



---

# TRABAJO DE GRADO

---

Frank U. Suarez Lizarazo



SEPTIEMBRE DE 2020

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

Kilómetro 1, vía Bucaramanga, Pamplona Norte de Santander

Producción de xilitol a partir de la fermentación de la xilosa por *Saccharomyces cerevisiae*  
modificada

Frank U. Suarez Lizarazo

Universidad de Pamplona/ UNICAMP

Facultad de ciencias Básicas

Departamento de Microbiología

Pamplona N. S.

2020

Producción de xilitol a partir de la fermentación de la xilosa por *Saccharomyces cerevisiae*  
modificada

Trabajo de Grado: Requisito para Optar al Título como Microbiólogo/Profesional

Frank U. Suarez Lizarazo

Orientadores:

PhD. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

Universidade Estadual de Campinas

PhD. José Felix Ortiz Lemus

Universidad de Pamplona

Co-orientador:

PhD. Fellipe da Silveira Bezerra de Mello

Universidade Estadual de Campinas

Universidad de Pamplona/ UNICAMP

Facultad de ciencias Básicas

Departamento de Microbiología

Pamplona N. S.

2020

El presente trabajo fue desarrollado en el Departamento de Genética, Evolución y Bioagentes del Instituto de Biología de la Universidad Estatal de Campinas (UNICAMP)

Campinas, São Paulo – Brasil, 2020

## NOTAS DE ACEPTACIÓN

---

---

---

---

---

---

---

Firma Jurado 1

---

Firma Jurado 2

## DEDICATORIA

*A quien confió y vio en mí la capacidad de logro*

*A mi familia*

*A tí...*

*Don't stop dreaming, but don't let your dreams be just dreams.*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme ser, estar y continuar...

A mis Padres Isabel, Bernarda e Isaac, por el apoyo brindado a lo largo de mi formación como persona y profesional.

A mis tíos Myriam y Pedro, por la compañía y el apoyo.

A mis primos, hermanos y amigos por sus palabras de ánimo, consejos y buena energía.

Al profesor Gonçalo Guimarães y a Fellipe Bezerra, por la oportunidad y la confianza depositada para poder desarrollar mi trabajo de grado.

Al cuerpo docente de la Universidad de Pamplona que tuvo vinculo en mi formación como profesional.

A Lina María Arrieta, gran amiga y cómplice.

Finalmente, a todo aquel que de alguna forma apporto enseñanzas...

...G r a c i a s.

## **RESUMEN**

En el presente trabajo de grado se evaluó la capacidad fermentativa en la producción de xilitol a partir de xilosa de la cepa mutante industrial *Saccharomyces cerevisiae* FMYX. Para ello, se realizó ensayos de fermentación de la xilosa, buscando determinar las mejores condiciones para la producción de xilitol; igualmente se evaluó la influencia de los inhibidores Hidroximetilfurfural (HMF) y Furfural. Los resultados permitieron determinar que dar paso a un crecimiento inicial en presencia de oxígeno hasta alcanzar una aerobiosis, a una temperatura de 30°C, 250 r.p.m y concentración del cultivo de *S. cerevisiae* de 1 OD; fueron las mejores condiciones para la producción de xilitol a partir de xilosa. También se pudo observar que la presencia de inhibidores en el medio afecta en la producción. Sin embargo, la cepa FMYX se mostró altamente tolerante ya que logró producir xilitol en presencia de diferentes concentraciones de los inhibidores. El posible uso de la cepa FMYX para la producción de xilitol, usando bagazo de caña en presencia de inhibidores puede ser contemplada, ya que, en un proceso totalmente integrado, podría representar un avance hacia la bioproducción, mitigación en costos de producción química e impacto ambiental.

**Palabras clave:** *Microbiología, Industrial, Levadura, Fermentación, Xilitol, Xilosa, HMF, Furfural*



### **ABSTRACT**

*In the present degree work, the fermentative capacity in the production of xylitol from xylose of the industrial mutant strain *Saccharomyces cerevisiae* FMYX was evaluated. For this, xylose fermentation tests were carried out, seeking to determine the best conditions for the production of xylitol; the influence of the hydroxymethylfurfural (HMF) and Furfural inhibitors was also evaluated. The results allowed determining that, by allowing initial growth in the presence of oxygen until aerobiosis was reached, at a temperature of 30 ° C, 250 r.p.m and reaching 1 OD of *S. cerevisiae* culture; they were the best conditions in the production of xylitol from xylose. It was also possible to observe that the presence of inhibitors in the medium affects production. However, the FMYX strain was highly tolerant since it managed to produce xylitol in the presence of different concentrations of the inhibitors. The possible use of the FMYX strain for the production of xylitol, using cane bagasse can be seen as a reality, since, in a fully integrated process, it could represent an advance towards bioproduction, mitigation of chemical production costs and environmental impact.*

**Key words:** *Microbiology, Industrial, Yeast, Fermentation, Xylitol, Xylose, HMF, Furfural*

## Tabla de contenido

1.	INTRODUCCIÓN .....	11
2.	ANTECEDENTES.....	13
3.	OBJETIVOS .....	15
3.1.	<i>Objetivo general</i> .....	15
3.2.	<i>Objetivos específicos</i> .....	15
4.	JUSTIFICACIÓN.....	16
5.	MARCO TEÓRICO.....	17
5.1.	XILOSA .....	17
5.2.	FUENTE DE XILOSA.....	18
5.3.	XILITOL .....	19
5.4.	INHIBIDORES .....	20
5.5.	MICROORGANISMOS .....	21
5.6.	PRODUCCIÓN DE XILITOL.....	23
6.	MATERIALES Y METODOS .....	26
6.1.	<b>Preparación-tratamiento de material y área de trabajo</b> .....	26
6.2.	<b>Estudio del caso y cepas de trabajo</b> .....	26
6.3.	<b>Preparación del Inoculo (Pre-inoculo)</b> .....	27
6.4.	<b>Ensayos de fermentación y evaluación de las mejores condiciones para producción de xilitol</b> .....	27
6.5.	<b>Influencia del HMF y Furfural</b> .....	28
6.6.	<b>Métodos Analíticos</b> .....	28
6.7.	<b>Cronograma de Actividades</b> .....	29
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
7.1.	<i>Evaluación y determinación de las mejores condiciones de producción de xilitol: análisis del comportamiento de la OD</i> .....	31
7.1.1.	<i>Evaluación y determinación de las mejores condiciones de producción de xilitol: análisis cuantificación HPLC</i> .....	33
7.2.	<i>Influencia de HMF y Furfural en la producción de Xilitol</i> .....	36
8.	CONCLUSIÓN .....	41
9.	RECOMENDACIONES .....	42
10.	PERSPECTIVAS .....	43
	<b>Referencias</b> .....	43

ANEXOS.....	48
<i>Tablas OD de las Fermentaciones Iniciales realizadas para determinar las mejores condiciones de producción de xilitol.....</i>	48
<i>Resultados OD PRIMERA fermentación.....</i>	52
<i>Resultados HPLC Primera fermentación.....</i>	53
<i>Datos Primera fermentación procesados.....</i>	54
<i>Resultados OD SEGUNDA Fermentación.....</i>	55
<i>Resultados HPLC Segunda fermentación.....</i>	55
<i>Datos segunda fermentación procesados.....</i>	56
<i>Resultados OD TERCERA Fermentación.....</i>	57
<i>Resultados OD PRIMERA fermentación con INHIBIDORES.....</i>	58
<i>Resultados HPLC PRIMERA fermentación con INHIBIDORES.....</i>	59
<i>Resultados Procesados PRIMERA fermentación con INHIBIDORES.....</i>	60
<i>Resultados OD SEGUNDA fermentación con INHIBIDORES.....</i>	60

## ABREVIATURAS

HMF: hidroximetilfurfural

Furfural: 2-furaldehído

YPD: Medio de cultivo YPD (Extracto de levadura, Peptona, Glucosa)

YPDX: Medio de cultivo líquido YPDX (Extracto de levadura, Peptona, Glucosa, Xilosa)

OD: Densidad Óptica

XR: Xilosa Reductasa

## 1. INTRODUCCIÓN

Los desechos lignocelulósicos agroindustriales son un sustrato abundante y de bajo costo que pueden ser usados para la producción de diversos compuestos de valor agregado como el etanol y el xilitol, por lo que ha aumentado la importancia de estudios para generar formas de usar las pentosas y hexosas presentes en estos tipos de materias primas (Cortivo Dall, 2017).

La lignocelulosa presenta una estructura recalcitrante, compuesta principalmente por celulosa (monómeros de glucosa), hemicelulosa ( azúcares hexosa y pentosa ) y lignina (Baptista, Cunha, Romaní, & Domingues, 2018); la xilosa es un producto de hidrólisis del xilano, que es la parte principal de la hemicelulosa presente en toda la flora, particularmente en el abedul y la caña, por tanto, el bagazo de caña de azúcar es una opción muy tentativa de materia prima, pues este es generado en grandes cantidades en industrias azucareras y de etanol, y aunque parte puede ser utilizado para generar energía en los procesos (Franco, y otros, 2013), gran parte de este es acumulado generando un impacto ambiental negativo (Dias, y otros, 2015).

El xilitol, alcohol de azúcar, se muestra bastante prometedor y ha sido identificado como uno de los 12 compuestos de mayor valor agregado, debido a su aplicación como edulcorante bajo en calorías, uso de sus propiedades antimicrobianas para prevenir infecciones dentales y de otro tipo (Kogje & Ghosalkar, 2016). La producción industrial de xilitol se da por hidrogenación catalítica de una solución de xilosa pura a alta temperatura y presión, presentándose como un proceso costoso que presenta bajos rendimientos atribuidos a la complejidad de las etapas en la recuperación del producto; han sido evaluados procesos alternos utilizando diferentes sustratos tales como desechos vegetales, mazorca de maíz, bambú y el bagazo de caña de azúcar.

Las implementaciones de procesos fermentativos han captado la atención por la posibilidad de poder utilizar levaduras para obtención de xilitol con rendimientos de hasta el 85% del máximo teórico; sin embargo, la principal problemática de estos procesos de producción microbiana, es que en la composición de los hidrolizados derivados de la lignocelulosa que son empleados se encuentra la presencia de compuestos inhibidores, que interviene negativamente en el metabolismo de la levadura; pues durante la hidrólisis y el pretratamiento

que requiere la biomasa, la celulosa y la hemicelulosa son descompuestas para liberar así los azúcares monoméricos pero al mismo tiempo también son liberados compuestos inhibidores microbianos, como furaldehídos, compuestos fenólicos y ácido acético (Junior, Pacheco, Trichez, Almeida, & Gonçalves, 2019).

En el trabajo actual, se presenta una descripción general a cerca de xilitol dando a conocer la importancia de generar un método viable de bioproducción del mismo; el objetivo de este estudio se centró en evaluar una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* modificada mediante CRISPR con fin de transformar la xilosa en xilitol, determinar las mejores condiciones de producción, finalmente testar la influencia de inhibidores en la producción de xilitol y ver la capacidad de tolerancia de la cepa ante estos; de esta manera tener una nueva visión de la posible implementación de un bioproceso para producción de xilitol usando bagazo de caña de azúcar.

## 2. ANTECEDENTES

Aunque las cepas nativas de *Saccharomyces cerevisiae* no pueden asimilar naturalmente las pentosas, esta levadura se muestra como un buen huésped de ingeniería metabólica dado su estado de seguridad, microorganismo generalmente reconocido como seguro (GRAS) y su genoma altamente estudiado y conocido (Guirimand, y otros, 2016).

La expresión de la vía de xilosa heteróloga en el sistema huésped eucariota usando genes de *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* que codifican la vía de xilosa se ha usado ampliamente (S. Kwak, 2017). La absorción de xilosa y la producción de xilitol por *S. cerevisiae* recombinante transformado con el gen *xyl1* que codifica para la enzima xilosa reductasa (XR) fue informado por primera vez por Hallborn y colaboradores (Hallborn, y otros, 1991).

Dada la tendencia actual en la fermentación de azúcares de segunda generación, que son derivados o remanentes de la materia prima usada en procesos de producción primaria (azúcar, etanol, etc.) y las condiciones industriales en las que ocurre este proceso, *S. cerevisiae* es nuevamente el organismo de elección debido a su alta tolerancia al etanol y al bajo pH, la capacidad de fermentar en condiciones estrictamente anaerobias y su resistencia a la infección bacteriófaga (Moysés, Reis, Almeida, Moraes, & Torres, 2016).

La presencia de inhibidores en el hidrolizado lignocelulósico también es un cuello de botella para la absorción eficiente de xilosa, por lo tanto, el uso de cepas industriales de levadura para manipulaciones genéticas puede beneficiarse de su fondo genético más adecuado (Cai, Zhang, & Li, 2012). La producción de xilitol por *S. cerevisiae* genéticamente modificada utilizando hidrolizados hemicelulósicos no desintoxicados a partir de mazorcas de maíz (Baptista, Cunha, Romani, & Domingues, 2018) y paja de arroz (Guirimand, y otros, 2016) se ha informado en algunos estudios (Kogje & Ghosalkar, 2016).

*Saccharomyces cerevisiae*, la cepa de laboratorio CEN.PK-122 (Dijken, y otros, 2000) y la cepa industrial FMY001 (derivada de SA-1) (Mello, y otros, 2018) se usaron como antecedentes genéticos para construir levadura mutante que consume xilosa para producir xilitol. La transformación de levadura fue realizada por Mello y colaboradores (Datos no publicados) con el método PEG/LiAc (Gietz, Schiestl, Willems, & Woods, 1995) utilizando un sistema CRISPR/Cas9 como se describe por Laughery y colaboradores (Laughery, y otros, 2015), adicionalmente realizaron ensayos preliminares estableciendo 30 g/L de glucosa para

la fermentación con xilosa. Como resultado del anterior trabajo mencionado, se obtuvo el linaje nombrado como FMYX (FMY001 MATa/MATa *hoΔ::xyl1*), conteniendo el gen que codifica para la xilosa reductasa (XR); la cepa FMYX fue evaluada en el presente trabajo desarrollado dentro del laboratorio del Departamento de Genética, Evolución y Bioagentes del Instituto de Biología de la Universidad Estatal de Campinas, dando así continuidad al estudio de esta levadura.

### 3. OBJETIVOS

#### *3.1. Objetivo general*

Evaluar la capacidad fermentativa de la xilosa por *Saccharomyces cerevisiae* FMYX en la producción de xilitol

#### *3.2. Objetivos específicos*

- Determinar la capacidad de consumo de xilosa y la producción de xilitol de la cepa de levadura mutante FMYX.
- Determinar las mejores condiciones de aireación en la fermentación para la producción de xilitol.
- Evaluar la influencia de los inhibidores HMF y Furfural en la producción de xilitol.



#### 4. JUSTIFICACIÓN

El creciente interés e importancia de llevar una vida saludable y mantener un peso ideal, llevan consigo la necesidad de los consumidores a adquirir productos altamente naturales y que aporten beneficios a su cuerpo; el xilitol se presenta en el mercado como un candidato adecuado, debido a la variedad de aplicaciones que presenta tanto para el mercado de alimentos como el farmacéutico y dental (Baptista, Cunha, Romaní, & Domingues, 2018).

Así mismo, teniendo en cuenta los métodos rigurosos actualmente usados para la producción de xilitol, su costo para ser adquirido también puede ser elevado para la gran mayoría de personas que no cuentan con ingresos suficientes. Por lo tanto, demostrar la capacidad de consumo de xilosa y producción de xilitol, por parte de cepas microbianas mediante la realización de ensayos en laboratorio, y evaluar la presencia de inhibidores que se presentan como limitante en el proceso de producción, permitiría establecer posibles que puedan reducir los costos de la producción actual de xilitol que como se dará a conocer, la vía química es la actual líder; y así abrir nuevas oportunidades en el mercado para ampliar el alcance de los consumidores.

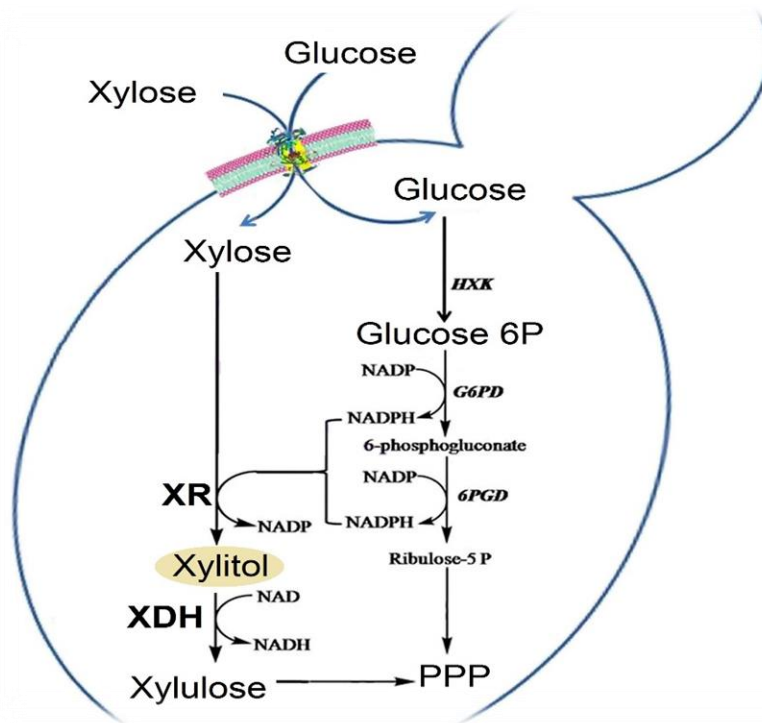
El estudio de la producción microbiana de xilitol a partir de subproductos agroindustriales, permitiría llevar a la realidad lo anteriormente descrito, además, que al mismo tiempo se estaría reduciendo la acumulación de desechos lignocelulósicos, amortiguando su impacto ambiental. Un ejemplo, es el bagazo de la industria de caña de azúcar y etanol, que es altamente generado debido a la gran demanda de estos productos. Por todo lo anterior se hace relevante el hacer estudios de cepas modificadas de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*; el cual es un microorganismo GRASS altamente estudiado, para así evaluar su capacidad de producción de xilitol y determinar condiciones que mejoren el rendimiento. El laboratorio de Genómica y Bioenergía del Instituto de Biología de la UNICAMP presenta las herramientas necesarias para el desarrollo de este tipo de estudio, pues trabajos relacionados con esta levadura se han realizado y se llevan a cabo en allí.

## 5. MARCO TEÓRICO

En los últimos años el interés por el xilitol ha aumentado considerablemente, por la variedad de aplicaciones comerciales en diferentes sectores industriales, alimentarios, productos dentales y farmacéuticos. Debido a que las rutas industriales hacia el xilitol son costosas, en las últimas décadas se ha dedicado mucho esfuerzo al desarrollo de procesos biotecnológicos rentables y gentiles con el medio ambiente, evaluando sustratos lignocelulósicos baratos (Ravella, Gallagher, Fish, & Prakasham, 2012). La lignocelulosa es una de las fuentes de biomasa renovable más abundantemente disponibles en la tierra, la xilosa se encuentra dentro de los azúcares más abundantes que forman la lignocelulosa, una pentosa de cinco carbonos la cual podría ser convertida a diferentes compuestos mediante hidrólisis ácida (Montes, Ruiz, González, Cano, & Castillejos, 2018).

### 5.1.XILOSA

La xilosa es un producto de hidrólisis del xilano, que es la parte principal de la hemicelulosa presente en toda la flora, particularmente en el abedul y la caña; es el azúcar más atractivo ya que puede convertirse en etanol, furfural y xilitol (Shrotri, Kobayashi, & Fukuoka, 2017).



**Imagen 1.** Via metabólica de la Xilosa. Tomado y modificado de Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: A review (Dasgupta, Bandhu, Adhikari, & Ghosh, 2017).

La xilosa es un tipo de pentosa, su fórmula molecular es  $C_5H_{10}O_5$ ; se usa comúnmente como edulcorante de alimentos y es la fuente de xilitol. El uso de xilosa y hemicelulosa se ha convertido en foco como recurso de carbono en la industria de la fermentación y se está presentando como un "punto caliente" de investigación global para producir etanol. Comúnmente, los microorganismos industriales pueden metabolizar la glucosa para su crecimiento, pero no todos pueden utilizar xilosa (Hongzhang & Lan, 2017).

La vía metabólica de la xilosa (**Imagen 1**) *in vivo* se puede establecer brevemente de la siguiente manera; primero, la xilosa es transportada mediante una membrana especial a la célula, posteriormente es reducida a xilitol por la xilosa reductasa, el xilitol se convierte en xilulosa por la enzima xilitol deshidrogenasa y posteriormente la xilulosa generada es metabolizada por la vía de las pentosas fosfato (PPP); otro sistema de vías metabólicas de la xilosa es a través del gen de la isomerasa expresado en microorganismos (Hongzhang & Lan, 2017).

## 5.2.FUENTE DE XILOSA

Además de abedul, a partir de la hemicelulosa se puede obtener una gran variedad de productos de alto valor agregado, la estructura heterogénea incluye pentosas, hexosas y algunos ácidos, dependiendo de la biomasa de la cual provenga. Cuando este es proveniente de materiales lignocelulósicos, presenta gran cantidad de pentosas en su composición, principalmente xilanos, siendo la xilosa el segundo monosacárido más abundante en la naturaleza. Los residuos lignocelulósicos, que incluye varios desechos agrícola-forestales se presentan como materia de bajo valor monetario y con una alta disponibilidad para la producción de xilitol.

El contenido de xilosa varía según la fuente, 28-35% en la mazorca de maíz, 26- 28% en el bagazo de caña de azúcar y 21% en el pasto varilla entre otras. Principalmente uno de los desechos industriales con alta disponibilidad es el bagazo de caña de azúcar, que contiene aproximadamente 50% de celulosa, 25% de hemicelulosa y 25% de lignina y es un subproducto que se acumula en grandes cantidades, dado que se pueden generar 180-280 kg de bagazo/tonelada de caña de azúcar procesada (Cerioni, Nichio, & Santori, 2019). La glucosa y la xilosa son los monosacáridos más abundantes en la biomasa lignocelulósica y representan el 60-70 y el 30-40% de sus hidrolizados, respectivamente (S. Kwak, 2017). La

disponibilidad de esta biomasa lo convierte en un sustrato ideal para explorar los potenciales de las pentosas subutilizadas.

Recientemente, la producción de bioetanol de segunda generación (2G) a partir de residuos lignocelulósicos aumentó la conciencia sobre la posible utilización holística de esta biomasa, centrándose en la producción de etanol a través de la fermentación de xilosa por *Saccharomyces cerevisiae* genéticamente modificado, además de hexosa (Dasgupta, Bandhu, Adhikari, & Ghosh, 2017). Pero, muchos investigadores han evaluado recientemente que generar productos alternativos, como el xilitol, es una alternativa más prometedora para compensar el costo del etanol (Cheng, Wu, Lin, & Zhang, 2014).

### 5.3.XILITOL

Naturalmente, el xilitol se encuentra en pequeñas cantidades en frutas vegetales, microorganismos, tejidos animales y el cuerpo humano (Xu, Chi, Bilal, & Cheng, 2019), este poliol es un alcohol de azúcar que tiene una dulzura equivalente a la de la sacarosa, pero solo 60% de su contenido calórico, y se usa principalmente como un edulcorante natural en las gomas de mascar (Edelstein, y otros, 2008). Además de la aplicación bien establecida en la industria de alimentos y bebidas (C. Zacharis, 2012), el xilitol también encuentra innumerables otras aplicaciones comerciales en productos farmacéuticos debido a su bajo índice glucémico, alto poder de enfriamiento, metabolismo independiente de la insulina e influencia anticariogénica (Dasgupta, Bandhu, Adhikari, & Ghosh, 2017). En la industria farmacéutica también se usa para reducir el riesgo de otitis media (Ledezma-Orozco, y otros, 2018).

Con respecto a la salud dental, existe evidencia de que el uso de pasta dental con flúor y xilitol puede ser más efectivo para prevenir la caries dental, porque el xilitol puede reducir los niveles de estreptococos *mutans* en la placa y la saliva (Janakiram, Kumar, & Joseph, 2017). También se puede utilizar en la industria química como intermediario para la síntesis de polímeros (Baptista, Cunha, Romaní, & Domingues, 2018). Además, estudios han sugerido que el xilitol en la alimentación podría ser efectivo para mejorar los síntomas inducidos por la gripe cuando es suministrado junto con fracciones de ginseng rojo (Yin, Kim, & Kim, 2014), lo que indica que el xilitol podría tener un efecto protector en otras

enfermedades como en la prevención de la osteoporosis, las infecciones del oído y la inflamación en los niños (Xu, Chi, Bilal, & Cheng, 2019).

Además, el xilitol se considera uno de los 12 principales intermedios de alto valor agregado que se pueden producir a partir de la biomasa (Junior, Pacheco, Trichez, Almeida, & Gonçalves, 2019). Todas estas propiedades del xilitol hablan por sí mismas y dan una idea de por qué se espera que su demanda incremente en un mercado con consumidores que son cada vez más conscientes de la importancia de la salud y el balance del peso.

El mercado global de xilitol se estima en 190.9 mil toneladas métricas, valorado en US \$ 725.9 millones en 2016 y se espera que alcance 266.5 mil toneladas métricas valoradas en poco más de US \$ 1 mil millones para el año 2022 (Arcaño, García, Mandelli, Carvalho, & Pontes, 2020), al aumentar a una tasa de crecimiento anual robusta de alrededor del 5.7 % en términos tanto de volumen como de valor (<https://www.researchandmarkets.com/>). Otros estudios informan sobre el creciente interés comercial y científico en el xilitol lo cual ha llevado a una fuerte demanda de este producto en el mercado global, de más de 125,000 toneladas por año, con un valor relativamente alto que oscilan entre 4.5–5.5 \$ / kg para para compras a granel por compañías farmacéuticas/goma de mascar y 12 £ o 20 \$ / kg en supermercados, haciendo que sea una muy interesante y atractiva propuesta para la comercialización (Silvio Silvério da Silva, 2012).

#### 5.4. INHIBIDORES

El uso de la biomasa lignocelulósica para la producción requiere que la materia prima sea tratada previamente, como objetivo de alterar la estructura del material para mejorar su disponibilidad y que se incremente su susceptibilidad al hidrólisis enzimática. Debido a la naturaleza recalcitrante de los materiales lignocelulósicos, son usadas condiciones rigurosas que resultan en la aparición de subproductos que puede actuar como inhibidores del metabolismo microbiano (Ask, Bettiga, Mapelli, & Olsson, 2013).

El 5-hidroximetilfurfural (HMF) y 2-furaldehído (furfural), son dos de estos compuestos generados y han sido objeto de una amplia investigación por sus efectos negativos, estos inhibidores se forman como productos de deshidratación de hexosas y pentosas, y también se ha informado que inhiben el crecimiento celular, inducen daños en el ADN e inhiben varias enzimas en la glucólisis (Ask, Bettiga, Mapelli, & Olsson, 2013), esto se presenta como un

serio desafío para la viabilidad de la producción a partir de biomasa lignocelulósica; pues se ha mencionado la presencia de furfural en residuos de mazorca de maíz, cáscara de semilla de girasol, de avena, de arroz, de almendras, en bagazo de caña; también madera de eucalipto, arce, abedul, y otros (Montes, Ruiz, González, Cano, & Castillejos, 2018).

Son necesarios microorganismos con mayor capacidad para hacer frente a las limitantes que surgen en los procesos de producción, por lo cual, la comprensión de las respuestas fisiológicas al HMF y al furfural son de gran importancia. *Saccharomyces cerevisiae* ha mostrado la capacidad de transformar HMF y furfural en compuestos con menor capacidad inhibitoria, teniendo en cuenta que no supere niveles letales, hipotéticamente se ha propuesto un mecanismo de conversión intracelular de HMF y furfural, el cual sugiere una reducción dependiente de NAD(P)H y la oxidación dependiente de NAD(P)<sup>+</sup> por las oxidorreductasas en condiciones anaerobias y el metabolismo respiratorio, en bacterias también se ha demostrado la participación de reacciones redox dependientes de NAD(P)H para la conversión de aldehído de furano; por lo anterior, parece ser importante la disponibilidad de cofactores redox reducidos en la desintoxicación de aldehídos (Ask, Bettiga, Mapelli, & Olsson, 2013).

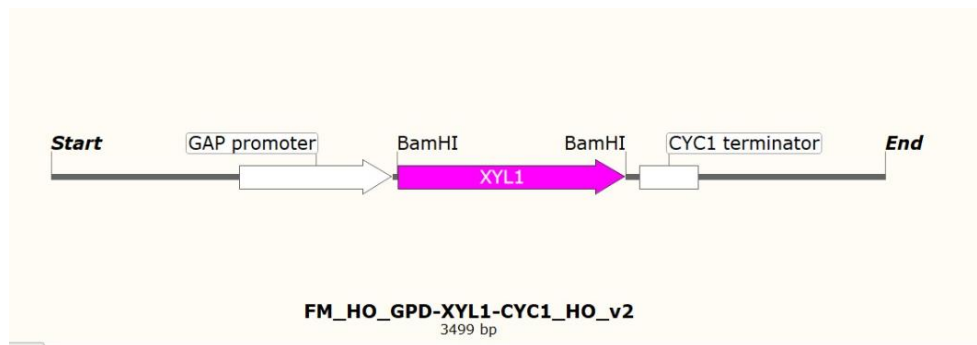
### 5.5.MICROORGANISMOS

Se han reportado géneros *Candida*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* y *Spathaspora* (Junior, Pacheco, Trichez, Almeida, & Gonçalves, 2019) que presentan la capacidad de asimilación de xilosa como fuente de carbono y producir xilitol; algunas levaduras productoras de xilitol, como *P. stipitis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *D. hansenii* y *K. marxianus*, se han estudiado para la optimización de los parámetros de fermentación, la utilización de diversos nutrientes y la fermentación de hidrolizado hemicelulósico rico en xilosa obtenido de diferentes fuentes de biomasa pretratada (Kogje & Ghosalkar, 2016). La xilosa fermentada por las cepas de *Candida*, ingresa a la vía de la pentosa fosfato mediante la utilización de las enzimas xilosa reductasa para generar xilitol seguido de la conversión a xilulosa a través de la xilitol deshidrogenasa.

Estas levaduras suelen utilizar la xilosa para el crecimiento y mantenimiento general de las células, el xilitol permanece en el caldo de fermentación como un subproducto debido a un mecanismo de desequilibrio del cofactor existente entre la xilosa reductasa y la xilitol

deshidrogenasa, lo que resulta en una generación excesiva de xilitol; *Candida* han mostrado rendimientos de producción que varían del 19% al 72% del máximo teórico (Junior, Pacheco, Trichez, Almeida, & Gonçalves, 2019). Una segunda cepa de levadura que puede metabolizar la xilosa es *Phaffia rhodozyma*, produciendo astaxantina que tiene un alto valor de mercado en alimentos para acuicultura (Stoklosa, Nghiem, & Latona, 2019).

*Saccharomyces cerevisiae* no consume xilosa de forma natural, por lo tanto, para que esta pueda ser usada en fermentaciones con fracción hemicelulósica compuesta principalmente de xilosa se han realizados estudios para desarrollar cepas con la capacidad de consumir xilosa y de tener una fuerte resistencia a los compuestos inhibidores. Se han descrito dos vías diferentes expresadas en *S. cerevisiae* para convertir la xilosa en xilulosa; la vía de la oxidorreductasa es utilizada por muchas especies de levadura que fermenta xilosa y consiste en dos reacciones enzimáticas catalizadas por la xilosa reductasa (XR) dependiente de NADPH como cofactor y la xilitol deshidrogenasa (XDH) dependiente de  $\text{NAD}^+$  como cofactor, esta dependencia actúa como desequilibrio de cofactor que generalmente causa la acumulación de xilitol (Cunha, Soares, Romaní, Thevelein, & Domingues, 2019). En informes anteriores se ha expuesto que la XR de *P. stipitis* se ha clonado y sobreexpresado en *S. cerevisiae* para el metabolismo de la xilosa; Chu y Lee (2007) han proporcionado una revisión detallada sobre las diversas estrategias de ingeniería genética de *S. cerevisiae* y la fermentación de medios que contienen xilosa (Kogje & Ghosalkar, 2016).



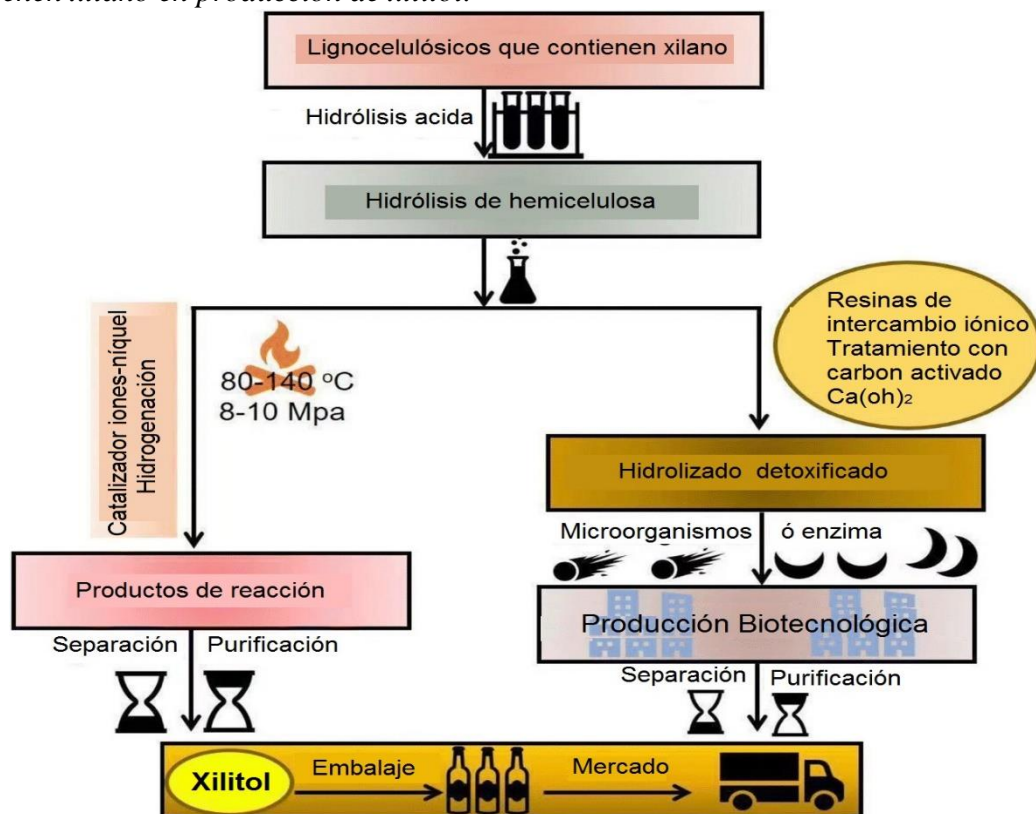
**Imagen 2.** Resultado de la transformación. Gen *xyl1* localizado en el locus HO del genoma de *S. cerevisiae* (Mello y colaboradores).

*S. cerevisiae* es una fábrica de células microbianas indispensable en las industrias actuales de biotecnología y alimentación, especialmente como productor de etanol, debido a su alta tasa de fermentación y además tiene ventajas sobre los microorganismos innatos que utilizan

xilosa con respecto a la robustez frente al estrés ambiental en entornos industriales, incluida la tolerancia a la alta concentración de productos alcohólicos, pH bajo, presión osmótica alta y contaminación de fagos (S. Kwak, 2017). Se han desarrollado cepas mejoradas a partir de esta levadura, como lo es el caso de la evaluada en este trabajo; FMYX que es un linaje segregado de la cepa industrial brasilera SA (Basso, de Amorim, de Oliveira, & Lopes, 2008) que cuenta con características robustas como se mencionó anteriormente (Dijken, y otros, 2000) las cuales consumen xilosa para producir xilitol mediante la transformación llevada a cabo por Mello y colaboradores (datos no publicados) adaptando el método PEG/LiAc utilizando un sistema CRISPR/Cas9 (Laughery, y otros, 2015), expresando así la XR (Gen *xyl1* de *Pichia stipites* (Amore, Kötter, Küster, Ciriacy, & Hollenberg, 1991) ) en estas levaduras; el resultado de la transformación es el casete de expresión del gen localizado en el locus HO del genoma de la levadura que puede observarse en la **Imagen 2**.

## 5.6.PRODUCCIÓN DE XILITOL

**Figura 1.** Rutas químicas y biotecnológicas para la conversión de lignocelulósicos que contienen xilano en producción de xilitol.



Tomado y modificado de: *Biosynthetic strategies to produce xylitol: an economical venture.* (Xu, Chi, Bilal, & Cheng, 2019).

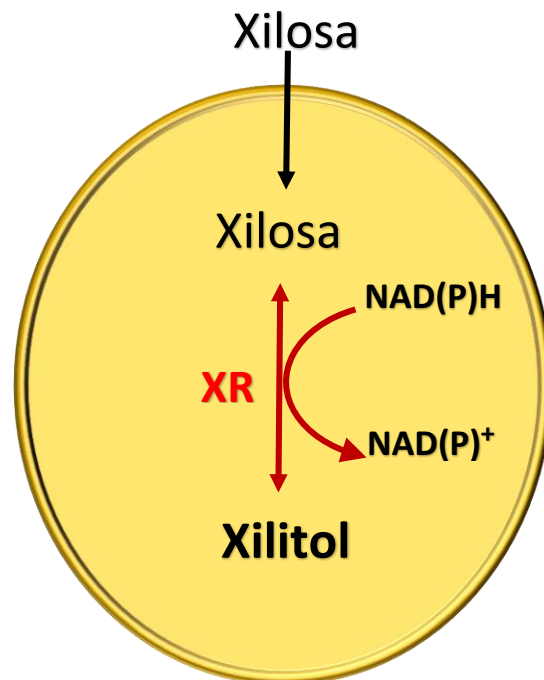


Las rutas químicas y biosintéticas (**Fig. 1**) que usan D-xilosa, glucosa o hidrolizado de biomasa como materia prima pueden producir xilitol; entre estos métodos, la producción microbiana de xilitol ha recibido una atención significativa debido a su amplia disponibilidad de sustrato, fácil de operar y de naturaleza ecológica, en contraste con el método químico de alto costo, consumo de energía y contaminante del medio ambiente. Aunque se han hecho grandes avances en los últimos años para la biosíntesis de xilitol a partir de xilosa, glucosa e hidrolizado de biomasa, y el rendimiento y la productividad del xilitol se mejoran sustancialmente mediante la ingeniería metabólica y la optimización de los parámetros clave de la ruta metabólica, todavía está muy lejos de la biosíntesis de xilitol a escala industrial, por el contrario, la síntesis química de xilitol a partir de xilosa sigue siendo la ruta dominante (Xu, Chi, Bilal, & Cheng, 2019).

Actualmente, los principales productores de xilitol son China y los Estados Unidos, donde las mazorcas de maíz y las maderas duras se utilizan como materia prima, respectivamente (Ravella, Gallagher, Fish, & Prakasham, 2012). La xilosa, purificada de las fracciones de hidrolizado hemicelulósico, se convierte en xilitol mediante una reacción catalítica química. Brevemente, la D-xilosa pura se somete a un proceso de hidrogenación química en presencia de un catalizador de níquel a temperatura severa (140-200 °C) y alta presión (50-60 bar), con purificación aguas abajo; esta tecnología presenta ciertas restricciones, como requisitos de alta presión, temperatura, catalizador costoso y amplias operaciones posteriores de purificación. Las rutas biotecnológicas que involucran condiciones de proceso más suaves se han considerado un posible reemplazo para el método convencional, ya que puede basarse en una mezcla de azúcares y ahorrar en energía y costos de purificación de sustrato (Winkelhausen & S. Kuzmanova, 1998).

Se han informado procesos microbianos que usan bacterias, hongos y levaduras para la producción de xilitol, siendo los últimos considerados los mejores productores entre los microorganismos (Rafiqul & Sakinah, 2013), principalmente debido a sus altas tasas de asimilación de pentosa, productividad de xilitol y niveles de expresión estables de XR y XDH; la producción de xilitol por las levaduras de tipo salvaje y de ingeniería ha sido ampliamente estudiada e informada en la literatura (Xu, Chi, Bilal, & Cheng, 2019). La D-xilosa se reduce en un solo paso a xilitol por la enzima xilosa reductasa dependiente de

NADH/NADPH (XR; EC 1.1.1.21), que se secreta u oxida subsecuentemente en xilulosa a través de xilitol deshidrogenasa (XDH; EC 1.1.1.9) (Winkelhausen & S. Kuzmanova, 1998). En la **Imagen 3** se presenta la ruta metabólica de consumo de xilosa para la obtención de xilitol en levaduras que han sido mutadas o modificadas para mejorar su condición de asimilación de fuentes de carbono y que expresan solo la enzima xilosa reductasa, esta vía se resume a un solo paso de reducción de la xilosa a xilitol mediante la XR usando NADPH como cofactor, el desequilibrio de cofactor resulta en la secreción de xilitol como un subproducto de fermentación de D-xilosa.; este es el caso de la cepa de levadura evaluada en el presente trabajo.



**Imagen 3.** Vía de producción de xilitol mediante la expresión de la enzima xilosa reductasa (S. Kwak, 2017)

## 6. MATERIALES Y METODOS

### 6.1. Preparación-tratamiento de material y área de trabajo.

Se prepararon los medios:

- YPD: extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, glucosa 20 g/L. Usado para el crecimiento de células del pre-inoculo, para posteriormente realizar el inoculo en cada uno de los ensayos de fermentación.
- YPDX: extracto de levadura 10 g/L, peptona 20 g/L, glucosa 30 g/L, D-xilosa 20 g/L. Usado como medio de producción para evaluación de la capacidad fermentativa de la xilosa, y determinar las mejores condiciones de producción de xilitol por parte de la cepa trabajo.
- YPDX + Inhibidor: YPDX más cada una de las diferentes concentraciones de HMF y Furfural, siendo así medios YPDX con un inhibidor a distinta concentración (**Tabla I. Concentraciones**); para la elaboración de este medio se preparó YPDX a doble concentración (2X) y se diluyó a volumen 1:1 con los inhibidores preparados también a doble concentración de la requerida, las soluciones preparadas de cada inhibidor se pasaron por filtros estériles de 0,22  $\mu\text{m}$ . Este medio se usó en las fermentaciones realizadas para evaluar la influencia de inhibidores en la producción de xilitol.

Puntas de micro-pipeta, viales, corchos, papel semipermeable, gasa, agua destilada, fueron esterilizados en autoclave. Erlenmeyer esterilizados en horno. El área de trabajo antes de realizar cada fermentación se limpió, se pasó alcohol al 70% a la cabina de flujo, se colocó el material no biológico de trabajo a usar en cada experimento dentro de la cabina, incluyendo jeringas, filtros 0,22  $\mu\text{m}$  y se encendió la luz UV durante 20 minutos. Igualmente, se hizo debido uso de indumentaria de trabajo de laboratorio, bata, tapabocas, guantes y cofia; se tomaron las precauciones pertinentes para evitar contaminación o daño personal. Así mismo el uso debido de los equipos siguiendo las recomendaciones del personal encargado; espectrofotómetro, Centrifuga, Shaker, HPLC, Cabina de Flujo, balanza analítica.

### 6.2. Estudio del caso y cepa de trabajo

Se hizo revisión bibliográfica y presentación acerca de por qué y cómo se puede producir xilitol usando *S. cerevisiae*. Los ensayos se realizaron testando una cepa mutante de la levadura *S. cerevisiae* industrial (SA-1), previamente modificada mediante el método

PEG/LiAc utilizando un sistema CRISPR/Cas9 (Laughery, y otros, 2015), dando como resultados el linaje nombrado como FMYX; levadura con capacidad para metabolizar la xilosa y producir xilitol mediante la expresión de la enzima Xilosa Reductasa (Mello y colaboradores, datos no publicados). *S. cerevisiae* FMYX (FMY001 MATa/MAT $\alpha$  ho $\Delta$ ::*xyII*), parental de la cepa industrial FMY001 derivada de la SA-1, ploidía MATa/MAT $\alpha$ , gen de la XR insertado en el locus OH (ho $\Delta$ ::*xyII*).

### **6.3.Preparación del Inoculo (Pre-inoculo)**

Las células de levadura para la inoculación, se cultivaron en medio YPD durante la noche (overnight) a 30 °C y 250 rpm de agitación orbital, se realizó pre-inoculo por duplicado de la cepa FMYX; el pre-inoculo se verifico mediante visualización de células en microscopio y mediante centrifugación de células en viales de 2 mL y así confirmar la ausencia de contaminación; posteriormente se midió la OD (Densidad Óptica) a 600 nm en el espectrofotómetro usando como blanco el medio YPD, y con base en ese valor se calculó el volumen de inocuo a usar para llevar a la OD inicial requerida. Este mismo procedimiento para cada una de las fermentaciones realizadas en el transcurso del trabajo.

### **6.4.Ensayos de fermentación y evaluación de las mejores condiciones para producción de xilitol**

La primera serie de fermentaciones (Fermentación “Anaerobia”), se realizó por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 ml, sellados con un tapón de goma para evitar la entrada de oxígeno y generar un ambiente anaerobio (el oxígeno inicial no se eliminó, para permitir el crecimiento celular al comienzo del cultivo). El volumen final de trabajo fue de 80 ml, y el cultivo se realizó a 30 °C y 250 rpm de agitación orbital. El medio de fermentación fue YPDX (glucosa 30 g/L, D-xilosa 20 g/L), el volumen de inoculó se determinó con base en los cálculos de la OD del pre-inoculo, usando OD iniciales de 0,5 y 1. La fermentación duro aproximadamente 105 h usando Erlenmeyer de 250 ml; 3 por cada OD y 1 como control conteniendo medio sin inoculo. Se recolectaron muestras periódicamente (un punto en la mañana y otro en la tarde), para el análisis por HPLC y medición de OD.

Se realizó una segunda fermentación “Mixta”, realizando el mismo procedimiento anteriormente descrito, pero cambiando el ambiente anaerobio; inicialmente los corchos de goma se sustituyeron por papel semipermeable durante las primeras 4 h para luego, usar los

corchos de goma hasta el final de la fermentación; se recolectaron las muestras periódicamente durante aproximadamente 105 h para análisis en HPLC y medición de OD.

Una tercera fermentación aerobia se realizó, usando esta vez corchos de gasa durante toda la fermentación, aproximadamente 105 h, se recolectaron periódicamente las muestras y se midió la OD de estas. Todas las muestras sin procesar se guardaron y se mantienen a -20 °C. Tomando como referencia el control que contenía solo medio de cultivo, y que no mostró cambio que indicara crecimiento, se contrastó y tomó como positivo aquellos Erlenmeyer que indicaron la presencia de turbidez, para posteriormente medir en el espectrofotómetro y análisis en HPLC.

### 6.5. Influencia del HMF y Furfural

Se realizó un primer ensayo para la producción de xilitol, en medios definidos que contienen diferentes concentraciones de HMF y Furfural, testando las cuatro primeras concentraciones de los inhibidores mostrados en la **Tabla I**. Un segundo ensayo fue realizado por triplicado para cada una de las concentraciones de los inhibidores, haciendo uso de Erlenmeyer de 125 ml a 30 °C y 250 rpm, con 20 ml de volumen de trabajo, el medio usado fue YPDX + Inhibidor. La cepa fue analizada en crecimiento aeróbico y una OD inicial de 1, siendo la condición de control el medio YPDX con inoculo y ausencia de HMF/Furfural; las muestras fueron recolectadas después de 100 h. Se tomó como referencia el control que contenía medio de cultivo más inoculo y sin inhibidor, se comparó y tomó muestras con presencia de turbidez midiendo su densidad óptica, posteriormente análisis en HPLC de las muestras del primer ensayo, las muestras restantes se conservaron a -20 °C.

**Tabla I.** Concentración de HMF y Furfural

Furfural (mM)	Concentración (g/L)	HMF (mM)	Concentración (g/L)
2,5	0,24	5	0,63
5	0,48	10	1,26
10	0,96	20	2,42
20	1,92	40	5,04
40	3,84	60	7,56
60	5,76	80	10,09

Fuente: Autor.

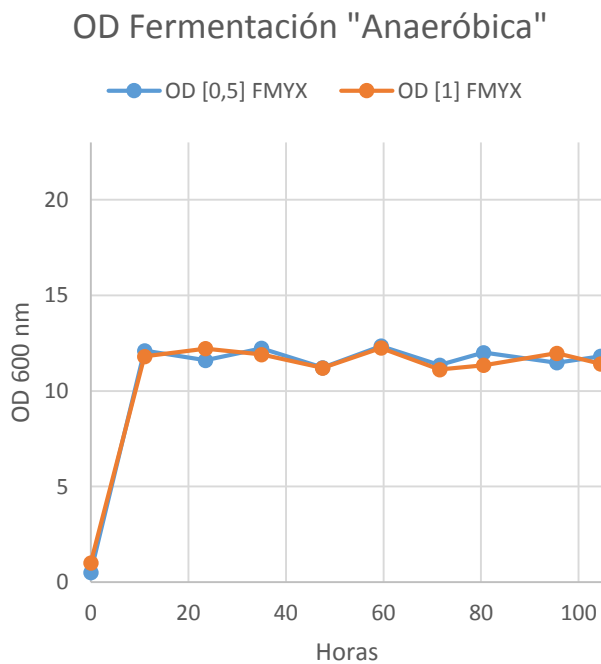




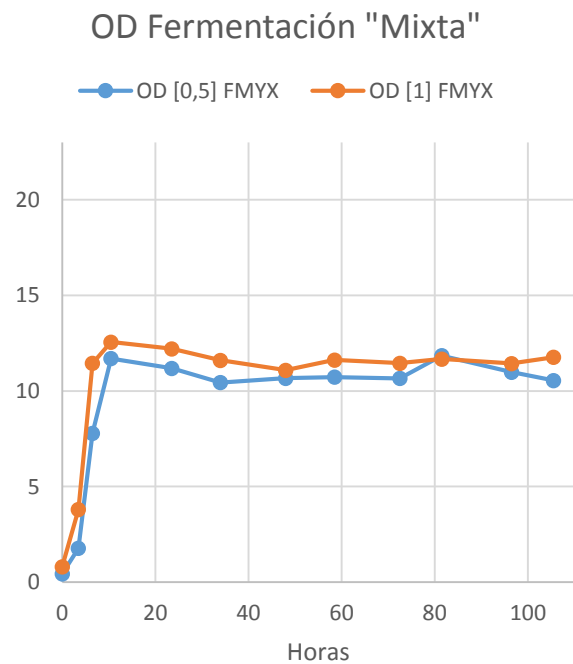
## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Evaluación y determinación de las mejores condiciones de producción de xilitol: análisis del comportamiento de la OD

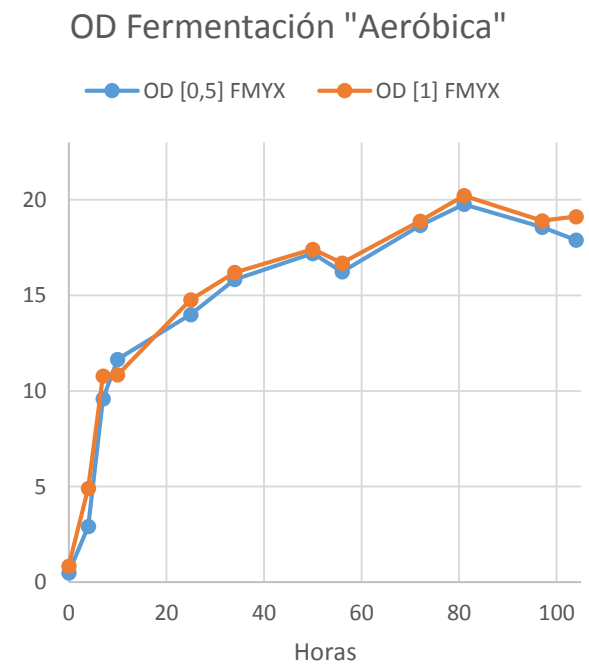
Los resultados de densidad óptica obtenidos a partir de los ensayos de fermentación, demostraron que existe variabilidad en la biomasa obtenida en función de las condiciones de incubación que se establecen para el cultivo de la levadura en el medio de fermentación (YPDX) para la producción de xilitol, que, al ser un metabolito primario, deriva de la ruta central del metabolismo.



**Gráfico 1.** Comportamiento de la densidad óptica en el primer ensayo de fermentación usando corchos de goma y el medio YPDX. Fuente: Autor.



**Gráfico 2.** Comportamiento de la densidad óptica en el segundo ensayo de fermentación en el cual se usó papel semipermeable y corchos de goma y el medio YPDX. Fuente: Autor.



**Gráfico 3.** Comportamiento de la densidad óptica en el tercer ensayo de fermentación en el cual se usó corchos de gasa y el medio YPDX. Fuente: Autor.



Los diferentes cambios en la preparación de los Erlenmeyer usando corchos de goma, papel semipermeable y gasa, generaron distintos ambientes que influyen directamente en la cantidad de la biomasa obtenida y por tanto en la cantidad de xilitol producida, asociado a la disponibilidad de oxígeno para el crecimiento de la levadura. Se realizaron tres fermentaciones por triplicado empleando dos concentraciones de inóculo de la cepa (OD 0,5 y 1), los datos de OD recolectados fueron promediados y graficados (1-3).

Las gráficas de la primera y segunda fermentación, usando los corchos de goma y papel semipermeable, respectivamente, demuestran un comportamiento similar en al aprovechamiento de la fuente de carbono, creciendo aceleradamente a partir del pre-inóculo depositado a concentraciones de 0,5 y 1 OD observado en las primeras 11 h, de este modo alcanzo en promedio una densidad de aproximadamente 11u, posteriormente durante lo que resta en tiempo de la fermentación, el crecimiento se estabiliza, posiblemente en función del consumo del oxígeno disponible en el matraz, lo que demuestra que la cepa emplea la fuente de carbono para crecer agotando el oxígeno disponible (**Tabla 2 y 3**, Anexos).

Las dos primeras fermentaciones permiten observar que la deficiencia en el suministro de oxígeno limita la capacidad de crecimiento de la levadura condicionando la producción de xilitol. La condición de anaerobiosis inducida genera un estado de crecimiento estacionario que se refleja en un crecimiento constante sin aumentos significativos en la biomasa presente, lo que afectaría la producción de xilitol, al ser un metabolito dependiente de la ruta central del metabolismo.

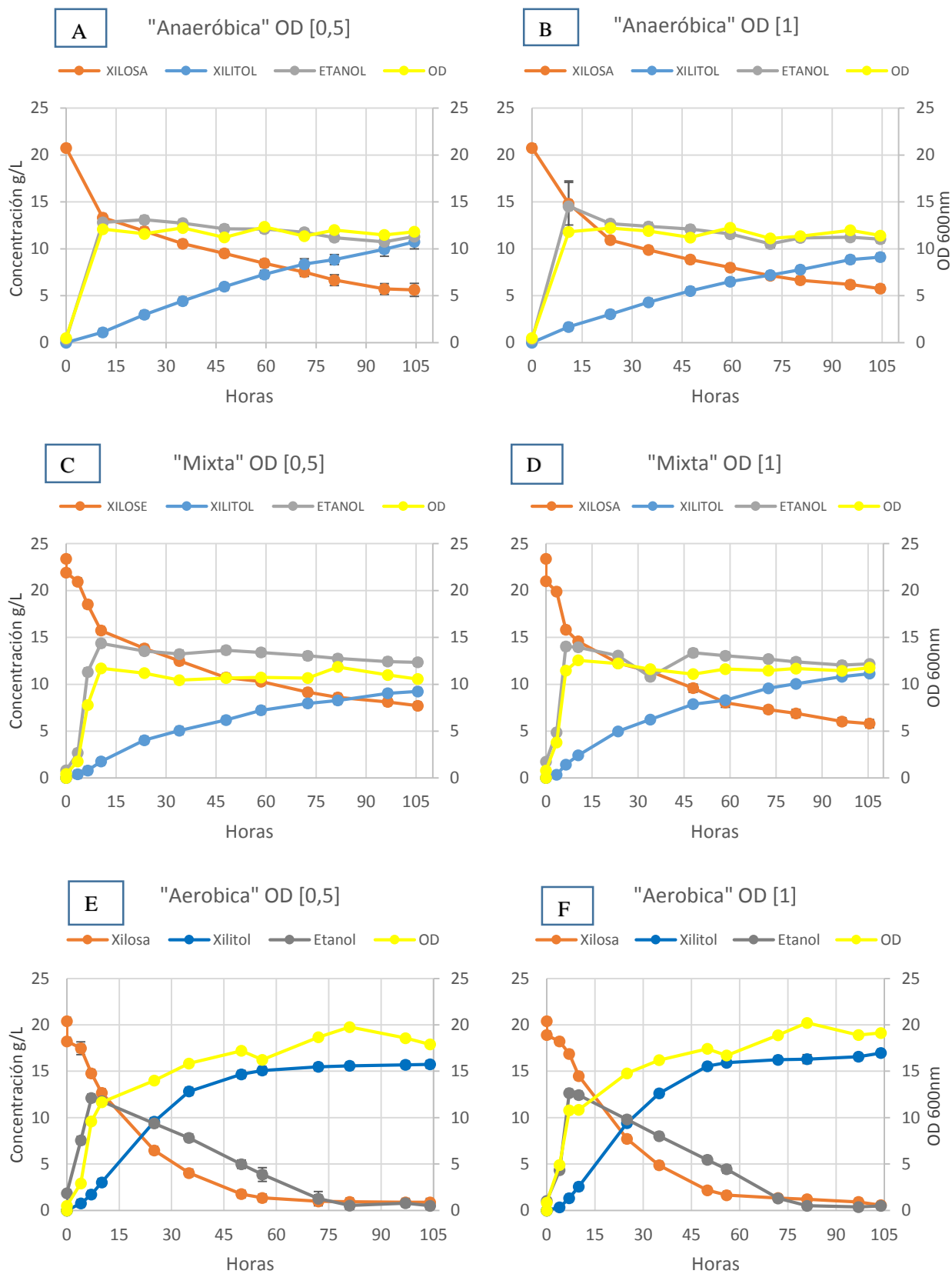
En el tercer ensayo de fermentación (**Gráfico 3**) permitió apreciar una mejoría notable en la capacidad de la levadura de crecer en presencia de oxígeno disponible gracias a los tapones de gasa dispuestos en la fermentación, en comparación con las dos anteriores fermentaciones, se observa un aumento notable de OD llegando, aproximadamente, a valores de 20 (Anexos **Tabla 4**). Estas condiciones promovieron una efectiva utilización de la fuente de carbono en la obtención de xilitol, las condiciones y ajustes realizados al envasado, agitación y temperatura, promovieron un aumento en la densidad celular, estableciéndose que las

levaduras que fermentan D -xilosa requieren oxígeno para crecer en el azúcar como ya sido reportado anteriormente (Jin, Laplaza, & Jeffries, 2004).

#### *7.1.1. Evaluación y determinación de las mejores condiciones de producción de xilitol: análisis cuantificación HPLC*

A partir de haber establecido las mejores condiciones para el crecimiento de la levadura FMYX derivada de la cepa industrial, se procedió a determinar la producción de xilitol obtenida a partir del medio de fermentación (YPDX), analizándose el producto de la fermentación mediante HPLC, como se puede observar a continuación, en la gráfica 4, las fermentaciones demuestran que la levadura consume paulatinamente la fuente de carbono produciendo xilitol a medida que crece, sin embargo, se observa una diferencia significativa entre las fermentaciones anaerobias (A y B) y aerobica (C) en la producción de xilitol y la producción codominante de etanol, puesto que esta última, presentó un rápido consumo de la fuente de xilosa durante el transcurso de las primeras horas de fermentación con un aumento gradual en la concentración de xilitol e igualmente una baja concentración de alcohol (**Grafico 4**).

Los datos obtenidos en las fermentaciones anaeróbicas (**Grafico 4-AyB**), en ambas concentraciones de inoculación de la levadura presentaron un comportamiento similar en el consumo de la xilosa y la producción de xilitol y etanol; los niveles de etanol llegaron a un pico máximo entre las primeras 11 y 24 h de fermentación, luego se observa un descenso lento; el xilitol sigue solo un comportamiento creciente durante todo el proceso de fermentación sin picos drásticos relevantes y la xilosa mostró un decrecimiento, indicado que efectivamente la levadura metabolizó la xilosa, pero no en su totalidad, pues al final de las fermentaciones aún se registró presencia de 5,6 y 7,7 g/L de xilosa, respectivamente (**Tabla 5, anexos**), lo que sugiere que posiblemente las condiciones de fermentación no fueron las ideales para la transformación total de la xilosa a xilitol.



**Gráfico 4.** Valores del análisis HPLC. Se muestra el comportamiento de las concentraciones de xilosa, xilitol, etanol presente en las muestras recolectadas durante la realización de las fermentaciones en el medio YPDx con concentraciones de inóculo del 0,5 y 1 OD, además se muestra el incremento de la biomasa en unidades de OD. **A y B)** Fermentación (Anaeróbica) con uso de corchos de goma. **C y D)** Fermentación (Mixta) con uso de papel semipermeable, corchos de goma. **E y F)** Fermentación (Aeróbica) con uso de corchos de gasa. Fuente: Autor.

**Gráfico 4-CyD** mostró un comportamiento similar de los resultados con la fermentación anaerobia (**A y B**), indicando nuevamente que las condiciones no fueron las ideales para que la levadura consiguiera metabolizar el total de la xilosa y lograr mejorar los valores de xilitol producido. Los resultados obtenidos en la fermentación aeróbica, donde se emplearon tapones de gasa, demostraron una utilización efectiva de la fuente de carbono en la obtención de xilitol e igualmente una baja concentración de etanol que llega casi a su eliminación al término del proceso fermentativo (**Gráficos 4-E y F**), estas condiciones son ideales para producir el edulcorante, demostrándose que dicha fermentación es dependiente del crecimiento de la levadura en el medio de producción (YPDX).

Las condiciones ideales de fermentación para un mayor rendimiento en la producción de xilitol fueron bajo un ambiente de aireación, 30°C, 250 rpm y un OD inicial de 1, lográndose obtener la mayor concentración de xilitol (16,97g/L), rendimiento de xilitol producido, porcentaje de eficiencia del rendimiento obtenido y mayor valor de productividad (**Tabla 1**) „, siendo coherente con lo reportado en otros estudios que establecen una mayor absorción de azúcar como consecuencia de una mayor aireación; asociada a tasas de crecimiento más altas (Jin, Laplaza, & Jeffries, 2004) y una producción de xilitol mayor, a diferencia de la producción en condiciones anaerobias (Nuñez Díaz, 2017). Valor de productividad mayor comparado a reportes de estudios con *P. pastoris* (Handumrongkul C, 1998) y *S. cerevisiae* con expresión de otros genes (Toivari MH, 2007). También se ha informado que la aireación es un factor importante para el correcto transporte de xilosa al interior celular y el funcionamiento de las enzimas involucradas en la conversión (Ledezma-Orozco, y otros, 2018). La aireación provista en las fermentaciones anaerobias se dan durante un lapso de tiempo muy corto, asumiendo que la levadura agota el oxígeno disponible en el matraz y

potencia su crecimiento logarítmico durante las primeras 4 horas de fermentación; posteriormente, al agotarse el oxígeno disuelto, posiblemente se indujo un Efecto Pasteur (Santos, Borém, & Caldas, 2015) que potencia la fermentación alcohólica (Jin, Laplaza, & Jeffries, 2004), a diferencia del comportamiento observado en la fermentación aeróbica, transcurridas las primeras horas se llega a un pico máximo de concentración similar a las fermentaciones anaeróbicas, pero posteriormente va disminuyendo hasta valores mínimos de concentración.

**Tabla 1.** Tabla comparativa de producción de Xilitol según las condiciones usadas en las fermentaciones

Condiciones	Xilosa consumida (%)	Título de Xilitol (g.L <sup>-1</sup> )	R <sub>p/s</sub> (g.g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Eficiencia (%) <sup>b</sup>	P <sub>xilitol</sub> (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>
<i>OD inicial [0,5]; Anaerobiosis</i>					
FMYX	72,941	10,747	0,709	71,971	0,103
<i>OD inicial [1]; Anaerobiosis</i>					
FMYX	72,267	9,125	0,607	71,306	0,087
<i>OD inicial [0,5]; Mixta</i>					
FMYX	66,909	9,235	0,650	66,031	0,087
<i>OD inicial [1]; Mixta</i>					
FMYX	75,107	11,132	0,733	74,121	0,106
<i>OD inicial [0,5]; Aerobiosis</i>					
FMYX	95,227	15,74	0,906	94,446	0,151
<i>OD inicial [1]; Aerobiosis</i>					
FMYX	97,038	16,97	0,924	95,746	0,163

**a** Rendimiento de xilitol producido en xilosa consumida

**b** Porcentaje de eficiencia del rendimiento obtenido y el máximo teórico de xilitol sobre xilosa

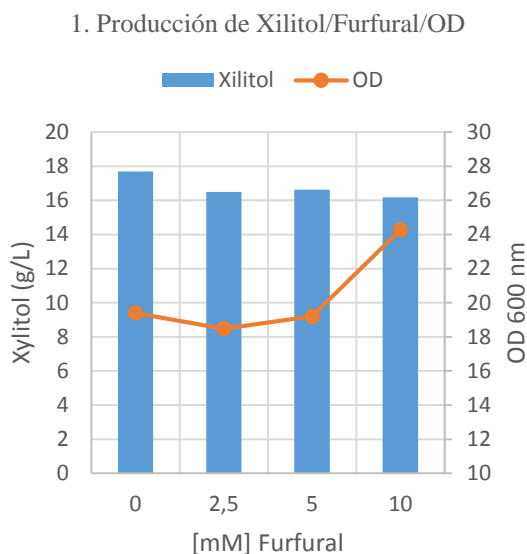
**c** Productividad de xilitol en horas

Fuente: Autor.

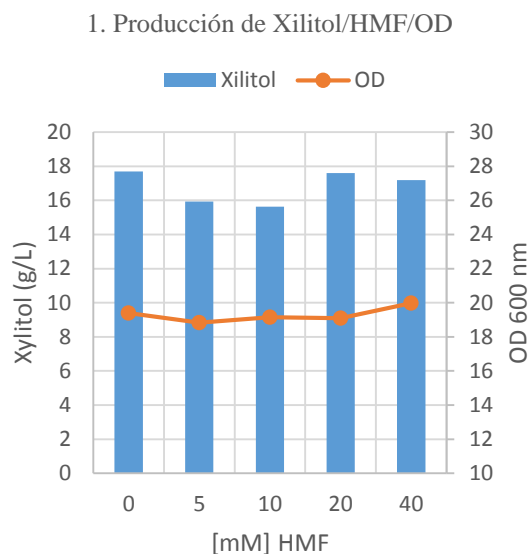
### 7.2. Influencia de HMF y Furfural en la producción de Xilitol

La influencia de HMF y furfural en la producción de xilitol fue determinado empleando las mejores condiciones de crecimiento establecidas en ensayos anteriores, siendo así OD 1 inicial, 30°C, 250 rpm y ambiente aerobio, al medio de cultivo (YPDX) fue adicionado

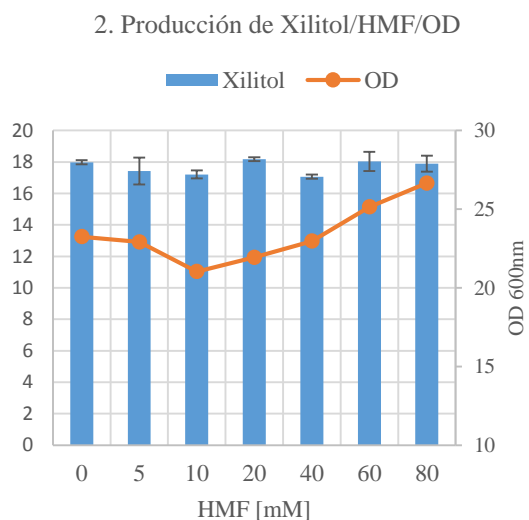
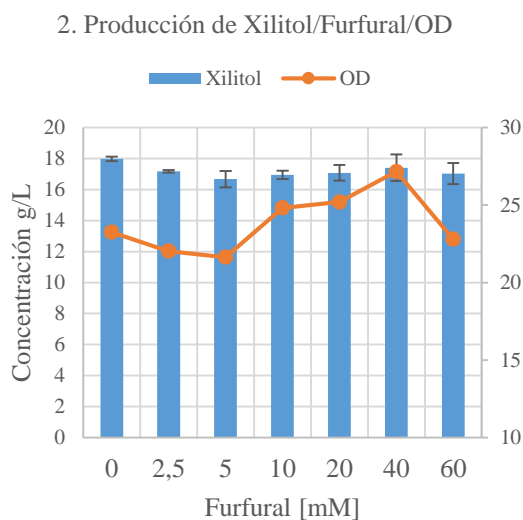
concentraciones de HMF y furfural, después de 105 h de fermentación se obtuvo los datos de OD y posterior análisis en HPLC que determinó la concentración de xilitol obtenida.



**Gráfico 5.** Efecto del furfural en la producción de xilitol, primera fermentación con inhibidores. Fuente: Autor.



**Gráfico 6.** Efecto del HMF en la producción de xilitol, primera fermentación con inhibidores. Fuente: Autor.



**Gráfico 7.** Efecto del Furfural y HMF en la producción de xilitol, segunda fermentación con inhibidores. No se presentó diferencia significativa entre los datos ( $P < 0.05$ ). Fuente: Autor.

El **Gráfico 5** permitió observar como la presencia de furfural genera un descenso en la producción de xilitol al comparar con el control (concentración 0 del inhibidor), el aumento

de la concentración del furfural disminuye la concentración de xilitol cuantificado al final de la fermentación. Se infiere que a mayor concentración presente del inhibidor furfural se reduce la producción de xilitol. Se ha reportado que la presencia de compuestos inhibidores como el ácido acético, el furfural y el HMF afecta la capacidad fermentativa, reduciendo el consumo de xilosa (Cunha, Soares, Romaní, Thevelein, & Domingues, 2019), inhibiendo el crecimiento celular, generando daños en el ADN e inhibiendo varias enzimas en la glucólisis (Ask, Bettiga, Mapelli, & Olsson, 2013).

La presencia de HMF en el medio de crecimiento no mostró comportamiento uniforme de aumento o disminución en la producción de xilitol, pues como muestra el **Gráfico 6** se observó un decrecimiento notorio en 5 y 10 mM, en menor medida en 40 mM y sin afección evidente en 20 mM del inhibidor.

En la segunda fermentación con inhibidores se logró testar concentraciones adicionales de los inhibidores y así ampliar el rango de análisis de la influencia sobre la producción de xilitol. El **Gráfico 7** muestra los valores de OD y xilitol obtenido al final de la fermentación; la presencia de furfural disminuyó la OD en las primeras 2 concentraciones usadas, posteriormente muestra un aumento por encima del punto control en las concentraciones 10, 20 y 40 mM del inhibidor, posiblemente la levadura logro tolerar esas concentraciones, en la concentración 60 mM mostro una OD muy similar a la del control. No se puede afirmar que la presencia del inhibidor indujo en un mayor número celular ya que la su conversión pudo resultar en la presencia de moléculas interferentes en la lectura de OD. La OD en presencia de HMF disminuyó en las concentraciones 5 y 10 mM, y posterior un incremento con el aumento de concentración del inhibidor.

Los valores de concentración de xilitol fueron menores en presencia de furfural comparadas con el control, mostrando una menor influencia a 40 mM de furfural; en presencia de HMF solo se evidencio decrecimiento en las concentraciones 5, 10 y 40 mM mostrando menor influencia de este inhibidor. Se ha demostrado que *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de convertir HMF y furfural en compuestos menos inhibidores *in situ* (Ask, Bettiga, Mapelli, & Olsson, 2013). La presencia de inhibidores influyó en la fermentación para algunas concentraciones testadas al comparar con la muestra control. Sin embargo, los valores de concentración de xilitol en presencia de inhibidores no mostraron diferencia significativa, lo

que indica que posiblemente por sus características industriales la cepa FMYX es más tolerante ante la presencia de inhibidores, en especial a HMF. Los valores de OD no mostraron una tendencia que permita inferir que un incremento o disminución indique mayor o menor producción de xilitol.

Todos los experimentos realizados permitieron evidenciar la capacidad de fermentación de xilosa y producción de xilitol del linaje FMYX, resultados que se esperaban obtener de una cepa mejorada de la industrial (SA-1), la cual debe mostrar ventajas en cuanto a rendimiento y efectividad en la producción debido a sus características robustas ya descritas, sin embargo, se debe hacer continuidad al estudio para evaluar más a fondo las capacidades de producción de esta cepa, tal como sería en material lignocelulósico.

A partir de los ensayos de fermentación realizados con la cepa mutante de *S. cerevisiae* FMYX (FMY001 MATa/MATa *hoΔ::xyl1*) se evidenció que, a medida que se permitía una mayor disponibilidad de aireación en las fermentaciones se incrementaba la biomasa, mejorando el rendimiento en la producción del xilitol, igualmente se observó cambios significativos en los ensayos fermentativos y alto grado de tolerancia en presencia de diferentes concentraciones de inhibidores. En estudios se ha reportado que cultivando a *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de HMF y furfural, las concentraciones intracelulares de los cofactores redox y las cargas de reducción catabólica y anabólica son significativamente menores en presencia de aldehídos de furano que en cultivos sin inhibidores, mientras que los efectos sobre el metabolismo energético son menos evidentes (Ask, Bettiga, Mapelli, & Olsson, 2013).

Las características de producción de xilitol y la tolerancia a diferentes concentraciones de inhibidores presentes en compuestos lignocelulósicos del linaje FMYX permitirían la conversión de la xilosa presente en desechos agroindustriales, el cual podría ser un método efectivo para mitigar tanto el impacto ambiental de los desechos agroindustriales (Acosta, Batista de Almeida, Giulietti, Frade, & Nápoles, 2005) como los altos costos en los procesos químicos de producción de xilitol, pues como se ha observado hasta el momento la levadura tiene la capacidad de transformar la xilosa en xilitol y se han evaluado cuáles podrían ser las condiciones ideales de fermentación a ser usadas en el proceso de bioconversión. Así, se podría usar el bagazo de caña el cual tiene un contenido alto de xilosa y es altamente generado



en grandes campos como la producción de azúcar y etanol de primera generación. También se recalca que esta cepa mutante se podría usar para la producción de etanol de segunda generación a partir del bagazo, pues en los ensayos realizados mostro esa capacidad de producción.

## 8. CONCLUSIÓN

Se demostró la capacidad de consumo de xilosa y producción de xilitol por parte de la cepa mutante de *S. cerevisiae* FMYX mediante las diferentes formas de acondicionamiento fermentativo, principalmente en función de la cantidad de aire disponible en el ambiente de los diferentes ensayos, diferenciando así las cantidades de xilitol producido al final de estos, siendo la misma, la condición ideal para su obtención.

La condición ideal en la producción de xilitol evidentemente se determinó como aeróbica, acompañado de una OD inicial de 1, lo cual permitió obtener el mayor valor de concentración al final de la fermentación.

Los ensayos de inhibición demostraron que la cepa FMYX presenta una alta capacidad de tolerancia a los inhibidores HMF y Furfural en el proceso de fermentación y mayor tolerancia en presencia de HMF, pues fue donde se evidencio menor reducción de los valores de xilitol producido.

## **9. RECOMENDACIONES**

Finalmente se comenta que, debido a inconvenientes de orden mundial, el trabajo no pudo realizarse en las mejores condiciones para obtener resultados más completos, trayendo a colación parte de las actividades que se dejan nombradas para la continuación del trabajo, ya que se requiere mayor tiempo para finalizar el estudio en cuestión. Por lo cual se recomienda la realización de los experimentos en las condiciones más favorables posibles.

## 10. PERSPECTIVAS

Este trabajo deja las posibilidades para continuar el estudio:

Realizar la cuantificación de los cofactores NADP/NADPH para comprender su relación con el metabolismo y producción de xilitol.

Llevar los ensayos de laboratorio a pruebas de mayor escala, evaluando en mayor medida la capacidad de la levadura para producir xilitol usando la xilosa disponible del bagazo de caña. Siendo así que abre una gran ventana de oportunidades en las que la producción microbiana pueda mitigar el impacto ambiental gastos de producción y establecer una nueva base en la economía del mercado.

## Referencias

- Acosta, E., Batista de Almeida, J., Giulietti, M., Frade, J. A., & Nápoles, A. (2005). Producción de xilitol en fermentador de 15 litros. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 45-51.
- Amore, R., Kötter, P., Küster, C., Ciriacy, M., & Hollenberg, C. P. (1991). Cloning and Expression in *Saccharomyces Cerevisiae* of the NAD(P)H-dependent Xylose Reductase-Encoding Gene (XYL1) From the Xylose-Assimilating Yeast *Pichia Stipitis*. *Gene*, 89-97. doi:10.1016/0378-1119(91)90592-y
- Arcaño, Y. D., García, O. D., Mandelli, D., Carvalho, W. A., & Pontes, L. A. (2020). Xylitol: A review on the progress and challenges of its production by chemical route. *Catalysis Today*, 2-14.
- Ask, M., Bettiga, M., Mapelli, V., & Olsson, L. (2013). The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*. Obtenido de <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-6-22>
- Baptista, S. L., Cunha, J. T., Romani, A., & Domingues, L. (2018). Xylitol production from lignocellulosic whole slurry corn cob by engineered industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. *Bioresource Technology*, 481-491. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852418309775?via%3Dihub>
- Basso, L. C., de Amorim, H. V., de Oliveira, A. J., & Lopes, M. L. (2008). Yeast Selection for Fuel Ethanol Production in Brazil. *FEMS Yeast Res.*, 1155-1163. doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x
- C. Zacharis. (2012). *Xylitol*, in: *Sweeten. Sugar Altern. Food Technol.* Oxford, UK: Wiley-Blackwell. doi:10.1002/9781118373941.ch16
- Cai, Z., Zhang, B., & Li, Y. (2012). Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: Reflections and perspectives. *Biotechnol. J.* 7, 34-46. doi:10.1002/biot.201100053
- Cerioni, J. L., Nichio, N. N., & Santori, G. F. (Abril de 2019). *Producción de xilitol a partir de la hidrogenación de xilosa en fase acuosa con catalizadores de níquel*. Obtenido de SEDICI: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/75718>
- Cheng, K.-K., Wu, J., Lin, Z.-N., & Zhang, J.-A. (2014). Aerobic and sequential anaerobic fermentation to produce xylitol and ethanol using non-detoxified acid pretreated corncob. *Biotechnol. Biofuels*. doi:10.1186/s13068-014-0166-y
- Cortivo Dall, R. P. (2017). *Produção de etanol e xilitol por linhagens recombinantes de Saccharomyces cerevisiae e novas espécies de Spathaspora a partir de hidrolizados da casca de aveia e soja*. Brasil: Universidad Federal de Rio Grande do Sul. Obtenido de <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/164316>
- Cunha, J. T., Soares, P. O., Romani, A., Thevelein, J. M., & Domingues, L. (2019). Xylose fermentation efficiency of industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast with separate or

- combined xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways. *Biotechnology for Biofuels*. Obtenido de <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-019-1360-8>
- Dasgupta, D., Bandhu, S., Adhikari, D., & Ghosh, D. (2017). Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: A review. *Microbiol. Res.* *197*, 9–21. doi:10.1016/j.micres.2016.12.012
- Dias, M. O., Filho, R. M., Mantelatto, P. E., Cavalett, O., Rossel, C. E., Bonomi, A., & Leal, M. R. (2015). Sugarcane processing for ethanol and sugar. *Environmental Development*, 31-51. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211464515000147?via%3Dihub>
- Dijken, J. v., Bauer, J., Brambilla, L., Duboc, P., Francois, J., Gancedo, C., . . . Verr, C. (2000). An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Enzyme Microb. Technol.*, 706–714. doi:10.1016/S0141-0229(00)00162-9.
- Edelstein, S., Smith, K., Worthington, A., Gillis, N., Bruen, D., Kang, S., . . . Guiducci, G. (2008). Comparisons of Six New Artificial Sweetener Gradation Ratios with Sucrose in Conventional-Method Cupcakes Resulting in Best Percentage Substitution Ratios. *J. Culin. Sci. Technol*, 61-74. doi:10.1300/j385v05n04\_05.
- Estela-Escalante, W. D., Rychtera, M., Melzoch, K., Torres-Ibáñez, F., Calixto-Cotos, R., Bravo-Aranibar, N., . . . Chávez-Guzmán, Y. M. (2014). Effect of aeration on the production of volatile compounds by mixed culture of *Brettanomyces intermedius* and *Saccharomyces cerevisiae* during cider fermentation. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*. Obtenido de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-888X2014000100001](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2014000100001)
- Franco, H. C., Pimenta, M. T., Carvalho, J. L., Magalhães, P. S., Rossell, C. E., Braunbeck, O. A., . . . Neto, J. R. (2013). Assessment of sugarcane trash for agronomic and energy purposes in Brazil. *Scientia Agricola*. Obtenido de [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-90162013000500004](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162013000500004)
- Gietz, R., Schiestl, R., Willems, A., & Woods, R. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*. *11*, 355–360. doi:10.1002/yea.320110408
- Guirimand, G., Sasaki, K., Inokuma, K., Bamba, T., Hasunuma, T., & Kondo, A. (2016). Cell surface engineering of *Saccharomyces cerevisiae* combined with membrane separation technology for xylitol production from rice straw hydrolysate. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 3477–3487. Obtenido de doi:10.1007/s00253-015-7179-8
- Hallborn, J., Walfridsson, M., Airaksinen, U., Ojamo, H., Hahn-Hagerdal, B., Penttila, M., & Kerasnen, S. (1991). Xylitol production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology. (N. Y.)*, 1090–1095.

- Handumrongkul C, M. D. (1998). *Cloning and expression of Candida guilliermondii xylose reductase gene (xyl1) in Pichia pastoris*. Microbiol Biotechnol.
- Hongzhang, C., & Lan, W. (2017). Chapter 6 - Sugar Strategies for Biomass Biochemical Conversion. *Technologies for Biochemical Conversion of Biomass*, 137-164.
- Janakiram, C., Kumar, C. D., & Joseph, J. (2017). Xylitol in preventing dental caries: A systematic review and meta-analyses. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 8. doi:10.4103/0976-9668.198344.
- Jin, Y.-S., Laplaza, J. M., & Jeffries, T. W. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* Engineered for Xylose Metabolism Exhibits a Respiratory Response. *Appl Environ Microbiol*, 6816–6825. doi:10.1128/AEM.70.11.6816-6825.2004
- Junior, W. G., Pacheco, T. F., Trichez, D., Almeida, J. R., & Gonçalves, S. B. (2019). Xylitol production on sugarcane biomass hydrolysate by newly identified *Candida tropicalis* JA2 strain. *WILEY Yeast*, 349-361. Obtenido de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/yea.3394>
- Kogje, A., & Ghosalkar, A. (2016). Xylitol production by *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing different xylose reductases using non-detoxified hemicellulosic hydrolysate of corncob. 3 *Biotech*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4909029/>
- Laughery, M., Hunter, T., Brown, A., Hoopes, J., Ostbye, T., Shumaker, T., & Wyrick, J. (2015). New vectors for simple and streamlined CRISPR – Cas9 genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*. 711–720. doi:10.1002/yea.
- Ledezma-Orozco, E., Ruíz-Salaza, R., Bustos-Vázquez, G., Montes-García, N., Roa-Cordero, V., & Rodríguez-Castillejos, G. (2018). PRODUCCIÓN DE XILITOL A PARTIR DE HIDROLIZADOS ÁCIDOS NO DETOXIFICADOS DE BAGAZO DE SORGO POR *Debaryomyces hansenii*. *AGROCIENCIA*, 1095-1106.
- Mello, F. d., Coradini, A. L., Tizei, P. A., Carazzollea, M. F., Pereira, G. A., & Teixeira, G. S. (2018). Static microplate fermentation and automated growth analysis approaches identified a highly-aldehyde resistant *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Biomass and Bioenergy*, 49-58. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096195341830285X>
- Montes, L. B., Ruiz, O. C., González, R. I., Cano, E. G., & Castillejos, G. C. (2018). Aprovechamiento de bagazo de caña de azúcar para obtención de furfural. *Inventio*. Obtenido de <http://inventio.uaem.mx/index.php/inventio/article/view/567/1230>
- Moysés, D., Reis, V., Almeida, J. d., Moraes, L. d., & Torres, F. (2016). Xylose fermentation by *saccharomyces cerevisiae*: Challenges and prospects. *Int. J. Mol. Sci.* doi:10.3390/ijms17030207
- Nuñez Díaz, D. (2017). *Estrategias para la producción biotecnológica de xilitol a partir de hidrolizados lignocelulósicos mediante modificación genética de una cepa industrial de Saccharomyces cerevisiae*. España: Universidad De Oviedo.
- Rafiqul, I., & Sakinah, A. (2013). Processes for the Production of Xylitol—A Review. *Food Rev. Int.*, 127–156. doi:10.1080/87559129.2012.714434.

- Ravella, S. R., Gallagher, J., Fish, S., & Prakasham, R. S. (2012). *Overview on Commercial Production of Xylitol, Economic Analysis and Market Trends*. da Silva S., Chandel A. (eds) D-Xylitol. Springer, Berlin, Heidelberg.
- S. Kwak, Y. J. (2017). Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: A review and perspective. *Microb. Cell Fact.* doi:10.1186/s12934-017-0694-9.
- Santos, F., Borém, A., & Caldas, C. (2015). *Sugarcane. Agricultural Production, Bioenergy and Ethanol*. Brasil: Elsevier Inc. All rights reserved.
- Shrotri, A., Kobayashi, H., & Fukuoka, A. (2017). Chapter Two - Catalytic Conversion of Structural Carbohydrates and Lignin to Chemicals. *Advances in Catalysis*, 59-123. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360056417300020>
- Silvio Silvério da Silva, A. K. (2012). *D-Xylitol: Fermentative Production, Application and Commercialization*. Brasil: Springer Science & Business Media.
- Stoklosa, R. J., Nghiem, N. P., & Latona, R. J. (2019). Xylose-Enriched Ethanol Fermentation Stillage from Sweet Sorghum for Xylitol and Astaxanthin Production. *MDPI. Fermentation*. doi:10.3390/fermentation5040084
- Toivari MH, R. L. (2007). *Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for conversion of D-glucose to xylitol and other five-carbon sugars and sugar alcohols*. *Environ Microbiol*.
- Winkelhausen, E., & S. Kuzmanova. (1998). Microbial conversion of d-xylose to xylitol. *Ferment. Bioeng*, 1–14. doi:10.1016/S0922-338X(98)80026-3.
- Xu, Y., Chi, P., Bilal, M., & Cheng, H. (2019). Biosynthetic strategies to produce xylitol: an economical venture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 5143–5160. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-019-09881-1>
- Yin, S., Kim, H., & Kim, H.-J. (2014). Protective effect of dietary xylitol on influenza A virus infection. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0084633.



## ANEXOS

**TABLAS OD DE LAS FERMENTACIONES INICIALES REALIZADAS PARA DETERMINAR LAS MEJORES CONDICIONES DE PRODUCCIÓN DE XILITOL.****Tabla 2. Valores OD de la Fermentación 1.** Promedio de los valores por triplicado de las densidades ópticas de la primera fermentación realizada usando corchos de goma.

HORAS	FMYX OD [0,5]	FMYX OD [1]
0	0,5	1
11	12,10	11,80
23,5	11,60	12,22
35	12,23	11,90
47,5	11,22	11,20
59,5	12,35	12,25
71,5	11,35	11,12
80,5	12,01	11,34
95,5	11,48	11,98
104,5	11,82	11,42

Fuente: Autor

**Tabla 3. Valores OD de la Fermentación 2.** Promedio de los valores por triplicado de las densidades ópticas de la segunda fermentación realizada en la cual se usó papel semipermeable y corchos de goma.

HORAS	FMYX OD [0,5]	FMYX OD [1]
0	0,43	0,79
3,5	1,77	3,79
6,5	7,79	11,44
10,5	11,7	12,56
23,5	11,18	12,20
34	10,44	11,60
48	10,66	11,08
58,5	10,72	11,62
72,5	10,66	11,46
81,5	11,84	11,67
96,5	10,98	11,44
105,5	10,55	11,76

Fuente: Autor

**Tabla 4. Valores OD de la Fermentación 3.** Promedio de los valores por triplicado de las densidades ópticas de la tercera fermentación realizada en la cual se usó corchos de gasa.

HORAS	FMYX OD [0,5]	FMYX OD [1]
0	0,49	0,84
4	2,91	4,91

<b>7</b>	9,58	10,78
<b>10</b>	11,66	10,84
<b>25</b>	14	14,77
<b>34</b>	15,83	16,2
<b>50</b>	17,2	17,42
<b>56</b>	16,24	16,7
<b>72</b>	18,66	18,89
<b>81</b>	19,76	20,21
<b>97</b>	18,57	18,90
<b>104</b>	17,89	19,12

Fuente: Autor

**TABLAS DE LOS VALORES DE ANÁLISIS DE LA CUANTIFICACIÓN HPLC DE LAS FERMENTACIONES INICIALES REALIZADAS PARA DETERMINAR LAS MEJORES CONDICIONES DE PRODUCCIÓN DE XILITOL.**

**Tabla 5.** Valores de análisis en HPLC de la Primera Fermentación de la cepa FMYX usando OD inicial [0,5] y anaerobiosis.

<b>FMYX OD [0,5]</b>					
<b>PUNTO</b>	<b>HORAS</b>	<b>XILOSA (g/L)</b>	<b>XILITOL (g/L)</b>	<b>ETANOL (g/L)</b>	<b>OD</b>
<i>Control</i>	0	20,772	0	0,345	0
1	11	13,335	1,095	12,822	12,10
2	23,5	11,890	2,979	13,102	11,60
3	35	10,558	4,429	12,738	12,23
4	47,5	9,515	5,968	12,146	11,22
5	59,5	8,463	7,276	12,117	12,35
6	71,5	7,513	8,375	11,770	11,35
7	80,5	6,664	8,844	11,192	12,01
8	95,5	5,722	9,967	10,754	11,48
9	104,5	5,626	10,747	11,309	11,82

Fuente: Autor

**Tabla 6.** Valores de análisis en HPLC de la Primera Fermentación de la cepa FMYX usando OD inicial [1]y anaerobiosis.

<b>FMYX OD [1]</b>					
<b>PUNTO</b>	<b>HORAS</b>	<b>XILOSA (g/L)</b>	<b>XILITOL (g/L)</b>	<b>ETANOL (g/L)</b>	<b>OD</b>
<i>Control</i>	0	20,772	0	0,345	0
1	11	14,814	1,679	14,542	11,80
2	23,5	10,931	3,028	12,690	12,22
3	35	9,877	4,305	12,393	11,90
4	47,5	8,856	5,517	12,099	11,20
5	59,5	8,008	6,506	11,570	12,25
6	71,5	7,141	7,200	10,530	11,12

7	80,5	6,658	7,777	11,164	11,34
8	95,5	6,187	8,852	11,235	11,98
9	104,5	5,764	9,125	11,041	11,42

Fuente: Autor

**Tabla 7.** Valores de análisis en HPLC de la Segunda Fermentación con la cepa FMYX usando un OD inicial de [0,5], condición mixta.

<b>FMYX OD [0,5]</b>					
<b>PUNTO</b>	<b>HORAS</b>	<b>XILOSA (g/L)</b>	<b>XILITOL (g/L)</b>	<b>ETANOL (g/L)</b>	<b>OD</b>
<i>Control</i>	0	23,372	0	0	0
0	0	21,917	0	0,822	0,43
1	3,5	20,948	0,403	2,678	1,77
2	6,5	18,508	0,801	11,309	7,79
3	10,5	15,737	1,760	14,362	11,7
4	23,5	13,822	4,038	13,54	11,18
5	34	12,486	5,056	13,222	10,44
6	48	10,721	6,190	13,633	10,66
7	58,5	10,289	7,228	13,390	10,72
8	72,5	9,149	7,954	13,036	10,66
9	81,5	8,596	8,27	12,75	11,84
10	96,5	8,122	9,03	12,429	10,98
11	105,5	7,714	9,235	12,339	10,55

Fuente: Autor

**Tabla 8.** Valores de análisis en HPLC de la Segunda Fermentación con la cepa FMYX usando un OD inicial de [1], condición mixta.

<b>FMYX OD [1]</b>					
<b>PUNTO</b>	<b>HORAS</b>	<b>XILOSA (g/L)</b>	<b>XILITOL (g/L)</b>	<b>ETANOL (g/L)</b>	<b>OD</b>
<i>Control</i>	0	23,372	0	0	0
0	0	20,979	0	1,732	0,79
1	3,5	19,885	0,362	4,88	3,79
2	6,5	15,82	1,436	14,034	11,44
3	10,5	14,58	2,418	13,949	12,56
4	23,5	12,255	4,982	13,05	12,20
5	34	11,363	6,235	10,796	11,60
6	48	9,585	7,884	13,353	11,08
7	58,5	8,038	8,303	13,045	11,62
8	72,5	7,296	9,578	12,682	11,46
9	81,5	6,89	10,042	12,394	11,67
10	96,5	6,03	10,804	12,048	11,44
11	105,5	5,808	11,133	12,167	11,76

**Tabla 9.** Valores de análisis en HPLC de la Tercera Fermentación con la cepa FMYX usando un OD inicial de [0,5], condición aeróbica.

**FMYX OD [0,5]**

<b>PUNTO</b>	<b>HORAS</b>	<b>XILOSA (g/L)</b>	<b>XILITOL (g/L)</b>	<b>ETANOL (g/L)</b>	<b>OD</b>
<i>Control</i>	0	20,41	0	0	0
0	0	18,23	0,00	1,84	0,49
1	4	17,48	0,76	7,55	2,91
2	7	14,78	1,71	12,12	9,58
3	10	12,67	3,03	11,76	11,66
4	25	6,47	9,57	9,38	14
5	35	4,03	12,83	7,82	15,83
6	50	1,76	14,67	4,98	17,2
7	56	1,35	15,09	3,87	16,24
8	72	0,98	15,48	1,27	18,66
9	81	0,92	15,58	0,53	19,76
10	97	0,88	15,69	0,78	18,57
11	104	0,87	15,74	0,50	17,89

Fuente: Autor

**Tabla 10.** Valores de análisis en HPLC de la Tercera Fermentación con la cepa FMYX usando un OD inicial de [1], condición aeróbica.

**FMYX OD [1]**

<b>PUNTO</b>	<b>HORAS</b>	<b>XILOSA (g/L)</b>	<b>XILITOL (g/L)</b>	<b>ETANOL (g/L)</b>	<b>OD</b>
<i>Control</i>	0	20,41	0	0	0
0	0	18,91	0,00	1,02	0,84
1	4	18,21	0,32	4,33	4,91
2	7	16,87	1,32	12,66	10,78
3	10	14,49	2,57	12,44	10,84
4	25	7,71	9,42	9,81	14,77
5	35	4,87	12,61	8,01	16,2
6	50	2,18	15,54	5,46	17,42
7	56	1,65	15,92	4,44	16,7
8	72	1,33	16,24	1,30	18,89
9	81	1,20	16,31	0,51	20,21
10	97	0,91	16,57	0,36	18,90
11	104	0,56	16,97	0,48	19,12

Fuente: Autor

**INFLUENCIA DE HMF Y FURFURAL EN LA PRODUCCIÓN DE XILITOL**

**Tabla 11.** Resultados del análisis en HPLC y Valores de OD, primera fermentación con las diferentes concentraciones de los inhibidores.

<b>Concentración (mM)</b>	<b>FMYX</b>	
	<b>OD° Final</b>	<b>Xilitol (g/L)</b>

<b>Control</b>	0	19,4	17,703
<b>Furfural</b>	2,5	18,48	16,500
	5	19,2	16,632
	10	24,28	16,179
<b>HMF</b>	5	18,84	15,926
	10	19,16	15,626
	20	19,1	17,603
	40	19,98	17,193

Fuente: Autor

**Tabla 12.** Resultados del análisis en HPLC y Valores de OD, Segunda fermentación con las diferentes concentraciones de los inhibidores.

		<b>FMYX</b>	
<b>Concentración (mM)</b>		<b>OD° Final</b>	<b>Xilitol (g/L)</b>
<b>Control</b>	0	23,25	17,98
<b>Furfural</b>	2,5	22,03	17,17
	5	21,63	16,70
	10	24,81	16,95
	20	25,2	17,08
	40	27,15	17,41
	60	22,78	17,04
<b>HMF</b>	5	22,91	17,42
	10	21,03	17,21
	20	21,93	18,17
	40	22,96	17,07
	60	25,14	18,03
	80	26,65	17,89

Fuente: Autor

## DATOS COMPLETOS DE LOS ENSAYOS REALIZADOS (Fuente: Autor)

### Resultados OD PRIMERA fermentación (Anaeróbica)

<b>FMYX CONCENTRACIÓN 0,5: DENSIDADES OPTICAS</b>						
<b>PUNTO</b>	<b>REP 1</b>	<b>REP 2</b>	<b>REP 3</b>	<b>MEDIA</b>	<b>OD TOTAL</b>	<b>DILUCIÓN</b>
<b>0</b>					0,5	
<b>1</b>	0,617	0,596	0,603	0,60533333	12,1066667	20
<b>2</b>	0,578	0,563	0,6	0,58033333	11,6066667	20
<b>3</b>	0,599	0,622	0,614	0,61166667	12,2333333	20
<b>4</b>	0,535	0,587	0,561	0,561	11,22	20
<b>5</b>	0,605	0,611	0,637	0,61766667	12,3533333	20
<b>6</b>	0,561	0,556	0,586	0,56766667	11,3533333	20
<b>7</b>	0,608	0,604	0,59	0,60066667	12,0133333	20
<b>8</b>	0,575	0,589	0,558	0,574	11,48	20

9	0,634	0,603	0,536	0,591	11,82	20
---	-------	-------	-------	-------	-------	----

### FMYX CONCENTRACIÓN 1: DENSIDADES OPTICAS

PUNTO	REP 1	REP 2	REP 3	MEDIA	OD TOTAL	DILUCIÓN
1	0,608	0,585	0,578	0,59033333	11,8066667	20
2	0,59	0,658	0,585	0,611	12,22	20
3	0,619	0,587	0,58	0,59533333	11,9066667	20
4	0,585	0,55	0,546	0,56033333	11,2066667	20
5	0,601	0,625	0,612	0,61266667	12,2533333	20
6	0,557	0,56	0,551	0,556	11,12	20
7	0,568	0,567	0,567	0,56733333	11,3466667	20
8	0,644	0,515	0,638	0,599	11,98	20
9	0,556	0,614	0,543	0,571	11,42	20

### Resultados HPLC Primera fermentación

	CONCENTRAÇÕES (g/L)										
	Glucose	Xilose	Xilitol	Glicerol	Etanol						
CONTROL	11,501	8,309	0,000	0,000	0,138	F4.3	0,000	4,695	2,995	0,226	6,203
F1.1	0,818	6,642	0,489	0,194	5,994	F4.4	0,000	4,361	2,886	0,239	6,065
F1.2	0,146	6,671	0,570	0,209	6,571	F4.5	0,000	4,629	2,634	0,250	6,211
F1.3	0,079	6,691	0,584	0,193	6,668	F4.6	0,000	4,296	2,756	0,256	5,873
F1.4		6,085	0,694	0,218	5,097	F5.1	0,000	4,544	3,189	0,232	6,184
F1.5	0,000	6,119	0,684	0,237	6,423	F5.2	0,000	3,817	3,949	0,245	5,750
F1.6	0,030	10,018	1,141	0,396	10,293	F5.3	0,000	4,335	3,777	0,238	6,242
F2.1	0,000	6,066	1,430	0,230	6,634	F5.4	0,000	3,926	3,367	0,241	5,851
F2.2	0,000	5,937	1,512	0,242	6,546	F5.5	0,000	4,133	3,097	0,248	5,723
F2.3	0,000	5,834	1,528	0,211	6,474	F5.6	0,000	3,954	3,296	0,260	5,783
F2.4	0,000	5,520	1,618	0,236	6,394	F6.1	0,000	4,261	3,670	0,234	6,110
F2.5	0,000	5,557	1,424	0,243	6,388	F6.2	0,000	3,341	4,795	0,248	5,726
F2.6	0,000	5,320	1,500	0,248	6,254	F6.3	0,000	3,668	4,098	0,224	5,820
F3.1	0,000	5,342	2,018	0,224	6,318	F6.4	0,000	3,454	3,687	0,232	5,641
F3.2	0,000	5,200	2,331	0,249	6,359	F6.5	0,000	3,837	3,572	0,251	4,857
F3.3	0,000	5,295	2,295	0,224	6,431	F6.6	0,000	3,422	3,543	0,246	5,297
F3.4	0,000	4,900	2,242	0,239	6,196	F7.1	0,000	3,926	3,873	0,233	5,783
F3.5	0,000	5,052	2,040	0,245	6,212	F7.2	0,000	2,788	4,942	0,229	5,299
F3.6	0,000	4,864	2,176	0,255	6,182	F7.3	0,000	3,282	4,453	0,222	5,706
F4.1	0,000	4,961	2,669	3,102	6,248	F7.4	0,000	3,164	3,915	0,229	5,426
F4.2	0,000	4,616	3,288	0,257	5,769	F7.5	0,000	3,459	3,698	0,243	5,631
						F7.6	0,000	3,364	4,054	0,263	5,690
						F8.1	0,000	3,442	4,182	0,225	5,563

<b>F8.2</b>	0,000	2,293	5,704	0,229	5,064	<b>F9.2</b>	0,000	2,116	6,105	0,231	5,331
<b>F8.3</b>	0,000	2,849	5,064	0,223	5,505	<b>F9.3</b>	0,000	2,833	5,423	0,226	5,742
<b>F8.4</b>	0,000	3,051	4,597	0,245	5,621	<b>F9.4</b>	0,000	2,777	4,653	0,233	5,384
<b>F8.5</b>	0,000	3,276	4,244	0,254	5,677	<b>F9.5</b>	0,000	3,044	4,408	0,247	5,595
<b>F8.6</b>	0,000	2,954	4,437	0,256	5,556	<b>F9.6</b>	0,000	2,825	4,627	0,258	5,584
<b>F9.1</b>	0,000	3,491	4,593	0,237	5,891						

### *Datos Primera fermentación procesados*

OD= 0,5 FMXY							Total g/L					
PUNTO	HORA	MEDIA XILOSA	DES. XILOSA	MEDIA XILITOL	DES. XILITOL	MEDIA ETANOL	DES. ETANOL	XYLOSA	XYLITOL	ETHANOL	OD	
Control	0	8,309		0	0	0	0,138	0	20,7725	0	0,345966	0
1	11	6,668	0,02456	0,548	0,05119	6,411	0,3642413,33574	1,095889	12,8222812,10667			
2	23,5	5,945	0,11632	1,490	0,0528	6,551	0,0799311,89079	2,979835	13,1026511,60667			
3	35	5,279	0,07214	2,215	0,17125	6,369	0,05692	10,5584	4,429986	12,7383212,23333		
4	47,5	4,758	0,18065	2,984	0,30946	6,073	0,264919,515441	5,96811	12,14692	11,22		
5	59,5	4,232	0,37435	3,638	0,39835	6,059	0,269218,463215	7,276078	12,1173512,35333			
6	71,5	3,757	0,46659	4,188	0,56799	5,885	0,20028	7,51344	8,375601	11,7705811,35333		
7	80,5	3,332	0,57102	4,422	0,5349	5,596	0,259876,664024	8,844915	11,1923612,01333			
8	95,5	2,861	0,57451	4,984	0,7639	5,377	0,272925,722419	9,967031	10,75434	11,48		
9	104,5	2,813	0,68791	5,374	0,75735	5,655	0,290355,626721	10,74712	11,30989	11,82		

OD= 1 FMXY							Total g/L					
PUNTO	HORA	MEDIA XILOSA	DES. XILOSA	MEDIA XILITOL	DES. XILITOL	MEDIA ETANOL	DES. ETANOL	XYLOSA	XYLITOL	ETHANOL	OD	
Control	0	8,309		0	0	0	0,138	0	20,7725	0	0,345966	0
1	11	7,407	2,26064	0,840	0,26088	7,271	2,70014,814931,679452	14,5420411,80667				
2	23,5	5,466	0,12718	1,514	0,09774	6,345	0,07910,931253,028076	12,69092	12,22			
3	35	4,939	0,10006	2,153	0,10329	6,197	0,0159,8770954,305026	12,3938911,90667				
4	47,5	4,428	0,17651	2,759	0,12579	6,050	0,1698,8567635,517504	12,0993911,20667				
5	59,5	4,004	0,11237	3,253	0,14	5,785	0,0648,0086866,506904	11,5709212,25333				
6	71,5	3,571	0,23088	3,600	0,0762	5,265	0,3937,1414587,200538	10,53055	11,12			
7	80,5	3,329	0,15042	3,889	0,1791	5,582	0,1386,6581937,777831	11,1645811,34667				
8	95,5	3,094	0,16546	4,426	0,17656	5,618	0,0616,187437	8,85229	11,2356	11,98		
9	104,5	2,882	0,14195	4,563	0,1344	5,521	0,1195,7640269,125494	11,04175	11,42			





1 F1 1	8,707	9,622	0,181		2,442	6 F1 3	5,181	3,679	0,105	6,926
1 F1 2	8,994	10,056	0,181		2,441	7 F05 1	5,387	3,546	0,078	6,594
1 F1 3	9,131	10,15	0,182		2,437	7F052	5,213	3,784	0,082	6,754
2 F05 1	2,765	9,168	0,407	0,149	5,856	7 F053	4,834	3,512	0,078	6,738
2F052	3,072	9,367	0,4	0,146	5,616	7F1 1	3,477	4,298	0,099	6,18
2 F053	3,01	9,228	0,395	0,145	5,492	7 F1 2	4,107	4,133	0,097	6,629
2 F1 1	0,137	7,804	0,752	0,169	6,859	7F1 3	4,474	4,024	0,099	6,759
2 F1 2	0,023	7,778	0,637	0,164	7,075	8F05 1	4,753	3,778	0,073	6,656
2 F1 3	0,135	8,148	0,765	0,16	7,117	8F052	4,497	3,935	0,06	6,634
3 F05 1	0,105	7,662	0,873	0,128	7,129	8F053	4,474	4,219	0,063	6,265
3F052	0,108	7,947	0,88	0,135	7,159	8F1 1	3,244	5,066	0,082	6,137
3 F053	0,107	7,997	0,888	0,133	7,255	8 F1 2	3,763	4,748	0,083	6,391
3 F1 1	0,133	7,25	1,307	0,17	6,853	8F1 3	3,938	4,554	0,082	6,496
3 F1 2	0,091	7,254	1,157	0,168	6,992	9F05 1	4,362	3,893	0,06	6,392
3 F1 3	0,093	7,366	1,164	0,171	7,079	9F052	4,344	4,335	0,064	6,332
4 F05 1	0,124	6,867	1,947	0,126	6,788	9F053	4,189	4,177	0,062	6,401
4 F052	0,125	6,949	2,046	0,116	6,77	9F1 1	3,016	5,213	0,08	6,035
4F053	0,123	6,917	2,064	0,119	6,752	9 F1 2	3,448	4,935	0,077	5,923
4 F1 1		5,775	2,514	0,15	6,28	9F1 3	3,871	4,915	0,081	6,634
4 F1 2		6,183	2,512	0,155	6,573	10F05 1	4,21	4,388	0,057	6,2
4 F1 3		6,425	2,447	0,156	6,722	10F052	4,062	4,619	0,06	6,26
5 F05 1		6,505	2,518	0,121	6,675	10F053	3,911	4,538	0,059	6,184
5F052		6,014	2,362	0,119	6,662	10F1 1	2,598	5,568	0,075	5,872
5 F053		6,211	2,705	0,118	6,497	10F1 2	3,122	5,38	0,075	6,01
5 F1 1						10F1 3	3,325	5,258	0,075	6,191
5 F1 2		5,431	3,233	0,122	5,518	11F05 1	4,01	4,446	0,076	6,201
5 F1 3		5,932	3,002	0,113	5,278	11F052	3,839	4,702	0,058	6,206
6 F05 1		5,475	2,922	0,075	6,63	11F053	3,723	4,705	0,06	6,102
6F052		5,399	3,156	0,079	6,976	11F1 1	2,401	5,76	0,076	5,797
6 F053		5,208	3,208	0,074	6,844	11F1 2	3,134	5,555	0,076	6,221
6 F1 1		4,331	4,31	0,099	6,292	11F1 3	3,178	5,384	0,074	6,233
6 F1 2		4,866	3,838	0,097	6,812					

### Datos segunda fermentación procesados

OD= 0,5 FMXY

PUNTHORA O S	MEDIA XILOSE	DES. XILOSE	MEDIA XILITOL	DES. XILITOL	Total g/L						
					MEDIA ETANOL	DES. ETANOL	XYLITOETHANO A L	XYLOS L	ETHANO L	OD	
Contro 1	0	9,349	0	0	0	0	23,3725	0	0	0	
0	0	10,959	0,078	0	0	0,41133	0,051072	21,9173	0	0,822667	0,432
1	3,5	10,474	0,089	0,202	0,003	1,339	0,039509	20,948	0,4033	2,678	1,77666 67
2	6,5	9,254	0,102	0,401	0,006	5,65467	0,185055	18,5087	0,8013	11,30933	7,79333 33
3	10,5	7,869	0,181	0,880	0,008	7,181	0,065818	15,7373	1,7607	14,362	11,7

4	23,5	6,911	0,041	2,019	0,063	6,77	0,018	13,822	4,038	13,54	11,1866 67
5	34	6,243	0,247	2,528	0,172	6,61133	0,099229	12,4867	5,0567	13,22267	10,4466 67
6	48	5,361	0,138	3,095	0,152	6,81667	0,174612	10,7213	6,1907	13,63333	10,6666 67
7	58,5	5,145	0,283	3,614	0,148	6,69533	0,088121	10,2893	7,228	13,39067	10,7266 67
8	72,5	4,575	0,155	3,977	0,224	6,51833	0,219669	9,14933	7,9547	13,03667	10,66 67
9	81,5	4,298	0,095	4,135	0,224	6,375	0,03751	8,59667	8,27	12,75	11,8466 67
10	96,5	4,061	0,1495	4,515	0,1172	6,21467	0,040067	8,122	9,03	12,42933	10,9866 67
11	105,5	3,85733	0,14438	4,61767	0,14868	6,16967	0,058654	7,71467	9,2353	12,33933	10,5533 33

## OD= 1 FMXY

PUNTO	HORA	MEDIA XILOSE	DESV XILOSE	MEDIA XILITOL	DESV XILITOL	MEDIA ETANOL	DESV. ETANOL	XYLOS A	XYLITO L	ETHANO L	OD
Control	0	9,349	0	0	0	0	0	23,3725	0	0	0
0	0	10,490	0,183	0,000	0,000	0,866	0,046	20,9793	0	1,732	0,799333 3
1	3,5	9,943	0,282	0,181	0,001	2,440	0,003	19,8853	0,3627	4,88	3,796666 7
2	6,5	7,910	0,207	0,718	0,070	7,017	0,138	15,82	1,436	14,034	11,44666 7
3	10,5	7,290	0,066	1,209	0,085	6,975	0,114	14,58	2,4187	13,94933	12,56 7
4	23,5	6,128	0,329	2,491	0,038	6,525	0,225	12,2553	4,982	13,05	12,20666 7
5	34	5,682	0,354	3,118	0,163	5,398	0,170	11,363	6,235	10,796	11,60666 7
6	48	4,793	0,430	3,942	0,328	6,677	0,338	9,58533	7,8847	13,35333	11,08666 7
7	58,5	4,019	0,504	4,152	0,138	6,523	0,304	8,03867	8,3033	13,04533	11,62666 7
8	72,5	3,648	0,361	4,789	0,258	6,341	0,185	7,29667	9,5787	12,68267	11,46 7
9	81,5	3,445	0,428	5,021	0,167	6,197	0,382	6,89	10,042	12,39467	11,67333 3
10	96,5	3,015	0,37513	5,402	0,15617	6,02433	0,159982	6,03	10,804	12,04867	11,44 7
11	105,5	2,90433	0,43645	5,56633	0,18826	6,08367	0,248333	5,80867	11,133	12,16733	11,76666 7

**Resultados OD TERCERA Fermentación (Aeróbica)****FMYX CONCENTRACIÓN 0,5: DENSIDADES OPTICAS**

PUNTO	REP 1	REP 2	REP 3	MEDIA	OD TOTAL	DILUCIÓN
0	0,49	0,503	0,485	0,49266667	0,49266667	1
1	0,284	0,278	0,311	0,291	2,91	10
2	0,445	0,447	0,546	0,47933333	9,58666667	20
3	0,497	0,541	0,711	0,583	11,66	20
4	0,688	0,765	0,647	0,7	14	20
5	0,775	0,802	0,798	0,79166667	15,83333333	20
6	0,843	0,861	0,876	0,86	17,2	20
7	0,792	0,82	0,824	0,812	16,24	20
8	0,923	0,936	0,941	0,93333333	18,6666667	20
9	0,783	0,8	0,789	0,79066667	19,7666667	25

<b>10</b>	0,735	0,769	0,725	0,743	18,575	25
<b>11</b>	0,706	0,721	0,72	0,71566667	17,8916667	25

### FMYX CONCENTRACIÓN 1: DENSIDADES OPTICAS

PUNTO	REP 1	REP 2	REP 3	MEDIA	OD TOTAL	DILUCIÓN
<b>0</b>	0,842	0,85	0,839	0,84366667	0,84366667	1
<b>1</b>	0,462	0,491	0,52	0,491	4,91	10
<b>2</b>	0,46	0,584	0,574	0,53933333	10,7866667	20
<b>3</b>	0,503	0,51	0,614	0,54233333	10,8466667	20
<b>4</b>	0,709	0,706	0,801	0,73866667	14,7733333	20
<b>5</b>	0,808	0,804	0,818	0,81	16,2	20
<b>6</b>	0,867	0,87	0,876	0,871	17,42	20
<b>7</b>	0,827	0,828	0,85	0,835	16,7	20
<b>8</b>	0,958	0,922	0,954	0,94466667	18,8933333	20
<b>9</b>	0,851	0,803	0,772	0,80866667	20,2166667	25
<b>10</b>	0,823	0,732	0,714	0,75633333	18,9083333	25
<b>11</b>	0,853	0,726	0,716	0,765	19,125	25

### Resultados HPLC Tercera fermentación

OD= 1 FMYX

PUNTO	HORA	MEDIA GLICOSA	DES. GLICOSE	MEDIA XILOSE	DES. XILOSE	MEDIA XILITOL	DES. XILITOL	MEDIA ETANOL	DES. ETANOL
<b>Contro</b>	0	28,912634	0	20,41	0	0	0	0	0
<b>1</b>	0	25,54	0,2326915	18,91	0,390819	0,00	0	1,02	0,188539
<b>1</b>	4	18,14	0,227185	18,21	0,109647	0,32	0,039993	4,33	0,286189
<b>2</b>	7	0,43	0,12	16,87	0,130579	1,32	0,027647	12,66	0,10619
<b>3</b>	10	0,00	0	14,49	0,032099	2,57	0,060958	12,44	0,041721
<b>4</b>	25	0,00	0	7,71	0,111379	9,42	0,165278	9,81	0,097068
<b>5</b>	35	0,00	0	4,87	0,085664	12,61	0,221551	8,01	0,190796
<b>6</b>	50	0,00	0	2,18	0,127889	15,54	0,167993	5,46	0,257864
<b>7</b>	56	0,00	0	1,65	0,047615	15,92	0,085721	4,44	0,415939
<b>8</b>	72	0,00	0	1,33	0,020637	16,24	0,019749	1,30	0,369382
<b>9</b>	81	0,00	0	1,20	0,009036	16,31	0,487136	0,51	0,095505
<b>10</b>	97	0,00	0	0,91	0,022576	16,57	0,156663	0,36	0,310380
<b>11</b>	104	0,00	0	0,56	0,033249	16,97	0,095603	0,48	0,190134

### Resultados OD PRIMERA fermentación con INHIBIDORES

#### OD CONCENTRACIÓN

FMYX	OD	DILUTION	FINAL OD
------	----	----------	----------

<b>Control-F</b>	0,97	20	19,4
<b>F-Furf2.5</b>	0,924	20	18,48
<b>F-Furf5</b>	0,96	20	19,2
<b>F-Furf10</b>	0,607	40	24,28
<b>F-Furf20</b>	0,645	40	25,8
<b>F-HMF5</b>	0,942	20	18,84
<b>F-HMF10</b>	0,958	20	19,16
<b>F-HMF20</b>	0,955	20	19,1
<b>F-HMF40</b>	0,999	20	19,98

### **Resultados HPLC PRIMERA fermentación con INHIBIDORES**

#### **AREA**

	GLUCOSE	XYLOSA	XYLITOL	ACETIC ACID	GLYCEROL	ETHANOL	HMF	FURFURAL
<b>Control-F</b>	1510	43597	2309985	4744	1922	925		
<b>F-Furf2.5</b>	3023	42983	2689778	3766	8044	1567	1026154	14331
<b>F-Furf5</b>	3324	53934	2711180	4162	1951	6913	1950825	114757
<b>F-Furf10</b>	5403	18647	2111774	4709	1036	4123	2952924	142529
<b>F-Furf20</b>	XX	XX	X	x	x	x	X	X
<b>F-HMF5</b>	3458	21913	1302534	1253	2780	1211	736818	24421
<b>F-HMF10</b>	8389	6552	516351	1693	1521	x	531544	34831
<b>F-HMF20</b>	8652	8502	466171	124	4417	x	1140995	77039
<b>F-HMF40</b>	7135	2066	231998	14030	1135	x	986697	242948
<b>Control-C</b>	1021	6879	2105023	541	9928	4517	203593	54431
<b>C-Furf2.5</b>	537	13136	2617463	14690	3314	19708	1138032	54255
<b>C-Furf5</b>	973	10291	2350714	11168	6546	99460	967254	133374
<b>C-Furf10</b>	8575	15485	2002155	7901	769	1434	2983400	212476
<b>C-Furf20</b>	8834	1686	876445	2544	2467	x	2944781	81327
<b>C-HMF5</b>	8384	8664	1263753	10245	6208	1876	215167	46920
<b>C-HMF10</b>	117	4773	506329	5342	2525	x	197351	12609
<b>C-HMF20</b>	9226	20307	436500	4881	1541	x	375090	88542
<b>C-HMF40</b>	9364	14629	221759	4824	2535	x	385931	170700

### **Fórmulas para calculo manual de la concentración**

<b>HMF</b>	<b>Y=1,33e+008X-1,51e+004</b>
<b>FURFURAL</b>	<b>Y=9,68e+008X-1,07e+007</b>
<b>GLUCOSE</b>	<b>Y=3,25e+005X+2,99e+004</b>
<b>XYLOSA</b>	<b>Y=3,03e+005X+7,75e+004</b>
<b>XYLITOL</b>	<b>Y=3,25e+005X+8,48e+003</b>
<b>ACETIC ACID</b>	<b>Y=2,41e+005X+1,28e+004</b>
<b>GLYCEROL</b>	<b>Y=1,05e+005X+2,12e+003</b>
<b>ETHANOL</b>	<b>Y=1,31e+005X+2,95e+004</b>

### Resultados Procesados PRIMERA fermentación con INHIBIDORES

FINAL CONCENTRATION (g/L)

	GLUCOSE	XYLOSA	XYLITOL	ACETIC ACID	GLYCEROL	ETHANOL	HMF	FURFURAL
<b>Control-F</b> 0	-0,21838462	-0,27972772	17,7038846	-0,08356846	-0,00471429	-0,54532443		
<b>F-Furf2.5</b> 2,5	-0,16539692	-0,22783498	16,5002954	-0,07497095	0,1128381	-0,42645802	0,01565795	0,02213705
<b>F-Furf5</b> 5	-0,16354462	-0,15555116	16,632	-0,07168465	-0,00321905	-0,34483969	0,02956278	0,02234454
<b>F-Furf10</b> 10	-0,18843846	-0,48558581	16,1791846	-0,08393154	-0,02580952	-0,48429389	0,05578992	0,0280024
<b>F-Furf20</b> 20								
<b>F-HMF5</b> 5	-0,32544	-0,73382178	15,9268185	-0,19165145	0,02514286	-0,86378626	0,02261408	0,04431579
<b>F-HMF10</b> 10	-0,66187692	-2,34151815	15,6268	-0,46087137	-0,05704762		0,04110105	0,11089701
<b>F-HMF20</b> 20	-0,81723077	-2,84645215	17,6035	-0,65746888	0,27345238		0,10865555	0,13916631
<b>F-HMF40</b> 40	-1,75115385	-6,22392739	17,1936923	0,12759336	-0,23452381		0,18830771	0,28261746
<b>Control-C</b> 0	-0,22214615	-0,58268152	16,1272538	-0,12716805	0,18590476	-0,47677481	0,00411077	0,02777487
<b>C-Furf2.5</b> 2,5	-0,18069538	-0,42484488	16,05528	0,01568465	0,02274286	-0,14949618	0,01734033	0,02221954
<b>C-Furf5</b> 5	-0,17801231	-0,44362376	14,4137477	-0,01354357	0,08430476	1,0680916	0,01477224	0,022383
<b>C-Furf10</b> 10	-0,16403846	-0,51167492	15,3359615	-0,0508195	-0,03216667	-0,53561069	0,05636278	0,02818305
<b>C-Furf20</b> 20	-0,32409231	-1,25105611	13,3533077	-0,21278008	0,01652381		0,11127372	0,05568867
<b>C-HMF5</b> 5	-0,26481231	-0,90872607	15,4495138	-0,04240664	0,15573333	-0,84348092	0,00692532	0,04440876
<b>C-HMF10</b> 10	-0,9164	-2,40023102	15,3184308	-0,30946058	0,03857143		0,01597376	0,11066745
<b>C-HMF20</b> 20	-0,79515385	-2,35944719	16,4623077	-0,41073651	-0,06892857		0,03667199	0,13931485
<b>C-HMF40</b> 40	-1,57969231	-5,18737624	16,4060769	-0,82738589	0,09880952		0,07538177	0,28075155

### Resultados OD SEGUNDA fermentación con INHIBIDORES

FMYX	OD	Dilution	Final OD°
<b>ControlF-3</b>		0,703	33,3333333
<b>ControlF-4</b>		0,692	33,3333333
<b>FHMF5-1</b>		0,682	33,3333333
<b>FHMF5-2</b>		0,693	33,3333333
<b>FHMF10-1</b>		0,63	33,3333333
<b>FHMF10-2</b>		0,632	33,3333333
<b>FHMF20-1</b>		0,652	33,3333333
<b>FHMF20-2</b>		0,664	33,3333333
<b>FHMF40-1</b>		0,681	33,3333333
<b>FHMF40-2</b>		0,697	33,3333333
<b>FHMF60-1</b>		0,742	33,3333333
<b>FHMF60-2</b>		0,77	33,3333333
<b>FHMF60-3</b>		0,751	33,3333333
<b>FHMF80-1</b>		0,8	33,3333333
<b>FHMF80-2</b>		0,815	33,3333333
<b>FHMF80-3</b>		0,784	33,3333333
<b>Ffurf2.5-1</b>		0,653	33,3333333
<b>Ffurf2.5-2</b>		0,669	33,3333333

Ffurf5-1	0,642	33,3333333	21,4
Ffurf5-2	0,656	33,3333333	21,8666667
Ffurf10-1	0,746	33,3333333	24,8666667
Ffurf10-2	0,743	33,3333333	24,7666667
Ffurf20-1	0,735	33,3333333	24,5
Ffurf20-2	0,777	33,3333333	25,9
Ffurf40-1	0,768	33,3333333	25,6
Ffurf40-2	0,838	33,3333333	27,9333333
Ffurf40-3	0,878	33,3333333	29,2666667
Ffurf60-1	0,673	33,3333333	22,4333333
Ffurf60-2	0,698	33,3333333	23,2666667
Ffurf60-3	0,68	33,3333333	22,6666667

### Resultados HPLC SEGUNDA fermentación con INHIBIDORES

Amostr a	Diluiçã o	Glicose		Xilose		Etanol		Xilitol	
		$y = 352038x - 21805$		$y = 333262x + 100,58$		$y = 140360x + 6154,1$		$y = 335823x + 361,47$	
		a=	352038	a=	333262	a=	140360	a=	335823
		b=	-21805	b=	100,58	b=	6154,1	b=	361,47
		área	g/L	área	g/L	área	g/L	área	g/L
1	2	474420 2	27,08	337197 0	20,24	31286	0,36	-	-
2	2	471406 2	26,91	334408 2	20,07	24210	0,26	-	-
3	2	24177	0,26	172365	1,03	34914	0,41	300291 3	17,88
4	2	-	-	190000	1,14	35424	0,42	303558 2	18,08
5	5	-	-	58141	0,87	23454	0,62	113018 1	16,82
6	5	-	-	20734	0,31	15978	0,35	121097 6	18,02
7	10	-	-	15689	0,47	-	-	572206	17,03
8	10	-	-	16428	0,49	13699	0,54	584351	17,39
9	20	-	-	18200	1,09	-	-	304036	18,09
10	20	-	-	13710	0,82	-	-	306916	18,26
11	30	-	-	5876	0,52	-	-	192515	17,17
12	30	-	-	12370	1,10	-	-	190295	16,97
13	60	-	-	5038	0,89	-	-	97373	17,33
14	60	-	-	7500	1,33	-	-	103622	18,45
15	60	-	-	4759	0,84	-	-	102905	18,32
16	60	-	-	10448	1,86	-	-	97306	17,32
17	60	-	-	6388	1,13	-	-	101495	18,07
18	60	-	-	5603	0,99	-	-	102668	18,28
19	2	13753	0,20	137738	0,83	44221	0,54	287299 1	17,11
20	2	-	-	140661	0,84	22765	0,24	289318 5	17,23

<b>21</b>	2	31866	0,30	166461	1,00	45600	0,56	281161	16,74
<b>22</b>	2	31140	0,30	161237	0,97	42103	0,51	279733	16,66
<b>23</b>	2	-	-	124902	0,75	30358	0,34	281483	16,76
<b>24</b>	2	-	-	157525	0,94	17714	0,16	287855	17,14
<b>25</b>	5	-	-	-	-	15458	0,33	112326	16,72
<b>26</b>	5	-	-	23371	0,35	3824	-0,08	117128	17,43
<b>27</b>	10	-	-	39016	1,17	-	-	572808	17,05
<b>28</b>	10	-	-	48885	1,46	-	-	564503	16,80
<b>29</b>	10	-	-	96497	2,89	-	-	618017	18,39
<b>30</b>	20	-	-	40173	2,40	-	-	273727	16,28
<b>31</b>	20	-	-	75261	4,51	-	-	289928	17,25
<b>32</b>	20	-	-	77268	4,63	-	-	295751	17,59