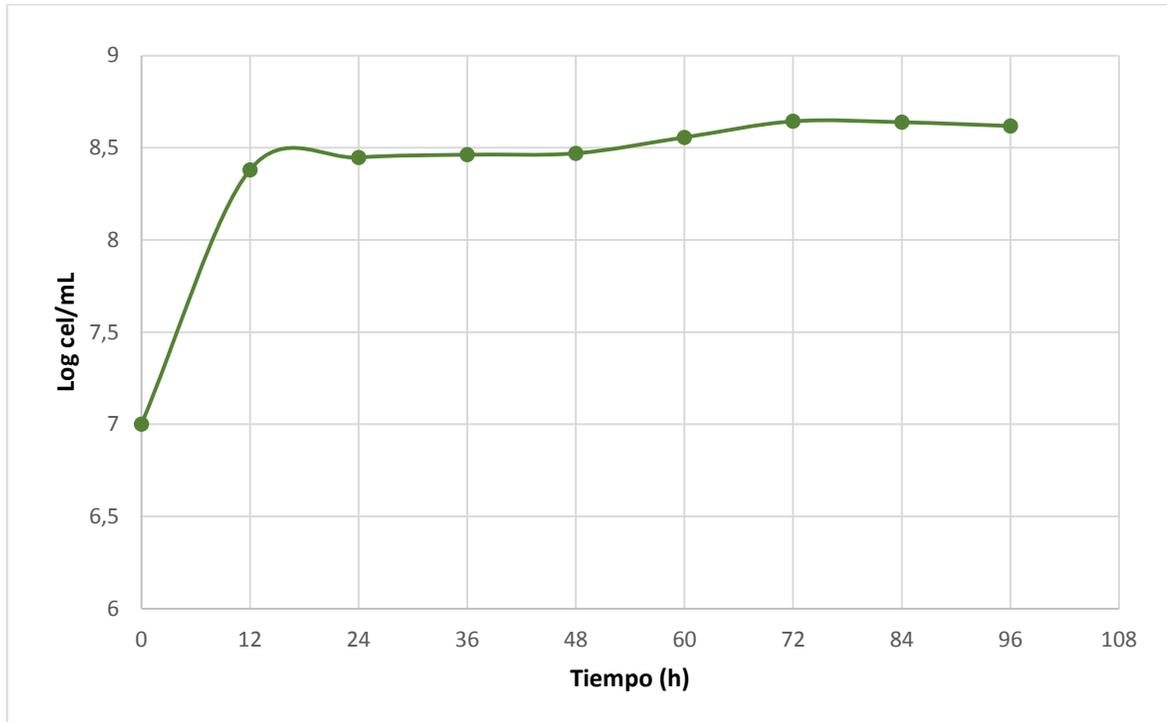


Grafico 11. Curva de crecimiento *Candida tropicalis*, tercera réplica técnica de fermentación.



Comparando el crecimiento presentado por las levaduras *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis*; se puede observar que, a las 17-18 horas, tiempo aproximado en el cual finaliza la fase exponencial de las dos levaduras, se presenta un mayor crecimiento microbiano de la levadura *Candida guilliermondii*. Realizando un promedio entre las réplicas de los conteos realizados, para cada levadura, a las 12 horas, el número de células de *Candida guilliermondii* era $2,96 \cdot 10^8$ células/mL y el de *Candida tropicalis* de $2,36 \cdot 10^8$ células/mL, presentando una diferencia de 0,62 células/mL, pudiendo confirmar que el crecimiento de la *Candida guilliermondii* fue mayor. En cuanto a la fase estacionaria, las dos levaduras presentan concentraciones que no varían de forma significativa. Realizando un promedio entre las réplicas de los conteos realizados, para cada levadura, a las 96 horas; el número de células de *Candida guilliermondii* era $4,51 \cdot 10^8$ células/mL y el de *Candida tropicalis* de $4,26 \cdot 10^8$ células/mL. Concluyendo que las condiciones del medio, temperatura, aireación y agitación los cuales fueron factores controlados, favorecieron de mejor manera el crecimiento de la levadura *Candida guilliermondii*, por lo cual, se espera un mayor rendimiento en la producción de xilitol en esta fermentación.

A partir del segundo día de fermentación en intervalos de 24 horas se realiza un seguimiento de la pureza del proceso de fermentación de cada levadura mediante la coloración Gram, como se observa en la imagen 30. se pudo observar a través del microscopio que durante el proceso de fermentación no hubo contaminación del hidrolizado, es decir, la esterilización de los recipientes e hidrolizado cumplió con su fin y las condiciones del ambiente externo no afectaron el proceso; pudiéndose dar el crecimiento de las levaduras de la manera esperada.

Imagen 30. Procedimiento tinción de Gram.



4.8 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCION HPLC

En las imágenes 31 y 32, correspondientes a los cromatogramas de la muestra fermentada con *Candida guilliermondii* se observa que no se detecta ninguna concentración de xilitol, de igual forma se observa en las imágenes 33 y 34 correspondientes a los cromatogramas de la muestra fermentada con *Candida tropicalis*. Estos resultados se deben a diferentes factores involucrados durante el desarrollo experimental, principalmente en el proceso de pretratamiento químico, hidrólisis enzimática y fermentación. En el anexo M se observa la recta patrón de xilitol, estándar utilizado para la determinación de este.

Imagen 31. Cromatografía HPLC. Muestra fermentada con *Candida guilliermondii*.

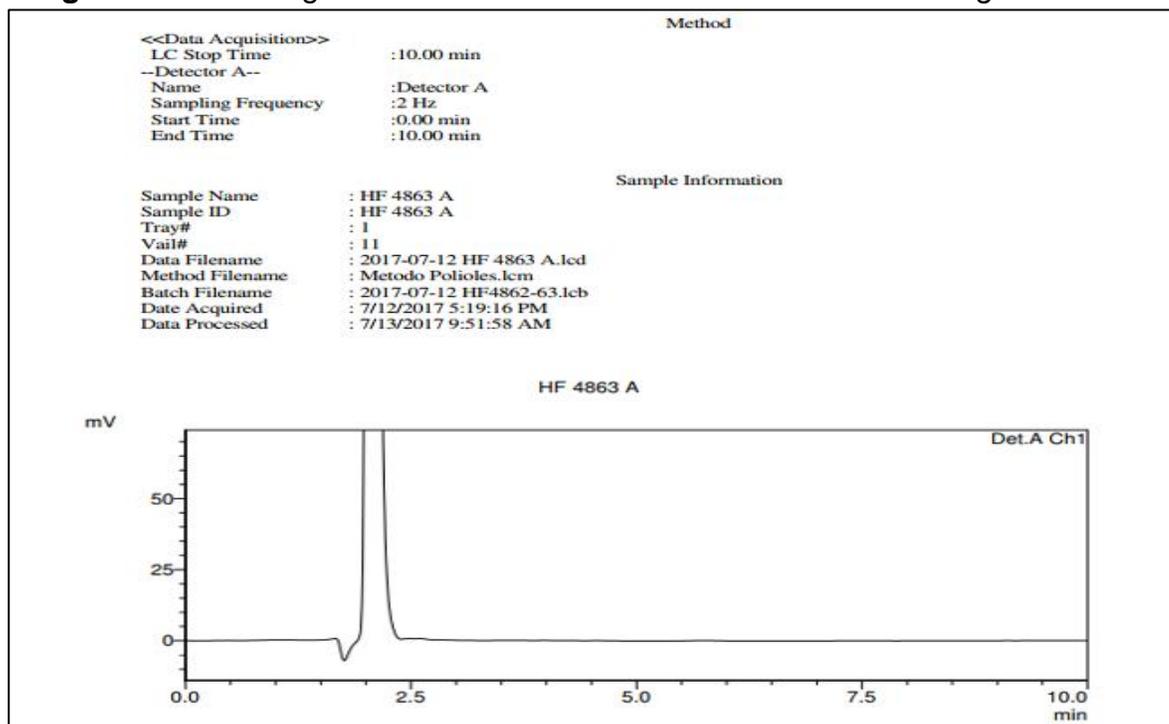


Imagen 32. Réplica cromatografía HPLC. Muestra fermentada con *Candida guilliermondii*.

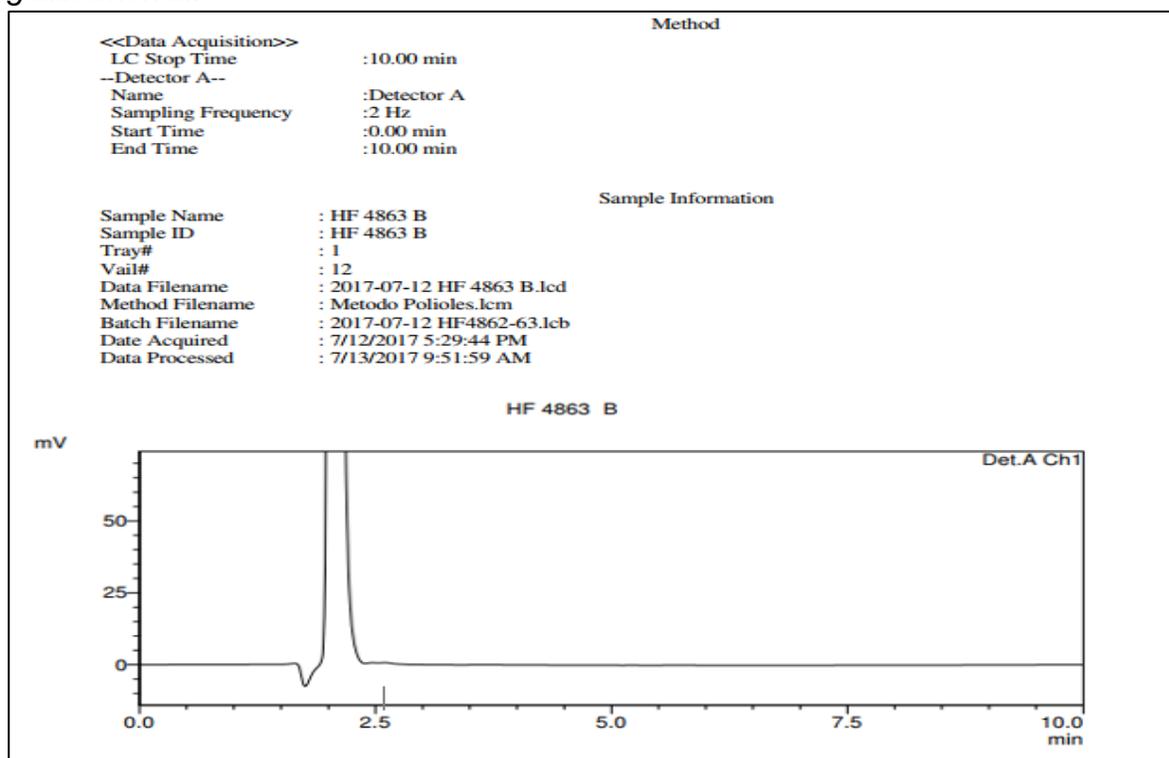


Imagen 33. Cromatografía HPLC. Muestra fermentada con *Candida tropicalis*.

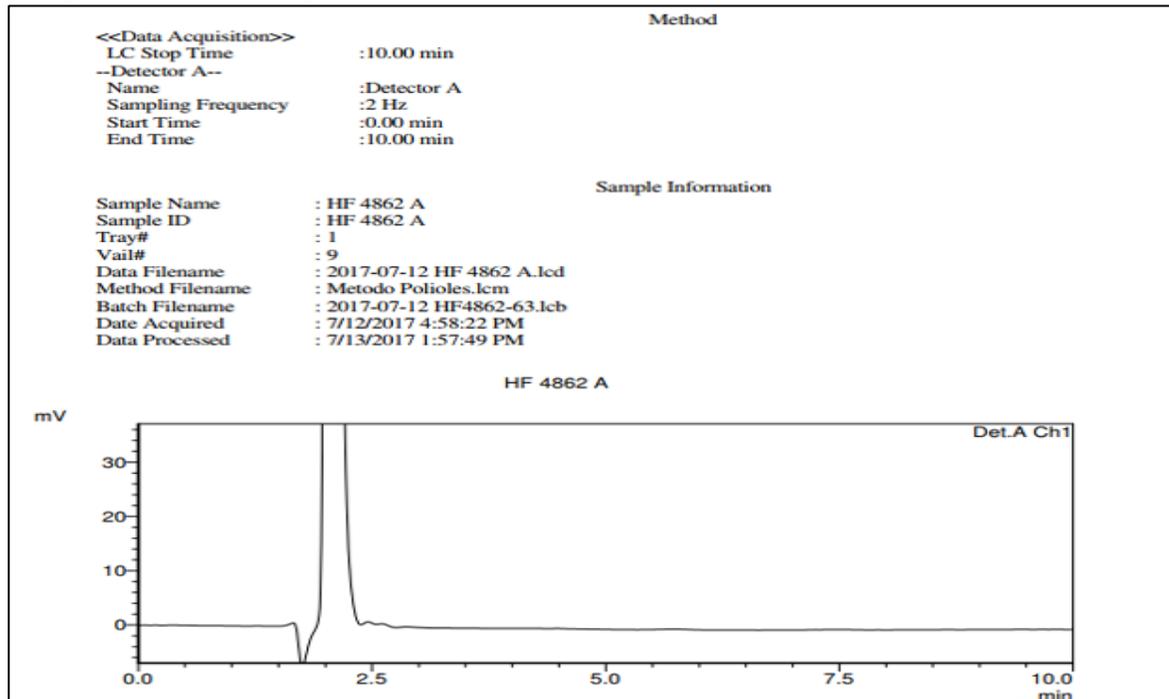
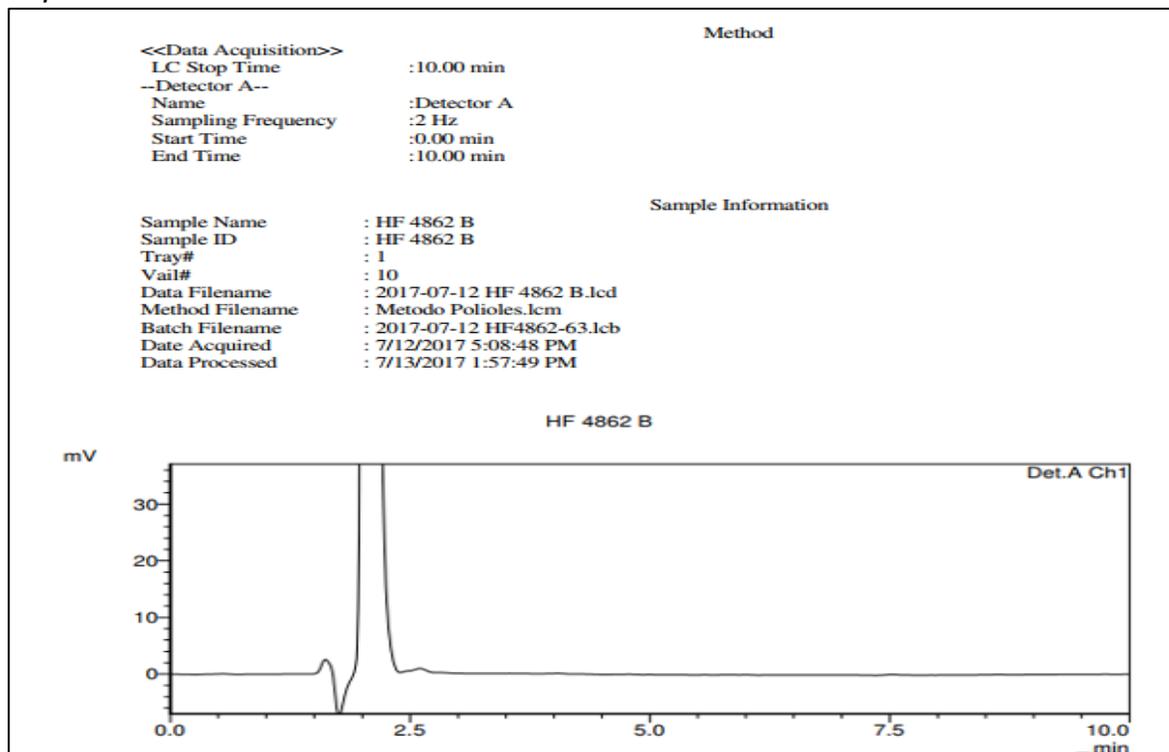


Imagen 34. Réplica cromatografía HPLC. Muestra fermentada con *Candida tropicalis*.



En la tabla 25 se muestra el informe concluyente de determinación de xilitol, donde se observa de manera explícita que no se detectó concentración alguna de este polirol, razón por la cual no fue posible el desarrollo y cumplimiento del último objetivo de esta investigación, que corresponde a la comparación de rendimientos de cada especie de levadura en el proceso de bioconversión de xilosa a xilitol, por lo tanto, es necesario realizar un análisis de los posibles problemas presentados.

Tabla 25. Resultados cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

INFORME DE RESULTADOS No. 430							
Código LIAC	Matriz	Método/Referencia	Unidades	Resultado	Rango Normatividad	Fecha Análisis	Observaciones
4862	ALIMENTOS HUMANOS	Poliroles – AOAC HPLC IR/Cromatografía Líquida	mg/L	No detectado	NA	13/07/2017	
4863	ALIMENTOS HUMANOS	Poliroles – AOAC HPLC IR/Cromatografía Líquida	mg/L	No detectado	NA	13/07/2017	

4.9 ANÁLISIS DE FACTORES DE IMPEDIMENTO PRESENTADOS EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL

A continuación, se realiza un análisis detallado de los posibles factores que impidieron la síntesis biotecnológica de xilitol, estudiando los principales procesos de experimentación realizados.

4.9.1 Deslignificación de fibra mediante inmersión en solución de NaOH. “Los tratamientos basados en la utilización de alcalinos se dirigen tanto a las fracciones de lignina como de hemicelulosa, durante esta operación se degrada cantidad significativa de hemicelulosa, ya que el principal efecto del tratamiento álcali es el aumento de la digestibilidad de celulosa”¹³⁹. Es posible que haya ocurrido la disminución de hemicelulosa y un aumento significativo de celulosa en el pretratamiento químico (hidrólisis alcalina), como se dio en los resultados obtenidos en el estudio llamado “Efectos de los tratamientos de hidrólisis ácida e hidrólisis alcalina en la estructura del bagazo de malta para liberación de fibras de celulosa” realizado por Mussato, S; Dragone, G; Fernandes, M; Rocha, G; y Roberto, I¹⁴⁰; en

¹³⁹DA SILVA, Op. Cit., P 21.

¹⁴⁰ MUSSATO, S; DRAGONE, G; FERNANDES, M; ROCHA, G; Y ROBERTO, I. Efectos de los tratamientos de hidrólisis ácida e hidrólisis alcalina en la estructura del bagazo de malta para liberación de fibras de celulosa. Escola de Engenharia de Lorena – Departamento de Biotecnología (Universidade de São Paulo – EEL - USP) Estrada Municipal do Campinho s/no, CEP: 12602-810, Lorena/SP – Brasil. 2006. Disponible en:

el cual, se somete el bagazo de malta a una reacción alcalina empleando NaOH 2%p/v a 120°C por 90min, condiciones similares a las cuales fue sometida la cáscara de piña. A continuación, en la tabla 26 se muestran los resultados obtenidos en el estudio mencionado.

Tabla 26. Composición química del bagazo de malta en la forma original y de las pulpas obtenidas después de cada proceso para liberación de las fibras de celulosa.

	Bagazo de malte original	Pulpa 1	Pulpa 2	Pulpa 3
Componente (% p/p)				
Celulosa	16,8	34,0	54,3	90,5
Hemicelulosa	28,4	7,9	20,4	1,1
Lignina	27,8	49,2	14,4	8,2
Otros ^(a)	27,0	8,9	10,9	0,2
Rendimiento de recuperación (% p/p)	-	48,6	30,1	16,3 ^(b)

Pulpa 1: obtenida después de la hidrólisis ácida del bagazo de malta; Pulpa 2: obtenida después de la hidrólisis alcalina del bagazo de malta; Pulpa 3: obtenida después de la secuencia de hidrólisis ácida y alcalina del bagazo de malta.

FUENTE: MUSSATO, S; DRAGONE, G; FERNANDES, M; ROCHA, G; Y ROBERTO, I. Efectos de los tratamientos de hidrólisis ácida e hidrólisis alcalina en la estructura del bagazo de malta para liberación de fibras de celulosa. Escola de Engenharia de Lorena – Departamento de Biotecnología (Universidade de São Paulo – EEL - USP) Estrada Municipal do Campinho s/no, CEP: 12602-810, Lorena/SP – Brasil. 2006.

En este caso, el resultado de interés es la pulpa 2, muestra que fue sometida a hidrólisis alcalina; como se puede observar en la tabla 26, la hemicelulosa disminuye su concentración de 28,4%p/p a un 20,4%p/p y hay un aumento significativo de celulosa, de aproximadamente 3 veces su concentración inicial.

En el caso de la presente investigación al existir la posibilidad de haberse presentado esta disminución de hemicelulosa y aumento de celulosa, impide que se presente de manera adecuada la descomposición de hemicelulosa por parte de

https://www.researchgate.net/profile/Solange_Mussatto/publication/271471784_Efecto_de_los_tratamientos_de_hidrolisis_acida_y_hidrolisis_alcalina_en_la_estructura_del_bagazo_de_malta_para_liberacion_de_fibras_de_celulosa/links/54c8b8a60cf238bb7d0e37d4/Efecto-de-los-tratamientos-de-hidrolisis-acida-y-hidrolisis-alcalina-en-la-estructura-del-bagazo-de-malta-para-liberacion-de-fibras-de-celulosa.pdf

la enzima Xilanasa, dado que el hidrolizado obtenido del pretratamiento químico, contiene altas cantidades de un producto no deseado (celulosa), lo cual dificulta la accesibilidad que tiene la enzima a la hemicelulosa. “A pesar de que la hidrólisis alcalina es considerada un proceso eficiente para remoción de la lignina, ella no promueve una separación selectiva de esa fracción, pudiendo también causar la degradación de los carbohidratos, principalmente de la hemicelulosa”¹⁴¹.

Según Yiqing¹⁴² el pretratamiento en medio alcalino presenta desventajas como lo son, la pérdida inevitable de un 30 a 35% de la materia seca inicial.

Da silva¹⁴³ menciona que otro efecto ocurrido en etapa de pretratamiento se debe a los agentes alcalinos (NaOH) utilizados, estos dificultan el proceso de bioconversión, debido a que los compuestos derivados de la lignina, aquellos que quedan presentes en el momento de su rompimiento, son usualmente inhibidores del crecimiento celular microbiano; dañando la membrana permeable, razón por la cual el crecimiento de levaduras no fue el realmente esperado. A causa de las condiciones operativas de pretratamiento, también existe la posibilidad de que se presente la formación de productos de degradación a partir de azúcares, como son los derivados de furanos, compuestos carboxílicos, ácidos alifáticos, furfural, sales orgánicas y en menor cantidad de lignina como son los compuestos fenólicos, que inhiben los procesos de fermentación, lo que conllevó a la no producción de xilitol, estos últimos principalmente, son perjudiciales, cuanto menor es su peso molecular, más letales son para los microorganismos, por lo anterior se requiere de tratamientos de desintoxicación previos.

4.9.2 Hidrólisis enzimática. la degradación de hemicelulosa fue la etapa esencial de investigación, a continuación, se mencionan los principales inconvenientes e impedimentos presentados, aquellos que limitaron la realización exitosa y el desarrollo de los dos últimos objetivos de este proyecto.

Básicamente el factor que ocasionó nulos resultados en la producción de xilitol se debe a la ausencia de la acción sinérgica de enzimas (hemicelulasas) y por ende de actividades enzimáticas, “estas enzimas actúan en conjunto, ya que la actividad endoxilanasas es altamente dependiente de la presencia de enzimas desramificadoras y viceversa”¹⁴⁴.

¹⁴¹ FENGEL, D. WEGENER, G. Wood. Chemistry, Ultrastructure, Reactions. New York. Walter de Gruyter. 1989.

¹⁴² YIQING, Y, MUÍAN, H, YUBING, R, LIYING, M, AND YANG, L. Anaerobic digestion of poplar processing residues for methane production after alkaline treatment. Bioresource Technology.2012. p.347-352.

¹⁴³ DA SILVA, Op. Cit., P 10.

¹⁴⁴ DA SILVA, Op. Cit., P 25.

La combinación de hemicelulasas en forma simultánea se refleja en una etapa de hidrólisis completa y de conversión de fibra adecuada, aumentando la posibilidad de lograr los resultados requeridos, cuyo rendimiento de xilosa es valorado. La hidrólisis de hemicelulosa necesita de un sistema de enzimas hidrolíticas degradadoras de xilanos, componente de mayor abundancia en aquel polímero de interés. El uso de una única enzima como fue la endo-1,4- β -D-xilanasas, cuyo nombre comercial de la enzima empleada es xilanasas AN 20 no fue viable, esta enzima “actúa sobre la cadena de xilano al azar, disminuyendo el grado de polimerización con liberación de xilooligosacáridos, xilobiosa y xilosa”¹⁴⁵. Al obtenerse xilooligosacáridos no digeribles, se obtienen cadenas de 2 a 10 unidades de xilosa que presentan variaciones en el tipo y en la proporción de grupos sustituyentes, “los xilooligosacáridos son cadenas de xilosa unidas por enlaces β (1-4), principalmente consisten en xilobiosa, xilotriosa y xilotetraosa”¹⁴⁶, pero no se generan unidades significativas de xilosa pura.

Guido, Silveira y Kalil¹⁴⁷ comentan que para la producción de xilooligosacáridos se desean extractos xilanolíticos con alta actividad de endo-xilanasas y baja actividad de β -xilosidasas, que hidrolizan los xilooligosacáridos en xilosa. Estos autores realizaron un estudio llamado “Influencia de los parámetros reactivos en la producción enzimática de Xilooligosacáridos con potencial prebiótico” en el que evaluaron preparados xilanolíticos comerciales, producidos a partir de *Aspergillus oryzae* y *Thermomyces lanuginosus*, donde analizaron la capacidad de producción de xilooligosacáridos por hidrólisis enzimática de xilanos de madera de haya. Las muestras las analizaron por cromatografía líquida de alta eficiencia, donde utilizaron como patrones xilosa y xilooligosacáridos con diferentes grados de polimerización: xilobiosa (X2), xilotriosa (X3), xilotetraosa (X4) y xilopentaosa (X5), obtuvieron como resultados que la enzima endo- β -1,4-xilanasas de ambos extractos xilanolíticos fue capaz de hidrolizar la xilana de haya y liberar xilooligosacáridos. En el hidrolizado obtenido con la endo-xilanasas de *A. oryzae* el xilooligosacárido en mayor concentración fue la xilobiosa (10,75 mg/mL) y xilosa (2,52 mg/mL), debido a la presencia de β -xilosidasas. En cuanto al hidrolizado producido por la endo-xilanasas de *T. lanuginosus*, los xilooligosacáridos representaron más del 90% de los carbohidratos, la producción de xilosa fue muy baja (menor de 0,70 mg/mL), ya que el extracto xilanolítico no posee β -xilosidasas en su composición, los

¹⁴⁵ BARRETO, Sandra. Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto grifola frondosa: enzimas xilanolíticas. Trabajo de grado maestría en ingeniería química. Manizales: universidad nacional de Colombia sede Manizales. Facultad de ingeniería, 2008. 31 P.

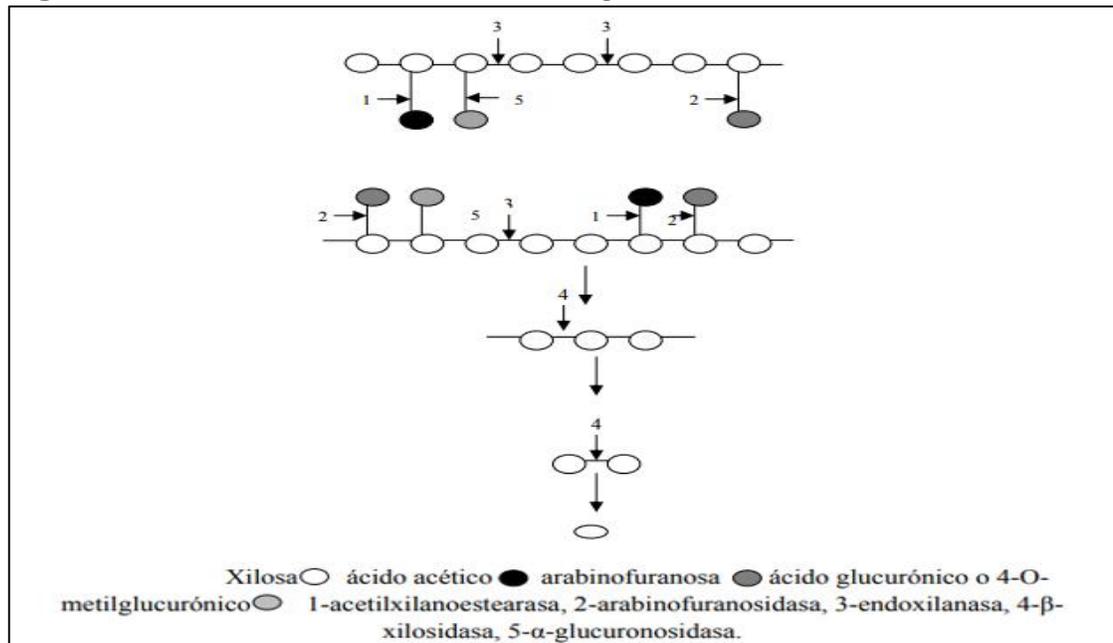
¹⁴⁶ GIL, Ángel. Tratado de nutrición, nutrición clínica. 2 ed. Madrid: editorial medica panamericana, 2010. P 338.

¹⁴⁷ GUIDO, Elida; SILVEIRA., Jessica y KALIL., Susana. Influência dos Parâmetros Reacionais na Produção Enzimática de Xilooligosacáridos com Potencial Prebiótico. Rio grande, Brasil: XII Seminario Brasileiro de Tecnología Enzimática, Enzitec, 2016.

xilooligosacáridos liberados en mayor concentración fueron la xilobiosa (6,96 mg/mL) y la xilotriosa (2,73 mg/mL). Los resultados de aquel estudio ayudan a confirmar los obtenidos en esta investigación, deduciendo que al no utilizar la enzima β -xilosidasa junto con la endo-xilanasa en el proceso de hidrólisis, se obtuvo concentraciones despreciables de xilosa, prácticamente nulas, resultando en concentraciones razonables xilooligosacáridos en diferente grado de polimerización (2 a 5).

El uso como mínimo de otra enzima es necesario, "La 1,4- β -D -xilosidasa interviene luego de la endoxilanasa, actuando sobre los xilooligosacáridos (a partir de los extremos no reductores) o sobre la xilobiosa, dando como producto xilosa, es decir, la realización de una hidrólisis posterior para hidrolizar los oligosacáridos en monosacáridos. Sin embargo, un sistema xilanolítico completo requiere de las enzimas que actúan sobre sus ramificaciones α -arabinofuranosidasas (que remueven cadenas laterales de L-arabinosa), α -glucuronidasas, que liberan ácidos glucurónicos de las cadenas laterales y acetilxilano-esterasas, que remueven los grupos sustituyentes acetílicos de la xilosa"¹⁴⁸, como se muestra en la figura 20.

Figura 20. Enzimas involucradas en la degradación de hemicelulosa.



Fuente: BARRETO, Sandra. Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto grifola frondosa: enzimas xilanolíticas. Manizales, 2008. 32 P. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/956/1/sandramontoyabarreto.2008.pdf>

¹⁴⁸ BARRETO, Op.Cit., P.31.

4.9.2.1 Sistema sinérgico de enzimas para la degradación de hemicelulosa.

Corral¹⁴⁹ enfatiza que para la biodegradación de xilanos y la obtención de xilosa pura, se requiere de la interacción de enzimas que ataquen la cadena principal con enzimas que desprendan grupos laterales unidos a residuos de xilosa.

Las enzimas que actúan sobre la cadena principal son primordialmente las endo- β -1,4-xilanasas y β -1,4-xilosidasas. Las endo- β -1,4-xilanasas rompen la cadena principal sólo en sitios vecinos a residuos de xilosa con algún substituyente. Puesto que ninguna de estas xilanasas libera a dicho substituyente como producto libre en la reacción, se piensa que tal grupo se requiere para orientar a la enzima y su sitio activo en un sustrato en particular. Las β -xilosidasas son capaces de romper β -xilósidos artificiales, así como oligómeros puros de xilosa con enlaces β -1,4 incluyendo la xilobiosa, donde su acción produce 2 moléculas libres de xilosa, en el caso de los oligómeros de xilosa, la acción de la β -xilosidasa procede con la remoción preferencial de xilosa desde el extremo no reductor de tales sustratos, además su afinidad usualmente incrementa conforme disminuye el GP, teniendo una actividad casi nula sobre el xilano. Las enzimas requeridas para atacar los grupos laterales serían α -L-arabinosidasas, α -D-glucuronidasas, en cuanto a las α -D-glucuronidasas, normalmente se requiere la acción de una endoxilanasas para producir los oligómeros sobre los que esa enzima actuará¹⁵⁰.

4.9.3 Determinación azúcares reductores. “La hemicelulosa contiene pentosas (β -D-xilosa, α -L-arabinosa), hexosas (β -D-manosa, β -D-glucosa, α -D-galactosa) y/o ácidos urónicos (ácidos α -D-glucurónicos, α -D-4-O-metilgalacturónicos y α -D-galacturónicos). Otros azúcares tales como α -L-ramnosa y α -L-fucosa también pueden estar presentes en pequeñas cantidades y los grupos hidroxilo de azúcares pueden estar parcialmente sustituidos con grupos acetilo”¹⁵¹. una desventaja del método DNS es que con este no se puede distinguir que azúcares reductores se encuentran presentes en el hidrolizado, por ende el mayor error fue suponer que la concentración de azúcares reductores detectados mediante este método se debía a xilosa, las concentraciones observadas fueron mínimas, de tal manera que si se encontraba presencia de xilosa en estos era extremadamente baja. Posiblemente los azúcares reductores que reaccionaron con el reactivo DNS fueron en su gran mayoría glucosa, azúcar generado por la acción de la enzima xilanasas, como se observó en el “Estudio del efecto de xilanasas fúngicas en la degradación de sustratos lignocelulósicos” realizado por Ulloa¹⁵², donde estudio la actividad

¹⁴⁹ CORRAL, Op. Cit., P 27-30.

¹⁵⁰ COUGHLAN. β -1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. Citado por CORRAL, Op. Cit., P 27-30.

¹⁵¹ DA SILVA, Op. Cit., P 5.

¹⁵² ULLOA, Javier. Estudio del efecto de xilanasas fúngicas en la degradación de sustratos lignocelulósicos. Trabajo de grado ingeniero civil en biotecnología e ingeniero civil químico. Santiago de Chile: Universidad de Chile. Facultad de ciencias físicas y matemáticas. Departamento de ingeniería química y biotecnología, 2014. P 49.

xilanasas de enzimas obtenidas a partir de *T. versicolor* y *G. trabeum*, obteniendo rendimientos de 0,194 mg/mL y 0,125 mg/mL respectivamente de glucosa.

posiblemente había presencia de arabinosa, “debido a la característica recalcitrante de los agro-residuos, una etapa de pretratamiento e hidrólisis puede despolimerizar la fracción hemicelulosa en azúcares fermentables tales como xilosa, glucosa y arabinosa”¹⁵³.

4.9.4 Fermentación. Otro factor es con respecto a las levaduras utilizadas, en este caso, *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis*, al tener el hidrolizado posiblemente concentración significativa de glucosa, por las causas mencionadas anteriormente; hayan realizado una fermentación diferente, teniendo la posibilidad de presentarse una fermentación alcohólica, puesto que se han estudiado diferentes especies del género *Candida* entre ellas la levadura *guilliermondii* y *tropicalis* para la producción de bioetanol, como en el estudio denominado “Levaduras autóctonas con capacidad fermentativa en la producción de etanol a partir de pulpa de excedentes de plátano *Musa* (AAB *Simmonds*) en el departamento de Córdoba, Colombia” realizado por Zumaqué, L; Lara, C; y Pantoja, M¹⁵⁴.; en el cual, se dieron resultados positivos en la producción de etanol, siendo la levadura *Candida guilliermondii* la más eficiente en la producción del mismo.

Por otro lado, la concentración de azúcares reductores obtenida en las mejores condiciones (4,5% de concentración de enzima y tiempo de hidrólisis de 2 días) fue de aproximadamente 0,7 mg/mL, muestra utilizada para el proceso de fermentación. A pesar de que esta fue la mayor concentración obtenida, no se pudo garantizar cuantitativamente de presencia de xilosa, esta cantidad de sustrato no fue suficiente para que la levadura hiciera su proceso de fermentación de xilosa a xilitol, pero probablemente la cantidad de azúcares reductores presentes fue utilizada por las levaduras como fuente de carbono para la realización de un proceso de asimilación de azúcares, que se evidenció por el crecimiento de microorganismos y por la no producción de metabolito de interés; ya que en el estudio llamado “Producción biotecnológica de xilitol utilizando *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis*” realizado por Vallejos, M¹⁵⁵, para que se dé el proceso de fermentación utilizan una

¹⁵³ DA SILVA, Op. Cit., P 44.

¹⁵⁴ ZUMAQUÉ, L; LARA, C; Y PANTOJA, M. Levaduras autóctonas con capacidad fermentativa en la producción de etanol a partir de pulpa de excedentes de plátano *Musa* (AAB *Simmonds*) en el departamento de Córdoba, Colombia. Grupo de Biotecnología Departamento de Química, Universidad de Córdoba. Rev.Colomb.Biotecnol., Volumen 11, Número 1, p. 40-47, 2009. ISSN electrónico 1909-8758. ISSN impreso 0123-3475.

¹⁵⁵ Vallejos, M.E. Chade, M., Medvedeff, M.G., Area, M.C. Felissia, F.E. Producción biotecnológica de xilitol utilizando *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis*. Cátedra de Micología, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad nacional de Misiones. Disponible en:

concentración inicial de xilosa de 30g/L y un tiempo de fermentación de 96h, produciendo una concentración máxima de xilitol de 0,99g/L para la levadura *Candida guilliermondii* y 2,51g/L para la levadura *Candida tropicalis*; concentraciones bajas de xilitol con respecto a la concentración inicial de xilosa utilizada.

Da silva ¹⁵⁶ recalca que los microorganismos productores de xilitol más eficaces, como lo son la levadura *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis* no son capaces de asimilar xilooligosacáridos, razón por la cual, la hidrólisis de estos es obligatoria para lograr una producción de xilitol adecuada a partir del sustrato y azúcar de interés.

Los inhibidores ya mencionados por Da silva¹⁵⁷, afectan el proceso de fermentación de la siguiente manera: el furfural afecta el metabolismo de levaduras, especialmente interfiriendo con la actividad de deshidrogenasas, como es el caso de la enzima intracelular *Xilitol-2-deshidrogenasa* provocando nulos rendimientos celulares. Los compuestos fenólicos se dividen en membranas y conducen a la pérdida de integridad, interfiriendo en el crecimiento celular y el transporte de azúcar. Los ácidos interrumpen la generación de energía celular mediante el colapso de gradientes de pH, especialmente a pH bajo. La toxicidad relativa es una función de la hidrofobicidad debido a que esta característica determina la capacidad del compuesto para pasar a través de la membrana. La toxicidad del aldehído también está relacionada con la hidrofobicidad, pero los aldehídos no alteran la integridad de la membrana ni causan un colapso del gradiente de pH. Los alcoholes son generalmente menos tóxicos que los ácidos o aldehídos relacionados, pero su toxicidad también está relacionada con la hidrofobicidad. Parecen causar un colapso en la estructura de la membrana.

https://www.researchgate.net/publication/301553734_Produccion_biotechnologica_de_xilitol_utilizando_Candida_guilliermondii_y_Candida_tropicalis

¹⁵⁶ DA SILVA, Op. Cit., P 16.

¹⁵⁷ Ibid., P. 149-151.

5. CONCLUSIONES

El trabajo realizado permite establecer las siguientes conclusiones:

- En el proceso de obtención de residuos, se estableció los requisitos con respecto a la maduración, $\frac{3}{4}$ coloración amarilla que cubre del 51-80% de la superficie del cuerpo de la fruta, coloración que la cáscara de piña debía cumplir para poder obtener la muestra analítica, la cual es sometida a los procesos posteriores para la obtención de xilitol.
- A partir de la caracterización química de la piña Golden MD2 se logró obtener un porcentaje de humedad de 6,98%, extraíbles de 26,44%, lignina de 15,3%, holocelulosa de 40%, celulosa de 11,22% y hemicelulosa de 28,78%. El contenido de hemicelulosa favorece el proceso de producción de xilitol, ya que es el compuesto de interés. Se evidenció un valor apreciable de lignina, por lo cual fue necesario aplicar un pretratamiento básico (deslignificación), para permitir una mejor acción de la enzima en el sustrato.
- Para el proceso de hidrólisis enzimática se realizó un diseño experimental, analizando las variables independientes, tiempo de hidrólisis y concentración de enzima; a través del método DNS se observó cualitativa y cuantitativamente que las mejores condiciones a las que se obtuvieron mayores concentraciones de azúcares reductores fueron a un tiempo de hidrólisis de 2 días y una concentración de enzima de 4,5% p/p. Al realizar el análisis estadístico se determinó que la concentración de enzima y el tiempo de hidrólisis, son variables que afectan de manera independiente en la obtención de azúcares reductores, pero no afecta la interacción de las mismas. Se encontró que el porcentaje de grado de conversión y rendimiento de enzima con respecto a las mejores condiciones obtenidas es de 0,88% y 3,57% respectivamente, evidenciando resultados desfavorables en la degradación de hemicelulosa.
- El crecimiento de las levaduras *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis* presentó una adecuada fase de crecimiento exponencial y estacionaria, a pesar de ello no se generó fermentación de xilosa para la producción de xilitol, dándose un posible proceso de asimilación de azúcares, debido a la presencia de estos, a la presencia de oxígeno y al tener un medio de cultivo químicamente definido, los azúcares reductores cuantificados por método DNS, con un valor máximo de 0,7 mg/mL, fueron utilizados como fuente de carbono para el crecimiento de las levaduras. La no fermentación se pudo dar debido a diversos factores que influyen en el proceso, como la presencia de inhibidores, principalmente

compuestos fenólicos y furfural originados en la etapa de pretratamiento y por la baja concentración de xilosa.

- No se comparó el rendimiento de xilitol obtenido por cada levadura, dado que no se presentó producción del mismo; debido a factores que se pudieron dar durante el proceso como la disminución de hemicelulosa en el pretratamiento, la poca obtención de azúcares reductores en el proceso de hidrólisis enzimática y la presencia de inhibidores que pudieron obstaculizar el proceso de fermentación.
- Este proyecto es importante a nivel investigativo, ya que se pudieron evaluar diferentes procesos como la hidrólisis alcalina, la hidrólisis enzimática utilizándose diferentes concentraciones de enzima y tiempo de hidrólisis, y en la fermentación de las levaduras *Candida guilliermondii* y *tropicalis* se evaluó su crecimiento y producción de xilitol; teniendo relevancia, ya que estos resultados pueden ser utilizados para tener en cuenta en investigaciones posteriores y poder obtener los resultados esperados.

6. RECOMENDACIONES

El trabajo realizado permite realizar las siguientes recomendaciones:

- Para la deslignificación de fibra se recomienda la realización de un pretratamiento que remueva la lignina de manera significativa, pero que no afecte la composición de hemicelulosa, aumentando la digestibilidad de esta. Algunos tratamientos favorables son la autohidrólisis que utiliza agua caliente comprimida, proceso con alta selectividad de hemicelulosa, en un rango aproximado de 55-84% y con bajos niveles de subproductos inhibidores, de igual manera funciona el tratamiento de explosión por vapor. La ventaja de estos tratamientos es el menor gasto de productos químicos.
- En el proceso de hidrólisis de hemicelulosa se requiere de un sistema sinérgico de enzimas, utilizando como mínimo la enzima endo- β -1,4-xilanasas y la 1,4- β -D -xilosidasa, encargadas de atacar la cadena principal. La enzima Xilanasas se encarga de la degradación de xilanos para la obtención de xilooligosacáridos, se recomienda el uso de xilosidasa para la hidrólisis de estos, logrando obtener unidades de xilosa pura.
- En la determinación de xilosa producida se recomienda inicialmente someter los hidrolizados a análisis de presencia de azúcares reductores y pentosas, observando la muestra cuyas condiciones generan mejores resultados colorimétricos y mejores rendimientos, sometiendo esta muestra a un análisis riguroso como es la cromatografía de alta resolución (HPLC) para tener un dato exacto de xilosa generada en el proceso de hidrólisis, con el fin de garantizar la bioconversión de esta y permitir el cálculo de rendimiento del producto de interés como es el xilitol.
- Previamente al proceso de fermentación se debe aplicar una estrategia de desintoxicación, para eliminar inhibidores tóxicos del hidrolizado, compuestos generados principalmente en etapa de pretratamiento. Los métodos de desintoxicación permiten un rendimiento satisfactorio de xilitol debido a un rendimiento microbiano productivo. Se recomienda un proceso de evaporación al vacío para eliminar compuestos no volátiles y volátiles como son el furfural y componentes fenólicos, un tratamiento con carbón activado es favorable antes o después de la evaporación. Otro método de gran utilidad es un proceso de neutralización con hidróxido de sodio e hidróxido de calcio que precipita los inhibidores y facilita su eliminación por filtración, el uso de enzimas como son las lacasas y peroxidasas en procesos de desintoxicación eliminan derivados de la lignina sin pérdida de azúcares.

BIBLIOGRAFÍA

A. F., EL-Baz, Y. M., Shetaia y R.R, Elkhoul. Xylitol production by *Candida tropicalis* under different. statistically optimized growth conditions. Sadat, Egypt: Academic Journals, 2011.

AFFLECK, Richard Peter. Recovery of Xylitol from Fermentation of Model Hemicellulose Hydrolysates Using Membrane Technology: Microbial Production of Xylitol. Trabajo de grado ingeniero de sistemas biológicos. Blacksburg, Virginia: Virginia Polytechnic Institute, 2000. P 14-15; 25.

ALCALDIA MAYOR DE BOGOTÁ, DISTRITO CAPITAL. Banco distrital de programas y proyectos. Ficha de estadística básica de inversión distrital EBI-D. enero 9 de 2015. Disponible en: http://www.ambientebogota.gov.co/es/c/document_library/get_file?uuid=4d840d51-ebe5-4ae0-b7fc-65ab948368ef&groupId=55886.

ALTEC. Nuevas Oportunidades con Residuos Agroindustriales Tropicales. XV Congreso Latino-Iberoamericana de Gestao de Tecnología. Porto, 2013. Disponible en: http://www.altec2013.org/programme_pdf/50.pdf.

ALVARADO, A. Curador CMPUJ. Colección de microorganismos. Pontificia Universidad Javeriana. angela.alvarado@javeriana.edu.co.

AMADOR, K. CARRILLO, O. ALVARADO, P. VEGA, J. Obtención de xilosa a partir de desechos lignocelulósicos de la producción y proceso industrial de la piña (*Ananas comosus*). Revista Uniciencia 26. p 75-89; 83. Costa Rica. 2012.

ANCASI EG. Manual de microbiología de los alimentos. Capítulo 4. P.41.

ANDRADE, M. Identificación de las especies del género *Candida* en gestantes con candidiasis vulvovaginal que acuden al Hospital Gineco-obstétrico Dr. Jaime Sánchez Porcel Sucre – 2011. Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca, Facultad de Ciencias Químico Farmacéuticas y Bioquímicas. Sucre, Bolivia. P.220. Disponible en: http://www.ecorfan.org/bolivia/series/Topicos%20Selectos%20de%20Quimica_I/Articulo%205.pdf

AQFSESIONES. Enzimas: Factores que afectan la actividad de las enzimas. [en línea]. Disponible en: <http://aqfsecciones.blogspot.com.co/p/enzima.html>.

BANACOL, Manual de buenas prácticas agrícolas para la producción de piña en costa rica [en línea]. Citado el 24 de mayo de 2017. Disponible en: <http://cep.unep.org/repcar/proyectos-demostrativos/costa-rica-1/publicaciones/banacol/Manual%20BPA%20Banacol.pdf>.

BARRETO, Sandra. Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto grifola frondosa: enzimas xilanolíticas. Trabajo de grado maestría en ingeniería química. Manizales: universidad nacional de Colombia sede Manizales. Facultad de ingeniería, 2008. 31 P.

BARRIENTOS, I. Evaluación preliminar de la actividad metabólica de *Candida guilliermondii* sobre las propiedades fisicoquímicas de la leche y en el proceso de producción de yogurt. Microbiología industrial. Pontificia universidad Javeriana. 2011. Bogotá. D.C., Colombia. [en línea. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co:8443/bitstream/handle/10554/8828/tesis774.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

BARROSO, Miguel. Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería. Madrid: universidad politécnica de Madrid, 2010. 74 P.

BELLO, Daniel., CARRERA, Emilia y DÍAZ, Yuset. Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método ácido 3,5 dinitrosalisílico. Cuba: Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, 2006. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/2231/223120664006.pdf>.

BLASCO, M. Microbiología de suelos. Curso. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA. Centro de enseñanza e investigación. Turrialba, Costa Rica. 1970.

BOTANICAL. Propiedades de la piña. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/pina.htm> [en línea].

BUITRAGO, J. ESCOBAR, A. Aplicación de levadura *Candida* ssp. Como una alternativa viable para la retardación en la pudrición del banano (*Musa acuminata*). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Carrera de microbiología industrial. Bogotá D, C. enero 2009. P.32. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis211.pdf> [en línea]

CALORIE CONTROL COUNCIL. Xylitol: útil en la dieta de las personas que sufren diabetes. [en línea]. Disponible en: datosobrelospolioles.com/xylitol/. citado el 23 de diciembre de 2016.

CAMPO VERDE. md2 y cayena. Disponible en: <http://www.campoverdesa.com.mx/products.html>.

CARDONA, Carlos y ORREGO, Carlos. Avances investigativos en la producción de biocombustibles. Manizales, caldas: 2009. P 178.

Chemical Analysis and Testing Laboratory Analytical Procedures. National Renewable Resource Laboratory citado por TRIANA CARANTON, Cristian Fernando. Producción de etanol a partir de residuos provenientes del cultivo de café. Trabajo de posgrado, maestría ingeniero químico. Manizales: Universidad nacional de Colombia, 2010, 25 P.

CMPUJ. Ficha técnica *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis*. Colección de microorganismos. Pontificia Universidad Javeriana. Disponible en: Anexo 8 y 9.

CMPUJ. Ficha técnica *Candida guilliermondii*. Colección de microorganismos. Pontificia Universidad Javeriana. Disponible en: Anexo 2.

CMPUJ. Ficha técnica *Candida tropicalis*. Colección de microorganismos. Pontificia Universidad Javeriana. Disponible en: Anexo 3.

COOPER, B. Enzimas xilanólíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales. © VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud, 16(1): 19-22, 2013. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/vertientes/vre-2013/vre131e.pdf>.

CUERVO, L. FOLCH, J. QUIROZ, R. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de Etanol. Centro de Investigación en Biotecnología, UAEM. 2Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor. 62209, México. Revista BioTecnología, Año 2009, Vol. 13 No. 3. P. 11-25. [en línea]. Disponible en: http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Lignocelulosa.pdf.

DA SILVA, Silvio y KUMAR CHANDEL, Anuj. D- Xylitol Fermentative Production, Application and Commercialization: Market Trends. São Paulo, Brazil: springer, 2012, 5 P; 10; 16; 21; 25; 44; 149-151.

DELGADO, Rosario. Probabilidad y estadística para ciencias e ingenierías. ANOVA y diseño de experimentos. Barcelona: Delta publicaciones, 2008. P. 243.

Diario EL COMERCIO. Una piña extra dulce es la más cotizada. 26 de febrero 2011. Disponible en: <http://www.elcomercio.com/actualidad/negocios/pina-extradulce-mas-cotizada.html>.

DIAZ, J. Sistemas de energías renovables. Energía y agua. Capítulo 5: Aprovechamiento de biocombustibles. 5.6 Procesos de pretratamiento físicos, químicos y biológicos. Técnico superior en Energías Renovables. Ediciones Parainfo S.A. 1 Edición. 2015. España. p. 177. Disponible en: [https://books.google.com.co/books?id=sKR9CAAQBAJ&pg=PA177&dq=material es+lignocelulosicos&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=materiales%20lignocelulosicos&f=false](https://books.google.com.co/books?id=sKR9CAAQBAJ&pg=PA177&dq=material+es+lignocelulosicos&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=materiales%20lignocelulosicos&f=false)

DOMÍNGUEZ CARRASCO, Eva Marení. efecto de algunos componentes del medio de fermentación sobre la actividad de xilosa reductasa obtenida de una levadura productora de xilitol: aplicaciones del xilitol. Trabajo de grado ingeniero químico. Xalapa, Veracruz: universidad veracruzana. Facultad de ciencias químicas. Departamento de ingeniería química, 2013. 8 p; 13-15.

DOSAL, María y VILLANUEVA, Marcos. Introducción a la metrología química: curvas de calibración en los métodos analíticos, 2008. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CURVASDECALIBRACION_23498.pdf

ENZINETICUPIIG. Bradford y DNS: Ácido 3,5 dinitrosalisílico (DNS). [en línea]. Disponible en: <https://sites.google.com/site/enzineticupiig/bradford-y-dns>. Citado el 15 de abril de 2017.

EQUIPOS Y LABORATORIO DE COLOMBIA. Manejo del autoclave, desinfección y esterilización del laboratorio y sus materiales. Disponible en: http://www.equiposylaboratorio.com/sitio/contenidos_mo.php?it=3148 [en línea].

ESPINOSA, F. Obtención de etanol mediante hidrólisis alcalina, enzimática y fermentación a partir del excedente orgánico del banano variedad Musa paradisiaca. Universidad central del Ecuador. Facultad de Ingeniería Química. Tesis de Grado. Quito, 2013. P 8.

FENGEL, D. WEGENER, G. Wood. Chemistry, Ultrastructure, Reactions. New York. Walter de Gruyter. 1989.

FONSECA MALDONADO, Mario Roberto. Determinación de la composición química de la madera de pino candelillo (*pinus maximinoi* h. e. moore) procedente de la finca río frío, tactic, alta verapaz. Trabajo de grado ingeniero químico. Guatemala: Universidad de san Carlos de Guatemala, Facultad de ingeniería, 2006. 70 P; 77-79.

GARCÍA, D. SERRANO, H. La pina, *Ananas comosus* (L.) Merr. (Bromeliaceae), algo más que un fruto dulce y jugoso. Laboratorio de Micropropagación y Propagación Vegetal. Departamento de Biología. Laboratorio de Biología Molecular. Departamento de Ciencias de la Salud UAM-I. 2005. p.55 Disponible en: <http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n56ne/pina.pdf>.

GARCIA, Vera. Introducción a la microbiología. Reproducción levaduras. 2 ed. San José, Costa Rica: editorial EUNED, 2004. P 109.

GIL, Ángel. Tratado de nutrición, nutrición clínica. 2 ed. Madrid: editorial medica panamericana, 2010. P 338.

GÓMEZ, A. Comparación del rendimiento de madera de eucalipto y olote de maíz, como biomasa residual rica en hemicelulosa, para la obtención de xilitol por medio de fermentación con levadura del tipo *saccharomyces cerevisiae*. Universidad de San Carlos de Guatemala. Escuela de Ingeniería Química. Febrero 2012. Guatemala. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_1229_Q.pdf

GONZALEZ, J. ALVAREZ, M. ORNELAS, L. ZAMUDIO, M. Producción y aplicaciones biotecnológicas del Xilitol. Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Morelia; Avenida Tecnológico 1500. C. P. 58120. Morelia, Mich, México. Revista de Biotecnología, Año 2011, Vol. 15 No. 2. P.25

GREENFIELD Y SOUTHGATE. Datos de composición de alimentos. Obtención, gestión y utilización. 2 ed. Roma: traducción española FAO, 2006. P 81; 237-238.

GUIDO, Elida; SILVEIRA., Jessica y KALIL., Susana. Influência dos Parâmetros Reacionais na Produção Enzimática de Xilo-oligossacarídeos com Potencial Prebiótico. Rio grande, Brasil: XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, Enzitec, 2016.

HERNÁNDEZ, M. SASTRE, A. Tratado de nutrición. Editorial Diaz de santos. 1999. Capítulo 21. Las sustancias nutritivas: grupos y funciones. Clasificación de alimentos. p.329. Disponible en: https://books.google.com.co/books?id=SQLNJOsZClwC&pg=PA329&dq=celulosa,+hemicelulosa+y+lignina&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=celulosa%20%20hemicelulosa%20y%20lignina&f=false.

HERRERA, M. WingChing, R. ROJAS, A. Metaanálisis de los subproductos de piña (*Ananas Comosus*) para la alimentación animal. López et al. Subproductos del cultivo de la piña. 2014. Disponible en: <http://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v25n2/a16v25n2.pdf>.

INIBIOMA, curso teórico-práctico sobre microscopia y recuento de levaduras para productores de cerveza. Bariloche, Argentina. Disponible en: <http://www.somoscervecedores.com/wp-content/uploads/2014/11/Teorica-Curso-Microscopio-La-Plata-2014-V5.pdf>.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. Norma técnica colombiana - NTC 1486 Documentación, Presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación. 6 ed. Bogotá, D.C. 2008.

_____. NTC 5313. Información y documentación. reglas para la abreviatura de títulos de publicaciones. Bogotá, D.C. 2004.

_____. NTC 5313. Información y documentación. reglas para la abreviatura de títulos de publicaciones. Bogotá D.C. 1998.

_____. NTC 729-1: frutas frescas. Piña. Especificaciones, Bogotá, D.C. 1996

INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACIÓN PARA LA AGRICULTURA. IICA. La piña. Guía técnica para el cultivo de la piña *Ananas comusus*, (L) Merr. Editorial estación experimental "el recreo". Nicaragua, 1983.

ITIS REPORT. *Candida tropicalis*. Taxonomix serial No. 194660. Disponible en: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=194660#null [en línea].

JIMENEZ, J. Aprovechamiento de Residuos Celulósicos de piña para la producción de Carbón Activo. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Químicas. Programa educativo Ingeniería Ambiental. Tesis para acreditar la Experiencia Educativa: Experiencia recepcional. Xalapa, Veracruz. Junio 2014. Disponible en: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/37824/1/jimenezbustamantejosemiguel.pdf>.

LA FINCA DE HOY. Conozca las diferencias entre variedades de piña oro miel y perolera. 26 de octubre. Episodio disponible en: <http://noticias.caracol.com/la-finca-de-hoy/conozca-las-diferencias-entre-variedades-de-pina-oro-miel-y-perolera>.

LA GUÍA. Lignina-la química de la madera. Disponible en: <http://quimica.laguia2000.com/elementos-quimicos/lignina-la-quimica-de-la-madera>. [en línea]

LEBEDEV, A. La fórmula química estructural del polímero de celulosa, ilustración 2D, vector, aislado en blanco. Disponible en: https://es.123rf.com/photo_27539074_la-formula-quimica-estructural-del-polimero-de-celulosa-ilustracion-2d-vector-aislado-en-blanco.html.

LIFE. Leading international fungal education. Fungal Infections. Candida tropicalis. Disponible en: <http://www.life-worldwide.org/fungal-diseases/candida-tropicalis1> [en línea].

LIMA, Juan., INGRAM., Thomas Y SMIRNOVA, Irina. Hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica: diseño de proceso y optimización de parámetros. Guatemala: facultad de ingeniería, Universidad del valle de Guatemala, Revista 21.

LOERA, O. Las xilanasas microbianas y sus aplicaciones. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Departamento de Biotecnología. Revista Biotecnología 2002. Vol. 7. No 2. 25-37. México D, F. P. 27; 310-311.

LOPEZ, L. RINCON, N. Estandarización de un método de extracción de zumo de piña. Universidad tecnológica de Pereira. Facultad de tecnología. Programa de especialización en procesos industriales agroalimentarios. Pereira, Colombia. 2016. Disponible en: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/7390/664804774B928.pdf?sequence=1>

LOS ALIMENTOS. Información general acerca de la piña. Disponible en: <http://alimentos.org.es/pina>

MALAGON M, Martha lucía. Obtención de etanol a partir de brócoli y cáscara de arveja empleando la enzima multifect 720 de carácter básico a nivel de laboratorio. Bogotá D.C: Fundación universidad de américa, 2008. P 4.

MARTINEZ, C. Evaluación preliminar de la levadura *Candida guilliermondii* como controlador biológico de *Mycus* sp en la papaya. Trabajo de grado para obtener título de Biólogo. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá D, C. 2010. P.8.

MARTOS, Pedro; FERNANDEZ; María y PAREDES; Fernando. Microbiología clínica practica: micosis de interés clínico. 2 ed. Madrid: ediciones Diaz de santos, S.A, 1993. 421 P.

MASSEY. Piña tropical, Ananas, escala Traslucidez, escala colores, citado por SERRATO, Liliana. parámetros de comercialización de la piña md2 en los principales mercados hondureños, 2013. Disponible en: <http://pronagro.sag.gob.hn/dmsdocument/3360>.

MATEOS, Pedro. Producción industrial de metabolitos secundarios. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Pedro_Mateos2/publication/261983344_Produccion_Industrial_de_Metabolitos_Secundarios/links/0deec5360d3a08a9fc000000/Produccion-Industrial-de-Metabolitos-Secundarios.pdf

MEDINA, M. LARA, L. AGUILAR, C. DE LA GARZA, H. Aprovechamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol como carburante. Universidad autónoma de Coahuila Blvd. Venustiano Carranza. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Investigación de Alimentos. 2011. Disponible en: <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%206/4.html>

MILLER, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, 1959. Anal.Chem. 31: P. 426-428.

MIN AGRICULTURA, DANE, 3 CENSO NACIONAL AGROPECUARIO. Censo Nacional Agropecuario 2014. Inventario agropecuario en las unidades de producción agropecuario (UPA). Disponible en: https://www.dane.gov.co/files/CensoAgropecuario/avanceCNA/PPT_9.pdf.

MONROY, J. GRANADOS, J. Diseño y construcción de una maquina despulpadora semi-automática para piña. Proyecto de grado para obtener el título de Ingeniero Mecatrónica. Universidad de San Buenaventura. Facultad de Ingeniería. Programa de Ingeniería Mecatrónica. Bogotá, D.C., Colombia. 2011. Disponible en: <http://biblioteca.usbbog.edu.co:8080/Biblioteca/BDigital/66021.pdf>.

MONTAÑO, H. Producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico de Moringa Oleifera. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Departamento Ingeniería Mecánica y Mecatrónica. Bogotá, D.C. Colombia. 2014. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/45408/1/80765033.2014.pdf>. 10 P.

MONTOYA, S. Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto grifola frondosa. Tesis de grado. Maestría es Ingeniería Química. Manizales, Colombia. Mayo, 2008. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/956/1/sandramontoyabarreto.2008.pdf>.

MOTTA, F. ANDRADE, C. SANTANA, M. A Sustainable degradation of lignocellulosic biomass - techniques, applications and commercialization. Chapter 10: Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Application and commercialization. Chapter 10: Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. P. 252- 257. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5772/53544>.

MUN, Low Wai. process optimization for xylitol purification using liquid-liquid batch extraction: effect of volume ratios and number of stages: History of xylitol. Trabajo de grado de Licenciado en Ingeniería Química (Biotecnología). P 30.

MUSSATO, S; DRAGONE, G; FERNANDES, M; ROCHA, G; Y ROBERTO, I. Efectos de los tratamientos de hidrólisis ácida e hidrólisis alcalina en la estructura del bagazo de malta para liberación de fibras de celulosa. Escola de Engenharia de Lorena – Departamento de Biotecnología (Universidad de São Paulo – EEL - USP) Estrada Municipal do Campinho s/no, CEP: 12602-810, Lorena/SP – Brasil. 2006. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Solange_Mussatto/publication/271471784_Efecto_de_los_tratamientos_de_hidrolisis_acida_y_hidrolisis_alcalina_en_la_estructura_del_bagazo_de_malta_para_liberacion_de_fibras_de_celulosa/links/54c8b8a60cf238bb7d0e37d4/Efecto-de-los-tratamientos-de-hidrolisis-acida-y-hidrolisis-alcalina-en-la-estructura-del-bagazo-de-malta-para-liberacion-de-fibras-de-celulosa.pdf.

NARANJO, Sauk. Revisión sistemática de la literatura sobre los metabolitos generados por la levadura *Candida guilliermondii*. Trabajo de grado microbiología agrícola y veterinaria. Bogotá D.C: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias, 2011. 11 P.

NEIRA, A. MARTINEZ, A. ORDUZ, J. Análisis del mercado de piña Gold y Perolera en dos principales centrales mayoristas de Colombia. Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria. 17(2):149-165. P.151. Mayo-agosto 2016. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta>.

NEGOCIOS, E. y. La miel de la piña atrae a empresarios veteranos. El Tiempo, págs. 21 de noviembre de 2014. Disponible en: <http://www.eltiempo.com/economia/sectores/produccion-de-pina-en-colombia/14864655>.

NIÑO, L. ACOSTA, A. GELVES, R. Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia núm. 69, diciembre-, 2013, pp. 317-318.

N.L. MOHAMAD, S.M MUSTAPA, M.N MOKHTAR. Xylitol Biological Production: A Review of Recent Studies. Department of Process and Food Engineering, Faculty of Engineering, Universiti Putra Malaysia, Selangor, Malaysia. Copyright © Universiti Putra Malaysia ISSN: 8755-9129 print / 1525-6103 online DOI: 10.1080/87559129.2014.961077. Food Reviews International, 31:74–89, 2015.

NORMAS MEXICANAS. NMX-F-083. Alimentos. Determinación de humedad en productos alimenticios, 1986.

OLMOS, A. Gobernación de Casanare. Cadena regional de piña departamento de Casanare 2015. Secretaria de Agricultura Ganadería y Medio Ambiente. P. 3; 5; 7.

OLMUE, piña MD2 (oro miel). [en línea]. Citado el 24 de mayo de 2017. Disponible en: <http://www.olmue.com.co/producto-insumo/materia-prima-pina-oromiel/>.

OVERBLOG. Cámara de Neubauer, recuento de eritrocitos. Disponible en: <http://uriel-93.over-blog.com/article-29526447.html>.

PLANTAS Y HONGOS. Xilano. [en línea]. Disponible en: <http://www.plantasyhongos.es/glosario/xilano.htm>

PRATS, G. Microbiología clínica. Editorial medica panamericana. Madrid, España. Octubre 2007. P.98.

PRINSEN, Pepijn. Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas. Trabajo fin de master. Sevilla: Instituto de recursos naturales y agrobiología de sevilla (irnas), 2010, 46 P.

RODRÍGUEZ, Evelyn; GAMBOA., María del Mar; HERNÁNDEZ., Francisco y GARCÍA., Jorge. Bacteriología general: principios y prácticas de laboratorio: fermentacion de carbohidratos. Costa rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica, 2005. P 271

RODRIGUEZ, Sandra y PARRA, Henry. Manejo potcosecha y evaluación de la calidad para la piña (ananas comosus). Que se comercializa en la ciudad de Neiva. Trabajo de grado ingeniero agrícola. Neiva: Universidad surcolombia. Facultad de ingeniería, 1994. P 20.

RUIZ, N., GALICIA, L., CUSTODIO, O., GUTIERREZ, M.G., MIRANDA, A., PALACIOS, N., ROSALES, A., SURLLES, R. Laboratorio de calidad de maíz y análisis de tejido vegetal. México, D.F: CIMMYT, 2012. P 4.

SAENZ, P. Clave dicotómica para la determinación de géneros de levaduras. Universidad de Murcia. Facultad de veterinaria. P. C-187. Disponible en: <http://revistas.um.es/analesumciencias/article/viewFile/101851/97021>.

SAGARPA ASERCA. Pliego de condiciones para el uso de la marca oficial México calidad suprema en piña. Citado el 24 de mayo de 2017. Disponible en: http://www.mexicocalidadsuprema.org/assets/galeria/PC_029_2005_Pina.pdf.

SANCHEZ, A. GUTIEERREZ, A. MUÑOZ, J. RIVERA, C. Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. Revista Tumbaga. 2010. [5] 61-91. p.62.

SANCHEZ-PLA, Alex y RUIZ, Carme. Análisis de datos de microarrays, replicación. Barcelona: Universidad de Barcelona. Departamento de estadística. Facultad de Biología. Disponible en: [Analisis_de_microarrays_C5_Disenyo_Experimental.pdf](#)

SANTAMBROSIO, Eduardo. Tinción y observación de microorganismos. Argentina: Universidad Tecnológica Nacional, 2009. Disponible en: https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/biotecnologia/practico4.pdf

SANTOS, Judith Y ZABALA, Diego. Evaluación de la producción de etanol a partir de residuos orgánicos y sus diferentes mezclas, generados en la empresa de alimentos S.A.S. Trabajo de grado ingeniero químico. Bogotá, D.C: Fundación Universidad de América. Facultad de ingenierías, 2016. 79 P.

SASAKI, M. INUI, M. YUKAWA, H. D-Xylitol. Fermentative Production, Application and Commercialization. Chapter 5 Microorganisms for Xylitol Production: Focus on Strain Improvement. DOI: 10.1007/978-3-642-31887-0_5, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012.

SERRATO, Liliana. parámetros de comercialización de la piña md2 en los principales mercados hondureños, 2013. Disponible en: <http://http://pronagro.sag.gob.hn/dmsdocument/3360>.

TAIN; Yelene, GARCIA; Annia y PADRON, Jesús. Estudio de la variación del índice de color durante la conservación de la piña variedad cayena lisa a temperatura ambiente. Habana, Cuba: 2011, revista ciencias técnicas agropecuarias, vol 20.

TAIZ, Lincoln y ZEIGER, Eduardo. Fisiología vegetal. 1. Universidad Jaume I. 2006.p. 50;51.

TAMAYO, Ignacio. Análisis de varianza con spss 8.0: modelo de ANOVA. Disponible en: http://www.ugr.es/~imartin/TEMA5_ANOVA.pdf

TAMBURINI, Elena, et al. Optimized Production of Xylitol from Xylose Using a Hyper-Acidophilic *Candida tropicalis*. Ferrara, Italia Jürg Bähler: 2015. biom5031979, 2 P.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY (TAPPI). Acid-insoluble lignin in wood and pulp. T 222 om-02. 2006.

TORTORA, Gerard., CASE, Christine y FUNKE, Berdell. introducción a la microbiología. Fases de crecimiento. 9 ed. Madrid: editorial medica panamericana. S.A, 2007. P 177.

T. WALTHER, P. HENSIRISAK, F.A. AGBLEVOR. The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by *Candida tropicalis*. Department of Mechanical Engineering, Technical University of Dresden, Dresden, Germany. Department of Biological Systems Engineering, 212 Seitz Hall, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA 24061-0303, USA. Bioresource Technology 76 (2001) p. 213 ± 220.

ULLOA, Javier. Estudio del efecto de xilanasas fúngicas en la degradación de sustratos lignocelulósicos. Trabajo de grado ingeniero civil en biotecnología e ingeniero civil químico. Santiago de Chile: Universidad de Chile. Facultad de ciencias físicas y matemáticas. Departamento de ingeniería química y biotecnología, 2014. P 49.

UNIVERSIDAD DE VALENCIA. Distribución F de Snedecor. [en línea]. Disponible en: <https://www.uv.es/ceaces/normaMu/f/f.htm>

USVALAMPI, Anne. Microbial production of xylitol, L-xylulose and L-xylose. Xylitol. Espoo, Finland: doctoral dissertation, 2013. 9-10 P; 14; 17-18.

VALENZUELA, S. Proteómica de xilanasas de *Paenibacillus barcinonensis*. Proyecciones biotecnológicas. Departamento de microbiología. Facultad de biología. Universidad de Barcelona. Septiembre 2012. Disponible en: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/9>.

VALLEJOS, M.E. CHADE, M., MEDVEDEFF, M.G., AREA, M.C. FELISSIA, F.E. Producción biotecnológica de xilitol utilizando *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis*. Cátedra de Micología, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad nacional de Misiones. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/301553734_Produccion_biotecnologica_de_xilitol_utilizando_Candida_guilliermondii_y_Candida_tropicalis.

VAZQUEZ, Fabio. Estudio y mejoramiento genético de cepas de levaduras y hongos filamentosos en fermentaciones con xilosa o xilano como fuente de carbono. Doctorado en Ciencias Naturales. La Plata: Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, 1999.

VIZCARRONDO, Milagros. Morfología y tinción de los microorganismos, 2008. Disponible en: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Morfologia%ADa_y_Tinci%C3%B3n.pdf

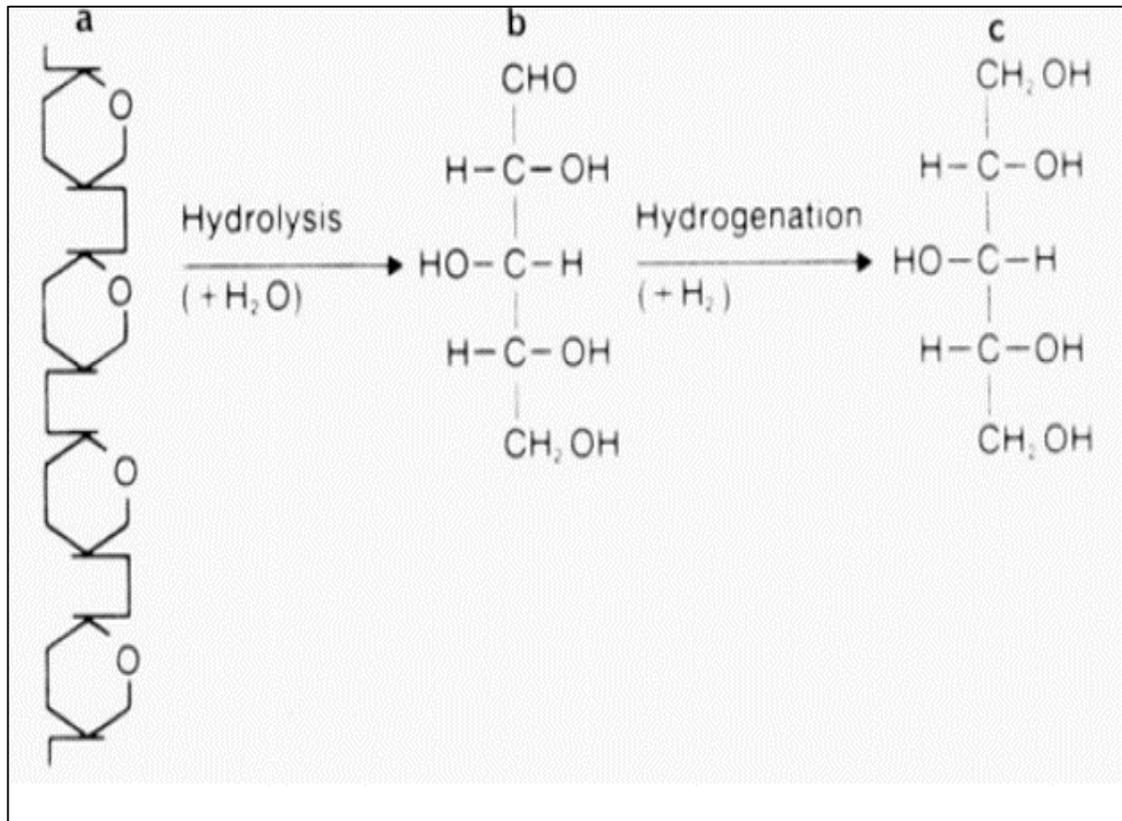
WEB DEL PROFESOR. Enzima catalaza: actividad enzimática. factores que la afectan. determinación de la constante de michaelis-menten. efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática. Disponible en: <http://webdelprofesor.ula.ve/farmacia/gmendez/manuales>.

WRIGHT, Carolanne. Xylitol: Uncovering the dark side of this popular sugar substitute. [en línea].11 de febrero de 2014. Disponible en www.naturalnews.com/043857_xylitol_artificial_sweeteners_digestive_distress.html.

YIQING, Y, MUÍAN, H, YUBING, R, LIYING, M, AND YANG, L. Anaerobic digestion of poplar processing residues for methane production after alkaline treatment. *Bioresource Technology*.2012. p.347-352.

ZUMAQUÉ, L; LARA, C; Y PANTOJA, M. Levaduras autóctonas con capacidad fermentativa en la producción de etanol a partir de pulpa de excedentes de plátano *Musa* (AAB Simmonds) en el departamento de Córdoba, Colombia. Grupo de Biotecnología Departamento de Química, Universidad de Córdoba. *Rev.Colomb.Biotecnol.*, Volumen 11, Número 1, p. 40-47, 2009. ISSN electronica 1909-8758. ISSN impresa 0123-3475.

ANEXO A
PROCESO DE PRODUCCIÓN DE XILITOL POR SÍNTESIS QUÍMICA.
HIDRÓLISIS Y HIDROGENACIÓN DE XILANO A XILITOL.



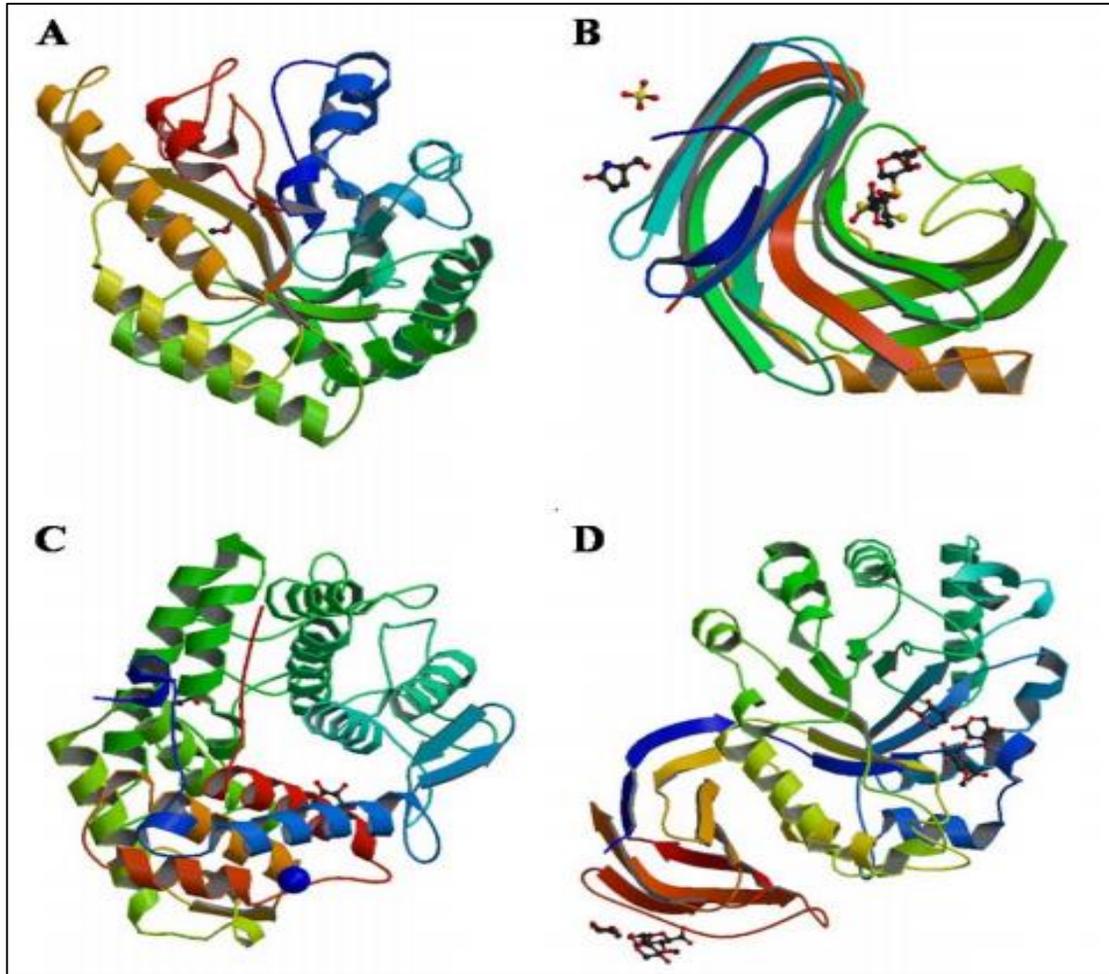
a) Xilano (C₅H₈O₄)_n, n-200; b) D-xilosa (C₅H₁₀O₅); c) Xilitol (C₅H₁₂O₂).

ANEXO B.
ENZIMAS DEGRADADORAS DE HEMICELULOSA

Enzima	Modo de acción	Clasificación catalítica
Exo- β -(1,4)-xilanasas (EC 3.2.1.156)	Hidroliza enlaces B-1,4-xilosa unida a xilooligosacáridos libera xilobiosa.	GH
Endo- β -(1,4)D-xilanasas (E.C. 3.2.1.8)	Hidroliza enlaces B-1.4, haciendo cortes internos al azar en la cadena principal de la molécula, liberando xilooligosacáridos.	GH
β -D-xilosidasa (E.C. 3.2.1.37)	Remueve residuos de xilosa de los extremos no reductores de los xilooligosacáridos cortos y xilobiosa, produciendo xilosa.	GH
α -L- arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55)	Remueve las cadenas laterales de arabinosa al hidrolizar el enlace entre arabinofuranosa en el extremo no reductor en los arabinoxilanos.	GH
α -Glucuronidasa (E.C. 3.2.1.139)	Remueve las cadenas laterales de ácido glucurónico al hidrolizar los enlaces α -1,2-glucosídicos con los glucuronoxilanos.	GH
Acetil-xilan estearasa (E.C. 3.1.1.72)	Libera grupos o-acetilos al hidrolizar enlaces acetil-ester en acetil-xilanos.	CE
Estearasa de ácido ferúlico (EC 3.1.1.73) Estearasa de ácido p-cumárico	Remueven el ácido ferúlico y p-cumárico de las arabinosas al hidroliza enlaces feruloil-ester y p-Cumaril-ester con xilanos	CE
Endo-B-1,4-mananasa	Libera b-14 mananooligomeros asociados a xilanos	GH
Exo-B-1,4 manosidasa	Hidroliza los B1,4-manooligomeros liberando manosa	GH
Endo-galactanasa	Hidroliza B-1,4-galactano	GH
Acetil-manan-estearasa	Libera 2 o 3-O-acteilxilanos	CE

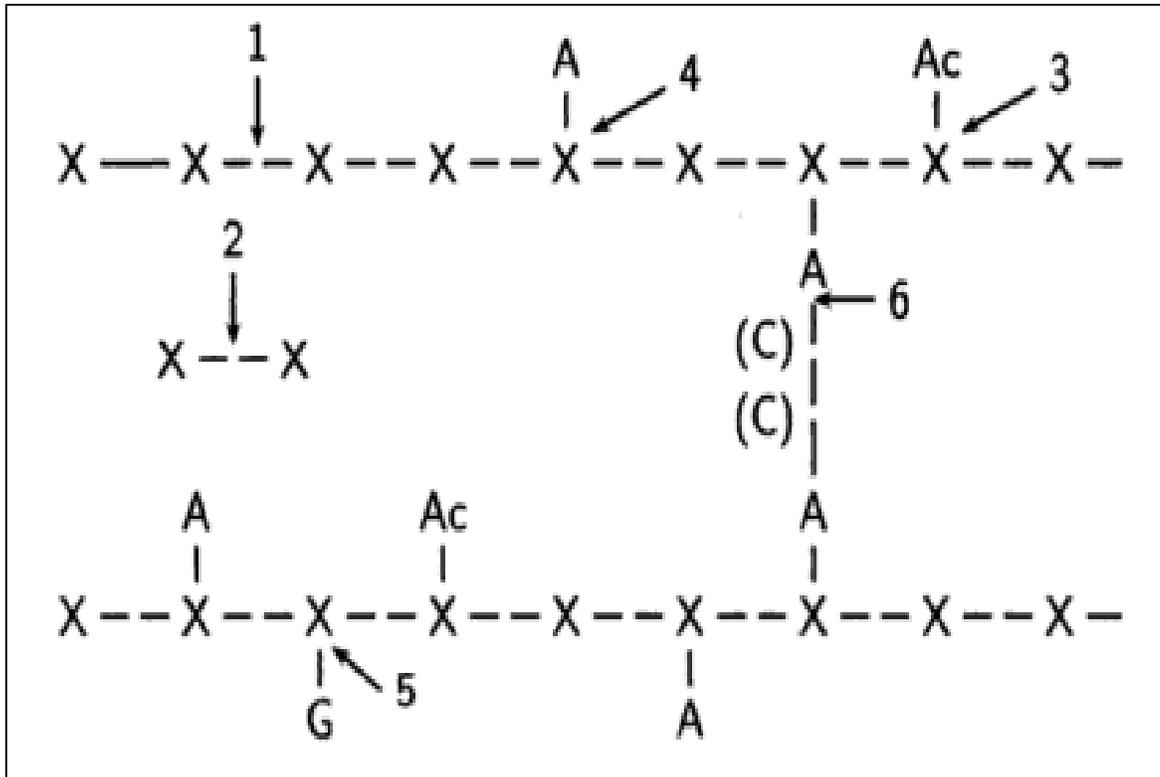
GH= Glucosilhidrolasas, CE= Carbohidratoestearasas

ANEXO C
ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LOS DOMINIOS CATALÍTICOS DE
LAS XILANASAS PERTENECIENTES A DIFERENTES FAMILIAS.



(A)Estructura de la xilanasa Xyn10B de *Paenibacillus barcinonensis*, con plegamiento típico $(\beta/\alpha)_8$. (B)Estructura de la xilanasa de *Chaetomium thermophilum* de familia GH11 con plegamiento de β jelly roll. (C)Estructura de la exoxilanasa liberadora de xilasas a partir del extremo reductor de *Bacillus halodurans* C-125 perteneciente a la familia GH8. (D)Estructura de la xilanasa XynC de *Bacillus subtilis* 168 perteneciente a la familia GH30, de estructura $(\beta/\alpha)_8$ unida al β side domain.

ANEXO D
SITIOS DE ROMPIMIENTO DE DIFERENTES TIPOS DE HEMICELULOSAS
SOBRE LA HEMICELULOSA



1. Xilanasa; 2. Xilobiasa; 3. Acetil xilano esteresa; 4. Arabino furanosidasa; 5. Glucuronidasa; 6. Esterasa de ácido ferulico. A-Arabinosa, X-Xilosa, G-Ácido Glucuronico, Ac-Ácido acético, F-Ácido ferúlico, A-Ácido cumárico.

ANEXO E
MICROORGANISMOS ESTUDIADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE XILITOL.

Microorg anismo	Especie	Fuente de carbono	Condiciones	Rendimiento	Referencia
Bacteria	<i>Corynebacterium</i> spp.	D-xilosa	-----	69 mg / mL	Yoshitake, Co. 1971
Bacteria	<i>Enterobacter liquefaciens</i>	D-xilosa	-----	33,3 mg / mL	Ishizaki. 1973
Levadura	<i>C. tropicalis</i> HXP2	D-xilosa	Aeróbica T: 30°C	0,96 g / g	Chen & Co. 1981
Bacteria	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	D-xilulosa, xilitol o D- manitol	Anaeróbica	0,7 g / g	Izumori K, Tuzaki. 1988
Levadura	<i>C. guilliermondii</i> FTI-20037	D-xilosa	Aeróbica T: 30-35 °C	77,2 g / L	Barbosa, Maria, Medeiros. 1988
Hongo	<i>Petromyces albertensis</i>	D-xilosa y metanol	pH inicial: 7	39,8 g / l	Dahiya. 1991
Levadura	<i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-170	D-xilosa	micro- aeróbica	0,54 g / g	Dahiya & Co. 1991
Levadura	<i>C. maltosa</i> Xu316	D-xilosa	micro- aeróbica	0,43 g / g	Suryadi & Co. 2000
Levadura	<i>C. guilliermondii</i> Xu280	D-xilosa	micro- aeróbica	0,63 g / g	Guo & Co.2006
Levadura	<i>Hansenula polymorpha</i>	D-xilosa y glicerol	pH: 8	0,52 g / g	Chaves- Alves & Co. 2008

ANEXO F
COMPOSICIÓN QUÍMICA DE ALGUNAS PARTES DE LA PIÑA

Componentes químicos	Partes de la piña (%)			
	Hoja de la corona		Bagazo	Planta
	Cayena lisa	MD2		
Extraíbles en etanol-tolueno	19.77	9.26	2.118	--
Extraíbles en etanol	3.85	0.24	2.099	--
Holocelulosa	70.58	69.83	85.75	--
Alfa celulosa	22.16	20.00	70.26	56-62
Beta celulosa	75.86	78.10	0.84	--
Gamma celulosa	1.98	1.90	0.21	16-19
Lignina	11.75	11.89	7.20	9-13
Cenizas	6.64	3.98	0.27	2-3

ANEXO G FICHA TÉCNICA XILANASA FUNGAL. (XILANASA AN 20)

Xilanasa AN 20 *Xilanasa Fungal*

Descripción

Xilanasa AN 20, es una preparación enzimática, que contiene Xilanasa de origen Fungal, producida por una cepa del *Aspergillus Niger* spec.

Es una enzima GRAS (Generalmente reconocida como Segura) para uso en alimentos.

La Xilanasa tiene actividades ajustadas para ejercer efectos específicos sobre los sustratos que necesiten una modificación de leve a moderada. Su desempeño debe ser monitoreado con base en el resultado esperado.

La Xilanasa contenida en el producto, mejora las propiedades de maquinabilidad de la masa y le confiere una mejor estructura interior. El complejo cumple con las especificaciones recomendadas por el Código Alimentario (FCC) para enzimas grado alimenticio. Este es específico xilanos o contenidos de hemicelulosa de la harina.

Fuente	<i>Aspergillus spp</i>
Actividad	20,000 BXU/gramo
Forma	Polvo Amorfo
Color	Ligeramente coloreado crema
Olor	Típico ligero a fermentación
Solubilidad	Soluble en agua.

Análisis de Actividad

La enzima contiene el mínimo declarado en la tabla. Las unidades BXU están determinadas sobre un sustrato de xilanos de abedul a 50 °C y pH de 5.3

Aplicación y Usos

En Panificación en procesos en los que se usan harinas de diferentes orígenes, mejora las propiedades de manipulación mecánica de las masas sometidas a tratamiento, produciendo un incremento en su volumen y estructura de la miga. Se puede acompañar de ácido ascórbico y de alfa amilasa, para sustituir el Bromato de potasio.

En Nutrición animal, se incorpora a la mezcla del alimento balanceado que será peletizada.

FAX: 446 6442
Cali - Colombia
e-mail: dirtecnica@proenzimas Ltda.com
www.proenzimas.com

Niveles de Uso

En Panificación, se aconseja iniciar con 20 a 25 g / 100 kilos de harina seca.

En Nutrición animal, se aconseja de 180 a 250 ppm con base en la cantidad de alimento preparado.

Para la elaboración de tortillas con base en maíz se recomienda usar de 15 a 20 gramos por cada 50 – 100 kilos de masa incorporándolos con el agua de amasado.

Condiciones sugeridas iniciales para estas aplicaciones son:

1.-Temperatura : 30 °C a 55 °C (O Temperatura de Mezcla Normal)
2.-pH : 4.0 a 7.0

La enzima trabaja perfectamente en estos niveles, sin embargo su acción se puede observar a temperatura ambiente.

Se sugiere hacer masas de prueba, para determinar la cantidad de enzima óptima y la cantidad de agua que pudiera reducirse en el tratamiento de la masa y observar su comportamiento durante el reposo o la reacción y el punto final de consistencia.

Como todas las enzimas, se requiere un medio húmedo para hacerlas activas frente al sustrato, por eso debe incluirse en el agua usada para mojar la masa y efectuar el proceso de mezclado con la harina y los demás ingredientes. Debe evitarse el contacto directo de la enzima con ingredientes como el ácido ascórbico o la Azodicarbonamida, para evitar su desnaturalización.

Empaque y Almacenamiento

La unidad de empaque de la Xilanasa AN 20 es de 25 – 30 kilos de peso neto en caja de cartón corrugado con bolsa PET de alta densidad al interior como primera barrera.

Otros empaques se encuentran disponibles a solicitud para diferentes cantidades de producto.

Debe almacenarse en recipientes cerrados, bajo condiciones secas y frescas; de esta manera, la pérdida de actividad es normalmente inferior al 10 % en un año. La vida de almacenamiento y actividad del producto puede prolongarse refrigerándolo a 5 - 8 °C.

Precauciones de manejo

Evite la formación de aerosol y polvos del producto.

Repetida inhalación del aerosol o el polvo puede causar sensibilización y reacciones de tipo alérgico en individuos sensibles.

En www.enzymetechnicalassociation.com consulte manejo seguro de enzimas.

La información técnica y sugerencias de uso contenidas en este documento se consideran fiables, pero no deben construirse como garantías. Las especificaciones están sujetas a cambios basados en variaciones de la materia prima.

ANEXO H

FICHA TÉCNICA *CANDIDA GUILLIERMONDII*.



Pontificia Universidad Javeriana
Registro Nacional de
Colecciones N° 148.
Registro WFCC y WDMC N° 357



COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA			
Responsable: Alba Alicia Trespalacios Rangel		Curador : Angela María Alvarado F.	
Número	CMPUJ	H025	
Microorganismo		<i>Candida guilliermondii</i>	
Fuente	Donación laboratorio de micología clínica PUJ.	Origen	Estudio perfil de susceptibilidad a fluconazol de aislamientos de <i>Candida</i> .
Almacenamiento	Glicerol al 10%	Historial PUJ	Enero del 2008
Nivel de seguridad	1	Conservación	Criopreservación -80°C
Condiciones de crecimiento		Aerobiosis. Temperatura 28°C	
Pruebas Bioquímicas	<p>Hidrólisis de la urea: negativo</p> <p>Crecimiento positivo en 24 a 48 horas a 28°C.</p> <p>La levadura fue identificada empleando kit comercial con un 99,08% para <i>Candida guilliermondii</i>.</p>	<p>Cultivo: medio empleado papa dextrosa agar, tiempo de incubación de 1-2 días a temperatura de 28°C.</p> <p>Características macroscópicas:</p> <p>Colonias planas, húmedas de apariencia cremosa y color blanco en agar papa dextrosa.</p> <p>Características microscópicas:</p> <p>Células pequeñas ovodias. Puede presentar pseudohifas después de 96 horas de incubación.</p>	
Identificación de peligros	<p>El personal debe usar equipo de protección normal (uso apropiado de bata, guantes, tapabocas, gorro)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Eliminación y tratamiento apropiado de desechos - Higiene personal: lavado de manos - Intervención sólo por personal capaz, capacitado y consciente de los peligros del microorganismo. 		
Observaciones	Mediante la presente se hace constancia que el microorganismo transferido debe ser usado exclusivamente para propósitos de investigación y docencia en el área de microbiología.		

CMPUJ - Carrera 7 No. 43-82 Edificio 50- Laboratorio 119. Tel. 3208320 Ext. 4187 - Fax:
3208320 Ext. 4021
e-mail: alba.trespalacios@javeriana.edu.co – angela.alvarado@javeriana.edu.co
Bogotá - Colombia.

ANEXO I FICHA TÉCNICA *CANDIDA TROPICALIS*.



Pontificia Universidad Javeriana
Registro Nacional de
Colecciones N° 148.
Registro WFFC y WDMC N° 857



COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA			
Responsable: Alba Alicia Trespalcacios Rangel		Curador : Angela María Alvarado F.	
Número	CMPUJ	H029	
Microorganismo		<i>Candida tropicalis</i>	
Fuente	Donación laboratorio de micología clínica PUJ.	Origen	Estudio perfil de susceptibilidad a fluconazol de aislamientos de <i>Candida</i> .
Almacenamiento	Glicerol al 10%	Historial PUJ	Enero del 2006
Nivel de seguridad	1	Conservación	Criopreservación -80°C
Condiciones de crecimiento		Aerobiosis. Temperatura 28°C	
Pruebas Bioquímicas	<p>Hidrólisis de la urea: negativo</p> <p>Crecimiento positivo en 24 a 48 horas a 28°C.</p> <p>La levadura fue identificada empleando kit comercial con un 99,9% para <i>Candida tropicalis</i>.</p>	<p>Cultivo: medio empleado papa dextrosa agar, tiempo de incubación de 2 días a temperatura de 28°C.</p> <p>Características macroscópicas:</p> <p>Colonias lisas, húmedas de apariencia cremosa y color blanco en agar papa dextrosa.</p> <p>Características microscópicas:</p> <p>Células ovoides que pueden ser cortas o alargadas. Luego de varios días de incubación puede formar cadenas cortas de micelio.</p>	
Identificación de peligros	<p>El personal debe usar equipo de protección normal (uso apropiado de bata, guantes, tapabocas, gorro)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Eliminación y tratamiento apropiado de desechos - Higiene personal: lavado de manos - Intervención sólo por personal capaz, capacitado y consciente de los peligros del microorganismo. 		
Observaciones	Mediante la presente se hace constancia que el microorganismo transferido debe ser usado exclusivamente para propósitos de investigación y docencia en el área de microbiología.		

CMPUJ - Carrera 7 No. 43-82 Edificio 50- Laboratorio 119. Tel. 3208320 Ext. 4187 - Fax: 3208320 Ext. 4021
e-mail: alba.trespalcacios@javeriana.edu.co – angela.alvarado@javeriana.edu.co
Bogotá - Colombia.

ANEXO J
CONTEO CELULAR DE *CANDIDA GUILLIERMONDII* EN INTERVALOS DE 12 HORAS

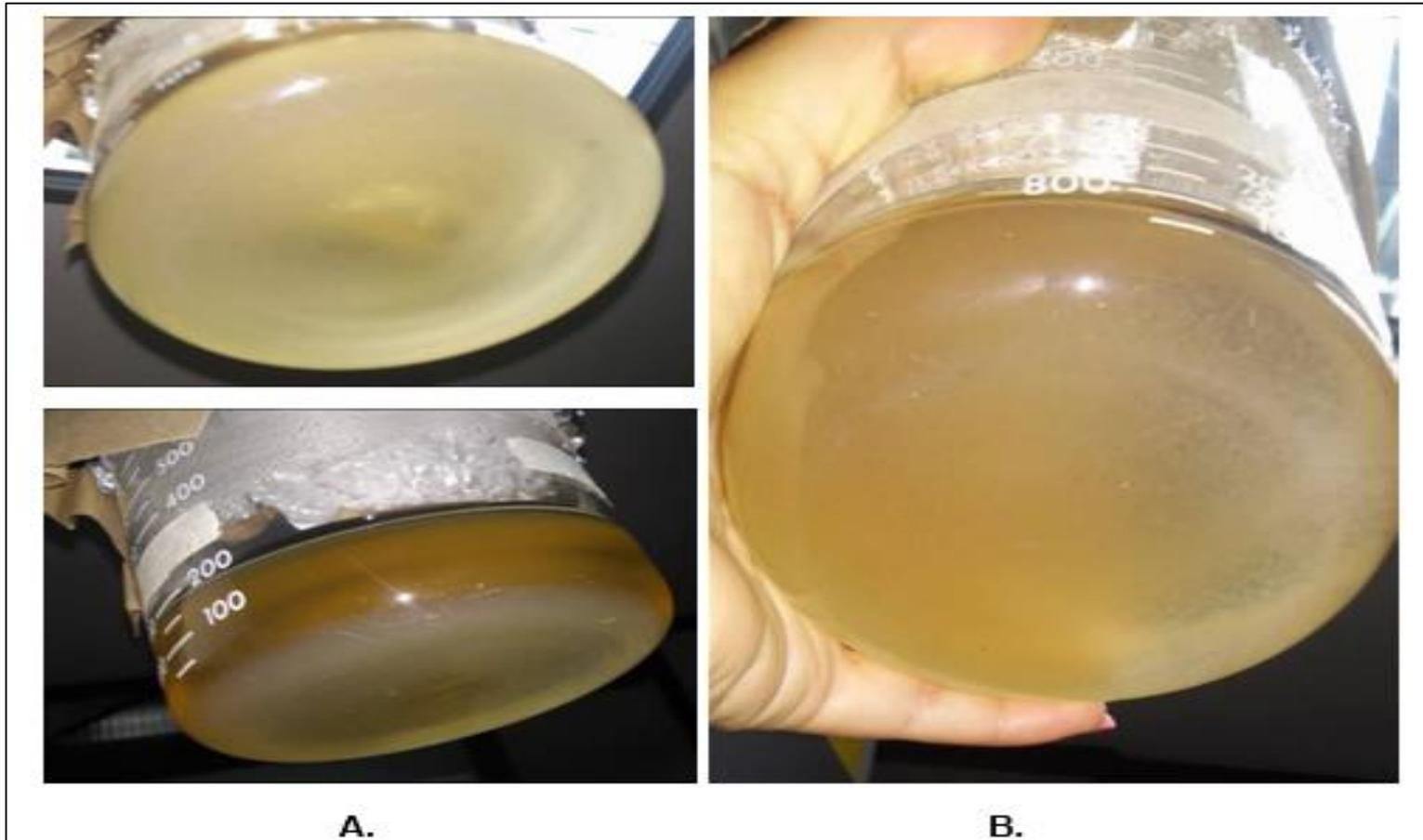
Tiempo (horas)	Réplica Técnica	Cuadrante 1	Cuadrante 2	Cuadrante 3	Cuadrante 4	Cuadrante 5	Total, células
12	R.1	12	11	12	13	13	61
	R.2	10	12	12	12	12	58
	R.3	12	11	12	11	13	59
24	R.1	13	11	13	14	12	63
	R.2	12	12	12	13	11	60
	R.3	9	12	11	10	10	52
36	R.1	14	12	12	13	13	64
	R.2	15	11	11	13	12	62
	R.3	11	10	10	11	11	53
48	R.1	15	12	16	17	13	73
	R.2	16	16	17	17	16	82
	R.3	15	14	14	13	15	71
60	R.1	14	15	14	14	16	73
	R.2	15	15	16	20	21	87
	R.3	15	15	15	16	15	76
72	R.1	17	20	20	22	20	99
	R.2	20	18	20	19	20	97
	R.3	20	19	19	19	20	97
84	R.1	19	19	18	20	19	95
	R.2	20	18	20	18	19	95
	R.3	19	20	18	20	19	96
96	R.1	18	18	17	20	18	91
	R.2	18	19	19	18	19	88
	R.3	17	19	18	19	19	92

ANEXO K
CONTEO CELULAR DE *CANDIDA TROPICALIS* EN INTERVALOS DE 12 HORAS.

Tiempo (horas)	Réplica Técnica	Cuadrante 1	Cuadrante 2	Cuadrante 3	Cuadrante 4	Cuadrante 5	Total, células
12	R.1	10	10	8	8	10	46
	R.2	10	10	9	9	10	48
	R.3	10	10	9	9	10	48
24	R.1	13	11	11	11	11	57
	R.2	11	10	10	11	12	54
	R.3	11	11	12	11	11	56
36	R.1	11	11	12	11	12	57
	R.2	13	12	12	12	12	61
	R.3	12	11	12	12	11	58
48	R.1	15	12	14	15	15	71
	R.2	12	14	13	13	14	66
	R.3	10	12	12	13	12	59
60	R.1	14	13	14	14	15	70
	R.2	14	15	14	15	15	73
	R.3	14	15	14	14	15	72
72	R.1	16	17	16	18	18	85
	R.2	18	19	18	18	20	93
	R.3	18	17	17	18	18	88
84	R.1	20	18	18	18	18	92
	R.2	18	16	19	18	17	88
	R.3	16	18	18	17	18	87
96	R.1	19	18	17	16	18	88
	R.2	18	17	17	16	17	85
	R.3	16	16	18	16	17	83

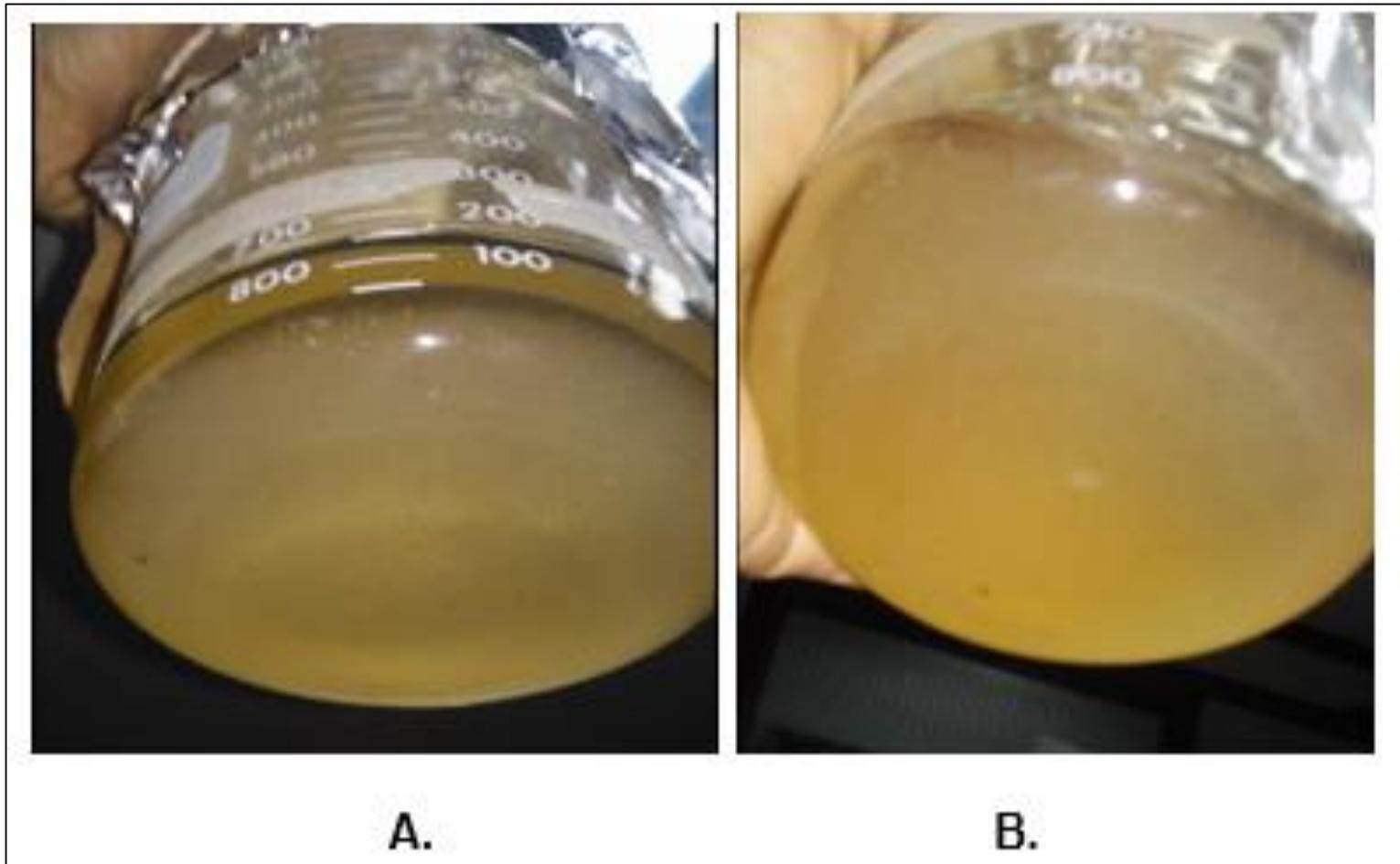
ANEXO L
APARIENCIA DÍAS 1 Y 2, MONTAJE DE FERMENTACIÓN.

Imagen L.1. Apariencia fermentación *Candida guilliermondii*. Primer día (24 horas) y segundo día (48 horas).



A) Fermentación 24 horas **B)** Fermentación 48 horas

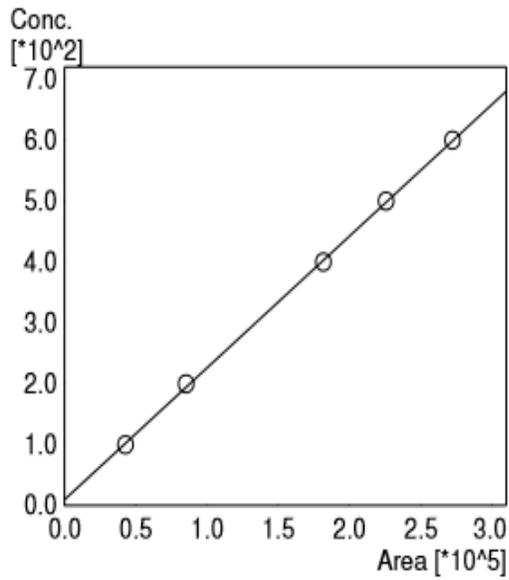
Imagen L.2. Apariencia fermentación *Candida tropicalis*. Primer día (24 horas) y segundo día (48 horas).



A) Fermentación 24 horas **B)** Fermentación 48 horas

ANEXO M RECTA CALIBRACIÓN DE XILITOL

ID# : 3
 Name : Xilitol
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=0.00216466*x+10.1252$
 : $Rr1=0.9998659$ $Rr2=0.9997319$
 : MeanRF:0.00225856 RFSD:6.89777e-005 RFRSD:3.05406
 FitType : Linear
 Analista : Diego Chaparro



#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	100.000	42603.7	42604
		43157.7	43158
2	200.000	86152.3	86152
		84682.8	84683
3	400.000	182181.3	182181
		181153.6	181154
4	500.000	226351.7	226352
		225225.4	225225
5	600.000	273726.4	273726
		271071.0	271071

 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016

AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL LUMIERES

Nosotros **Sandra Milena Ramírez Alfonso, Maria Camila Reyes Nieto** en calidad de titulares de la obra, **APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS DE LA ANANAS COMOSUS (PIÑA) PARA LA PRODUCCIÓN DE XILITOL POR HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA** elaborada en el año **2016**, autorizamos al **Sistema de Bibliotecas de la Fundación Universidad América** para que incluya una copia, indexe y divulgue en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres, la obra mencionada con el fin de facilitar los procesos de visibilidad e impacto de la misma, conforme a los derechos patrimoniales que nos corresponden y que incluyen: la reproducción, comunicación pública, distribución al público, transformación, en conformidad con la normatividad vigente sobre derechos de autor y derechos conexos (Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, entre otras).

Al respecto como Autores manifestamos conocer que:

- La autorización es de carácter no exclusiva y limitada, esto implica que la licencia tiene una vigencia, que no es perpetua y que el autor puede publicar o difundir su obra en cualquier otro medio, así como llevar a cabo cualquier tipo de acción sobre el documento.
- La autorización tendrá una vigencia de cinco años a partir del momento de la inclusión de la obra en el repositorio, prorrogable indefinidamente por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales del autor y podrá darse por terminada una vez el autor lo manifieste por escrito a la institución, con la salvedad de que la obra es difundida globalmente y cosechada por diferentes buscadores y/o repositorios en Internet, lo que no garantiza que la obra pueda ser retirada de manera inmediata de otros sistemas de información en los que se haya indexado, diferentes al Repositorio Digital Institucional – Lumieres de la Fundación Universidad América.
- La autorización de publicación comprende el formato original de la obra y todos los demás que se requiera, para su publicación en el repositorio. Igualmente, la autorización permite a la institución el cambio de soporte de la obra con fines de preservación (impreso, electrónico, digital, Internet, intranet, o cualquier otro formato conocido o por conocer).
- La autorización es gratuita y se renuncia a recibir cualquier remuneración por los usos de la obra, de acuerdo con la licencia establecida en esta autorización.
- Al firmar esta autorización, se manifiesta que la obra es original y no existe en ella ninguna violación a los derechos de autor de terceros. En caso de que el trabajo haya sido financiado por terceros, el o los autores asumen la responsabilidad del cumplimiento de los acuerdos establecidos sobre los derechos patrimoniales de la obra.
- Frente a cualquier reclamación por terceros, el o los autores serán los responsables. En ningún caso la responsabilidad será asumida por la Fundación Universidad de América.
- Con la autorización, la Universidad puede difundir la obra en índices, buscadores y otros sistemas de información que favorezcan su visibilidad.

	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016

Conforme a las condiciones anteriormente expuestas, como autores establecemos las siguientes condiciones de uso de nuestra obra de acuerdo con la **licencia Creative Commons** que se señala a continuación:

	Atribución- no comercial- sin derivar: permite distribuir, sin fines comerciales, sin obras derivadas, con reconocimiento del autor.	
	Atribución – no comercial: permite distribuir, crear obras derivadas, sin fines comerciales con reconocimiento del autor.	X
	Atribución – no comercial – compartir igual: permite distribuir, modificar, crear obras derivadas, sin fines económicos, siempre y cuando las obras derivadas estén licenciadas de la misma forma.	

Licencias completas: http://co.creativecommons.org/?page_id=13

Siempre y cuando se haga alusión de alguna parte o nota del trabajo, se debe tener en cuenta la correspondiente citación bibliográfica para darle crédito al trabajo y a sus autores.

De igual forma como autores autorizamos la consulta de los medios físicos del presente trabajo de grado así:

AUTORIZAMOS	SI	NO
La consulta física (sólo en las instalaciones de la Biblioteca) del CD-ROM y/o Impreso	X	
La reproducción por cualquier formato conocido o por conocer para efectos de preservación	X	

Información Confidencial: este Trabajo de Grado contiene información privilegiada, estratégica o secreta o se ha pedido su confidencialidad por parte del tercero, sobre quien se desarrolló la investigación. En caso afirmativo expresamente indicaremos, en carta adjunta, tal situación con el fin de que se respete la restricción de acceso.	SI	NO
		X

Para constancia se firma el presente documento en Bogotá D, C., a los 14 días del mes de 08 del año 2017

LOS AUTORES:

Autor 1

Nombres	Apellidos
Sandra Milena	Ramírez Alfonso
Documento de identificación No	Firma
1026578686	

Autor 2

Nombres	Apellidos
Maria Camila	Reyes Nieto
Documento de identificación No	Firma
1018473012	