



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Electrofermentación y reducción enzimática de xilosa para la producción de
xilitol**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

IBT. Keila Jacqueline Monzón Ortega

Dirigido por:

Dr. Aldo Amaro Reyes

Dr. Aldo Amaro Reyes

Presidente

Dr. Germán Aroca Arcaya

Secretario

Dr. Carlos Regalado González

Vocal

Dra. Blanca Estela García Almendárez

Suplente

Dr. Jorge Noel Gracida Rodríguez

Suplente

Centro Universitario Querétaro, Qro.
Diciembre 2019

RESUMEN

La sacarosa es el ingrediente más común utilizado en la industria alimentaria, provee textura, dulzura y vida útil. Sin embargo, el incremento global en el consumo de azúcar ha presentado consecuencias en la salud. Por lo que ha surgido el interés de buscar sustitos de azúcares incluyendo polioles, tales como el xilitol, el cual es un azúcar de cinco carbonos que se encuentra naturalmente en la fibra de muchas frutas y vegetales incluyendo frutillas. De manera industrial se obtiene mediante la hidrogenación de xilosa sin embargo, estos generan efectos tóxicos al ambiente, además de que el proceso es costoso debido a los requerimientos como altas temperaturas y presión. Una alternativa biotecnológica es la obtención a partir de microorganismos tales como levaduras capaces de fermentar pentosas como *Scheffersomyces stipitis* y *Kluyveromyces marxianus*, o bien el extracto enzimático de estas. Debido a que el rendimiento de estas levaduras es bajo, por lo que ha existido la necesidad de buscar alternativas que permitan potenciar dicha producción, una de ellas podría ser el aplicar voltaje al medio de cultivo para suministrar electrones para que la enzima xilosa reductasa pueda reducir xilosa a xilitol. Por lo anterior se evaluó el efecto de la electrofermentación y reducción enzimática de xilosa para la producción de xilitol utilizando *Scheffersomyces stipitis* y *Kluyveromices marxianus*. Se diseñaron dos reactores uno para la electrofermentación (reactor tipo H) donde se aplicó -0.7 V y otro para la fermentación electrostática donde se evaluó 5, 10, 20 y 30 V. Se comparó el uso de células y extracto enzimático de las dos levaduras, se determinó el consumo de xilosa, producción de xilitol y etanol, como también la actividad de xilosa reductasa y la regeneración de NADH. El mayor rendimiento 1.25 ± 0.16 g xilitol (g xilosa)⁻¹ se obtuvo al utilizar *K. marxianus* a comparación de *S. stipitis* 0.03 ± 0.00 g xilitol (g xilosa)⁻¹. Al comparar ambos sistemas en la producción de xilitol se observó a las 72 horas mayor rendimiento al utilizar 30 V lo cual fue similar a cuando se utilizó el reactor tipo H (-0.7 V), por lo que el reactor de una celda podría ser una opción para poder obtener dicho metabolito.

Palabras claves: Electrofermentación, electrostática, xilitol, electrones.

ABSTRACT

Sucrose is the most common ingredient used in the food industry, it provides texture, sweetness and shelf life. However, the global increase in sugar consumption has had health consequences. So interest has arisen to look for sugar substitutes including polyols, such as xylitol, which is a five-carbon sugar that is naturally found in the fiber of many fruits and vegetables including strawberries. Industrially it is obtained through the hydrogenation of xylose, however, these generate toxic effects on the environment, in addition to the fact that the process is expensive due to the requirements such as high temperatures and pressure. A biotechnological alternative is to obtain from microorganisms such as yeasts capable of fermenting pentoses such as *Scheffersomyces stipitis* and *Kluyveromyces marxianus*, or their enzymatic extract. Nevertheless, the yield of these yeasts is low, so there has been a need to look for alternatives that enhance this production, an alternative to this could be to apply voltage to the culture medium to supply electrons so that the enzyme xylose reductase can reduce xylose to xylitol. Therefore, the effect of electrofermentation and enzymatic reduction of xylose for the production of xylitol was evaluated using *Scheffersomyces stipitis* and *Kluyveromyces marxianus*. Two reactors were designed one for electrofermentation (type H reactor) where -0.7 V was applied and another for the electrostatic fermentation where 5, 10, 20 and 30 V was evaluated, likewise, cells and enzymatic extracts of the two yeasts were compared, the consumption of xylose, production of xylitol and ethanol were determined, as well as the activity of xylose reductase and regeneration of NADH. The maximum yield of 1.25 ± 0.16 g xylitol (g xylose)⁻¹ was obtained when using *K. marxianus* compared with *S. stipitis* (0.03 ± 0.00 g xylitol (g xylose)⁻¹). When comparing both systems in the production of xylitol, observed 72 hours higher performance when using 30 V which was similar to when the H-type reactor (-0.7 V) was used, so the reactor of a cell could be an option to obtain said metabolite.

Keywords: Electrofermentation, electrostatics, xylitol, electron.

DEDICATORIA

A mis padres por apoyarme siempre, por la confianza que han depositado en mí y por estar presentes en mi vida a pesar de la distancia.

A mis hermanos por estar pendiente de mí, por aconsejarme y por darme ánimos cuando lo necesite.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme realizar este sueño, por darme la capacidad de obtener el grado de maestra en ciencias, por cuidarme y protegerme siempre, así mismo, a mi familia por apoyarme a pesar de la distancia, por estar al pendiente de mi, por su confianza, consejos y amor incondicional.

Al CONACYT por la contribución con la beca otorgada con numero No. 627353 para realizar mis estudios de posgrado y por la Beca Mixta para poder realizar una estancia internacional.

Al doctor Aldo Amaro Reyes director de mi tesis, por aceptarme en su grupo de trabajo, por su orientación y acompañamiento durante esta etapa. A mis sinodales por su tiempo, contribuciones y orientación durante el desarrollo de este trabajo.

A la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile (PUCV), al grupo de investigación de cultivos celulares y en especial al doctor Germán Aroca Arcaya por su apoyo incondicional durante mi estancia en su laboratorio, por todas las contribuciones realizadas y por permitirme ser parte de su grupo de trabajo.

A los doctores Raul Conejeros Risco y Ernesto González Romo, por el tiempo, apoyo y contribuciones durante mi estancia en la PUCV.

Al Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ) y en especial a la Dra. María Yolanda Reyes Vidal, por permitirme hacer uso de sus instalaciones y equipos para el desarrollo de una importante etapa de la investigación, así mismo, al doctor Francisco Javier Bacame Valenzuela por todo el apoyo, tiempo y asesorías brindadas durante mi estancia.

A mis compañeros y amigos de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Química, generación 2017-2019, por compartir conmigo el reto que implicó sacar adelante este posgrado.

A mis amigos y compañeros de laboratorio de la planta piloto de biotecnología de la UAQ, a mis amigos del CIDETEQ y de la PUCV por el apoyo y compañerismo brindado.

Índice

Contenido	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT.....	ii
DEDICATORIAS.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
INDICE.....	v
INDICE DE CUADROS.....	vi
INDICE DE FIGURAS.....	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Xilitol	2
2.2 Obtención de xilitol por método químico	3
2.3 Alternativas biotecnológicas para la obtención del xilitol.....	7
2.3.1 Producción microbiológica.....	7
2.3.2 Tecnología enzimática para la producción de xilitol.....	14
2.3.3. Conversión de xilosa a xilitol.....	15
2.4 Electrofermentación.....	17
2.5 Justificación	21
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo general.....	22
3.1.1 Objetivos específicos.....	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1 Construcción del sistema para fermentación electrostática	23
4.2 Construcción del reactor tipo H para la electrofermentación.....	24
4.3 Evaluación del efecto del voltaje sobre la producción de xilitol variando la fuente de carbono, tipo de levadura, tipo y sistema de bioconversión electrostática.....	24
4.3.1 Material biológico.....	24
4.3.2 Medio de cultivo.....	24

4.3.3 Pre inóculo.....	25
4.3.4 Fermentación electrostática utilizando glucosa o xilosa	25
4.4 Evaluación de las células y extracto enzimático de <i>S. stipitis</i> y <i>K. marxianus</i> sobre la producción de xilitol utilizando el sistema de electrofermentación	25
4.4.1 Obtención del extracto enzimático de <i>S. stipitis</i> y <i>K. marxianus</i>	25
4.4.2 Evaluación de la producción de xilitol utilizando el sistema de electrofermentación con <i>S. stipitis</i> y <i>K. marxianus</i>	26
4.5 Evaluación del potencial de la levadura (célula o extracto enzimático) con mayor producción de xilitol en un sistema de fermentación electrostática.....	26
4.6 Evaluación del efecto del rojo neutro en la fermentación electrostática.....	27
4.7 Caracterización de los parámetros de electrofermentación con <i>Scheffersomyces stipitis</i> y <i>Kluyveromyces marxianus</i>	27
4.8 Determinación de la actividad enzimática de xilosa reductasa y regeneración de NADH de la levadura con mayor producción de xilitol al utilizar un sistema de electrofermentación y electrostática.....	28
4.9 Diseño experimental	28
5.0 Evaluación de la voltamperometría cíclica	29
5.1 Análisis estadístico.....	29
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
6. CONCLUSIONES.....	63
7. REFERENCIAS.....	64
8. ANEXOS	73

Índice de Cuadros

Cuadro		Página
1	Microorganismos productores de xilitol a través de la fermentación de xilosa o de material lignocelulósico.	12
2	Microorganismos productores de xilitol a través de alguna modificación genética.	13
3	Ejemplos donde se ha utilizado el proceso de electrofermentación.	20
4	Análisis de varianza para los factores evaluados de electrofermentación EF -0.7 V, células (C) y extracto enzimático (EE) de <i>S. stipitis</i> y <i>K. marxianus</i> sobre el rendimiento de conversión en masa (g) de xilosa a xilitol a las 24 h	37
5	Rendimiento del xilitol a las 24 h de acuerdo a la levadura y de los tratamientos (electrofermentación EF -0.7 V, células (C) y extracto enzimático (EE), sin aplicación de voltaje (SV).	38
6	Análisis de varianza para los factores evaluados (voltajes) en un sistema de electrostática al utilizar <i>K. marxianus</i> sobre el rendimiento g xilitol (g xilosa) ⁻¹ a las 24 h.	48
7	Rendimiento g xilitol (g xilosa) ⁻¹ de acuerdo a los diferentes voltajes aplicados en la fermentación electrostática de xilosa al utilizar <i>K. marxianus</i> .	48
8	Análisis de varianza para los factores evaluados (voltajes (electrofermentación y electrostática), en células y extracto enzimático de <i>K. marxianus</i> sobre el rendimiento g xilitol (g xilosa) ⁻¹ a los diferentes tiempos (24, 48 y 72 h) de fermentación.	49 50
9	Comparación del rendimiento de g xilitol (g xilosa) ⁻¹ en la fermentación de xilosa por <i>K. marxianus</i> utilizando un sistema de electrofermentación contra el de electrostática.	
10	Análisis de varianza para los factores evaluados (voltajes y condición de la célula) en <i>K. marxianus</i> sobre la actividad enzimática de xilosa reductasa (XR) a las 24 h.	52
11	Análisis de varianza del efecto de la fermentación electrostática o SV en <i>K. marxianus</i> sobre la actividad enzimática de xilosa reductasa (XR) a las 24 h.	52
12	Actividad enzimática de xilosa reductasa del extracto enzimático o células de <i>K. marxianus</i> con (EF=-0.7 V).	53
13	Análisis de varianza para los factores evaluados (voltajes y condición de la célula) en <i>K. marxianus</i> sobre la regeneración del NADH.	53

14	Análisis de varianza del efecto del voltaje (electrostática 15 y 30 V o SV) en <i>K. marxianus</i> sobre la regeneración del NADH a las 24 h.	53
15	Regeneración del NADH del extracto enzimático o células de <i>K. marxianus</i> bajo electrofermentación (-0.7)	54
16	Actividad enzimática de xilosa reductasa del extracto enzimático de <i>K. marxianus</i> bajo un sistema de electrostática (5, 10, 20 y 30 V) o sin la aplicación de voltaje (SV).	56
17	Regeneración del NADH del extracto enzimático de <i>K.</i> bajo un sistema de electrostática (5, 10, 20 y 30 V) o sin la aplicación de voltaje (SV).	56
18	Efecto del rojo neutro como mediador de electrones en el consumo de xilosa por <i>K. marxianus</i> a los diferentes tiempos de fermentación y diferentes voltajes evaluados.	59
19	Efecto del rojo neutro como mediador de electrones en el rendimiento de etanol de <i>K. marxianus</i> a los diferentes tiempos de fermentación y diferentes voltajes evaluados.	61

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Índice de figuras

Figura		Página
1	Principales pasos para la obtención de la xilosa por ruta química (Delgado <i>et al.</i> , 2018).	4
1	Hidrogenación catalítica de D-xilosa a D-xilitol (Delgado <i>et al.</i> , 2018).	6
2	Micrografía electrónica de barrido (100 x) de un grupo de células de <i>Scheffersomyces stipitis</i> a las 48 horas de crecimiento en medio definido (g L ⁻¹): xilosa 4, sulfato de amonio 0.755, sulfato de magnesio 0.034, fosfato de potasio 0.191, cloruro de calcio 0.015, vitaminas (biotina y tiamina), elementos trazas (1mL L ⁻¹), 30 °C, 170 rpm.	10
3	Vía metabólica de xilosa en levaduras. XR: xilosa reductasa, XDH: xilosa deshidrogenasa, XK: xilosa quinasa, G3P:gliceraldehido 3 fosfato.	16
4	Diseño del sistema de electrostática.	23
6	Reactor para fermentación A) electrostática y B) reactor para electrofermentación.	30
7.	Efecto del voltaje (electrofermentación EF -0.7 V) en la fermentación de células (C) y extracto enzimático (EE) de <i>S. stipitis</i> . C: sin aplicación de voltaje, a) consumo de xilosa, producción de b) xilitol, c) ácido acético, d) etanol.	33
8	Perfil de producción de a) biomasa, b) producción de etanol y consumo de c) azúcares totales y d) azúcares reductores utilizando <i>Scheffersomyces stipitis</i> en medio YPX en fermentación electrostática aplicando 15 y 30 V. Se utilizó el mismo sistema sin la aplicación de voltaje (SV) como experimento control.	34
9	Efecto del voltaje (electrofermentación EF -0.7 V) en la fermentación de células (C) y extracto enzimático (EE) de <i>S. stipitis</i> . C: sin aplicación de voltaje, a) consumo de xilosa, producción de b) xilitol, c) ácido acético, d) etanol.	42
10	Efecto del voltaje (electrofermentación EF -0.7 V) en la fermentación de células (C) y extracto enzimático (EE) de <i>K. marxianus</i> SV: sin aplicación de voltaje, a) consumo de xilosa, producción de b) xilitol, c) ácido acético, d) etanol.	43
11	Cronoamperograma (tres réplicas) de las células de <i>K. marxianus</i> bajo el efecto de la electrofermentación.	44
12	Cronoamperograma (tres réplicas) del extracto enzimático de <i>K. marxianus</i> bajo el efecto de la electrofermentación.	45
13	Perfil de producción de a) consumo de xilosa, b) producción de xilitol y c) etanol utilizando extracto enzimático de <i>K. marxianus</i> mediante fermentación electrostática aplicando 5, 10, 20 y 30 V. Se utilizó el mismo sistema sin la aplicación de voltaje (SV) como experimento control.	47

14	Efecto del voltaje sobre la actividad de xilosa reductasa (XR) y rango de regeneración de NADH en células (A) y extracto enzimático (B) bajo electrofermentación, C) actividad de XR y D) cantidad de NADH bajo electrostática de <i>K. marxianus</i>	51
15	Efecto del voltaje (electrostática: SV=sin voltaje, 20 y 30 V) en la fermentación de xilosa sin RN por <i>Kluyveromyces marxianus</i> , Consumo de A) azúcares totales, B) azúcares reductores y C) producción de etanol.	58
16	Voltametría cíclica del rojo neutro a -0.7 V.	62

Dirección General de Bibliotecas UAQ

1. INTRODUCCIÓN

La sacarosa es el ingrediente más común utilizado en la industria alimentaria, provee textura, dulzura y vida útil. Sin embargo, el incremento global en el consumo de azúcar ha presentado consecuencias en la salud, incluyendo obesidad, diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares y problemas en la salud oral (Sahin *et al.*, 2018; Rafeek *et al.*, 2019).

Debido a lo anterior ha surgido el interés de buscar sustitutos de azúcares incluyendo polioles, también conocidos como alcoholes de azúcar o polialcoholes, (Rafeek *et al.*, 2019). Estos se consideran sustitutos del azúcar debido a su menor valor energético y también al hecho de que no contribuyen a la caries dental, las bacterias no pueden metabolizarlos (Sahin *et al.*, 2018).

Dentro de los polioles más utilizados se encuentran el sorbitol y el xilitol, este último es un azúcar de cinco carbonos que se encuentra naturalmente en la fibra de muchas frutas y vegetales incluyendo frutillas. Es un edulcorante utilizado como alternativa a la sacarosa, fructosa y demás endulzantes artificiales en alimentos (Sahin *et al.*, 2018; Morais *et al.*, 2019).

Puede ser obtenido por hidrogenación de la xilosa a altas temperaturas y presiones, sin embargo eso dificulta el proceso de purificación. Actualmente se están buscando alternativas para obtenerlo de manera biotecnológica a través del uso de microorganismos tales como levaduras. El xilitol se encuentra dentro de los doce productos químicos de mayor valor agregado para ser producido a partir de biomasa (Kresnowati *et al.*, 2019; Morais Junior *et al.*, 2019).

2. ANTECEDENTES

2.1 Xilitol

El xilitol es un polialcohol de azúcar de cinco carbonos, tiene aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica. Se produce a partir del segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, la hemicelulosa rica en xilano que en hidrólisis produce xilosa. Es un edulcorante natural de alimentos que se ha utilizado como sustituto de la sacarosa, aspartamo, sacarina y ciclamato (De Albuquerque *et al.*, 2015; Azarpazhooh *et al.*, 2016; Dasgupta *et al.*, 2017). Es reconocido como un producto químico importante derivado de los carbohidratos y potencialmente como un coproducto de biorefinería basado en biomasa vegetal. Está presente de forma natural en pequeñas cantidades en frutas, verduras, algas y hongos, lo que dificulta su extracción económica para aplicaciones industriales (Mohamad *et al.*, 2015a).

Es una fuente de carbohidratos independiente de insulina para los diabéticos insulino dependientes (Santos *et al.*, 2015), se caracteriza por tener menor valor calórico (2.4 cal g^{-1}) a comparación de la sacarosa. Además tiene propiedades anticariogénicas, que ayudan a reducir la formación de caries en los dientes al controlar el crecimiento bacteriano en especial de *Streptococcus*, (Mohamad *et al.*, 2015; Ghaffar *et al.*, 2017; López-Linares *et al.*, 2018), la dosis recomendada para la prevención de caries es de 6 a 10 g día⁻¹ (Rafeek *et al.*, 2019). Así mismo, es un preventivo contra otitis, infecciones del oído y vías respiratorias superiores (Venkateswar *et al.*, 2015).

Desde 1991 fue considerado como un aditivo alimentario según el *Codex Alimentarius* (Pérez-Bibbins *et al.*, 2016). Su uso en la formulación de alimentos cada vez va en aumento, principalmente por su alta estabilidad química y biológica lo que hace que sea útil como agente conservante de alimentos dado que puede extender la vida útil de los alimentos. Se utiliza como antioxidante, humectante, estabilizante y crioprotector que reduce el punto de congelación de algunos productos (Prakash *et al.*, 2011; Mohamad *et al.*, 2015). Proporciona sensación a frescura y no reacciona con los aminoácidos que son responsables de los efectos del oscurecimiento, lo que permite mantener el contenido de proteínas, por lo tanto

puede ser utilizado en productos como caramelos, helados, gelatinas, mermeladas y bebidas (Albuquerque *et al.*, 2014; Mohamad *et al.*, 2015).

En gomas de mascar y chocolates, el xilitol se utiliza para promover un efecto de enfriamiento debido a su alto calor endotérmico de solución (34.8 cal g^{-1}), para proporcionar textura y flexibilidad con un sabor similar a la sacarosa (Silva *et al.*, 2011). El consumo de xilitol se ha incrementado dramáticamente en los últimos años, que fueron aproximadamente 160,000 toneladas métricas en 2013 y se espera que sean de 242,000 toneladas métricas para 2020 (Venkateswar *et al.*, 2015). Del mismo modo, el valor de mercado del xilitol también está aumentando significativamente día a día, se estima en USD \$ 670 millones en 2013 a USD \$ 1 mil millones para 2020 con el precio de venta de USD \$ $4.5\text{--}5.5 \text{ kg}^{-1}$ para granel en industrias y USD \$ 20 kg^{-1} como producto final en los supermercados (Morais *et al.*, 2019).

2.2 Obtención de xilitol por método químico

El xilitol puede extraerse directamente de algunas frutas y verduras, sin embargo la cantidad que se obtiene es baja (Pérez-Bibbins *et al.*, 2016). Actualmente se obtiene mediante síntesis química (Figura 5) por el proceso de hidrogenación de xilosa, lo cual implica hidrólisis ácida de materiales lignocelulosicos, la purificación físico-química de la xilosa. Además del uso de catalizadores metálicos (níquel, paladio o rutenio) y gas de hidrógeno en un intervalo de temperatura de $120\text{--}160 \text{ }^\circ\text{C}$ y hasta 5.5 MPa de presión para posteriormente la cristalización y purificación de xilitol (Dasgupta *et al.* 2017; Jo *et al.*, 2017; Kresnowati *et al.*, 2019).

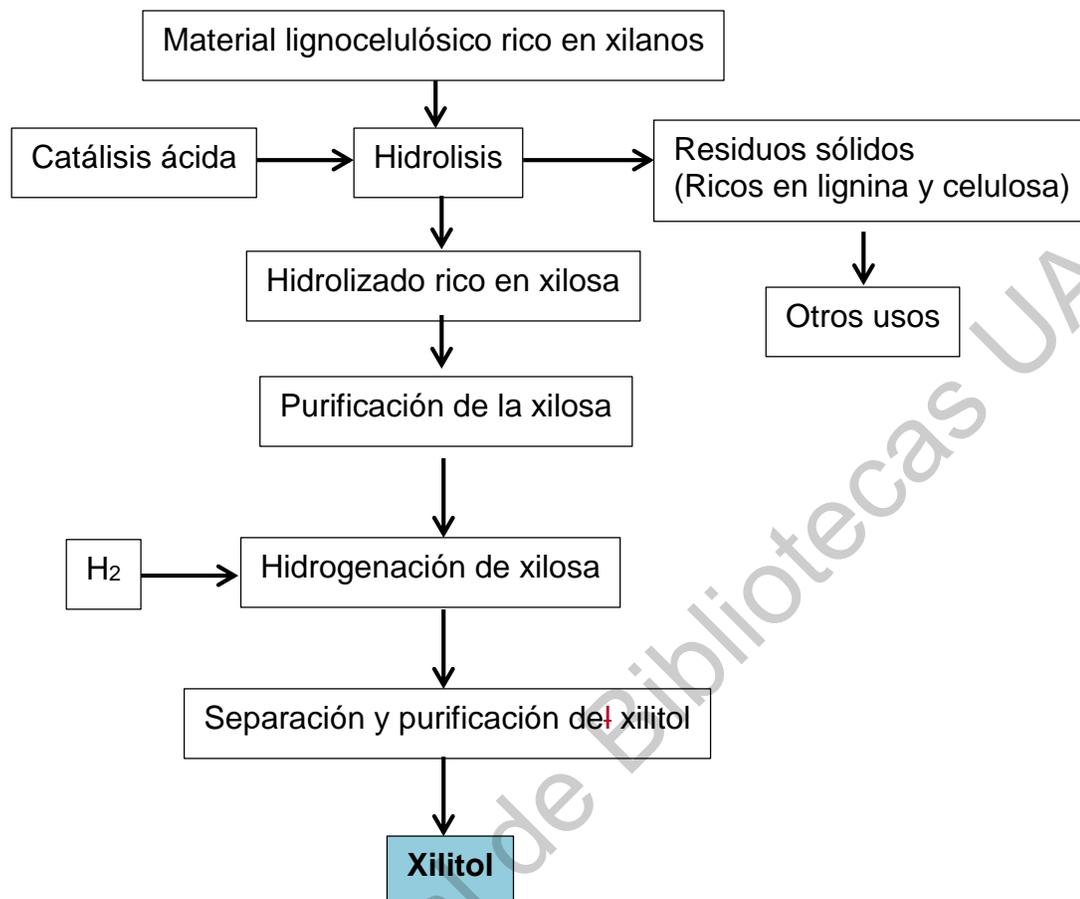


Figura 5. Principales pasos para la obtención de xilosa por ruta química (Delgado *et al.*, 2018).

En la hidrólisis de biomasa lignocelulósica se obtienen dos fracciones, la primera corresponde a la soluble (o hidrolizado) la cual se compone de xilosa, glucosa, arabinosa, galactosa y manosa, cuyas proporciones dependen de las condiciones de reacción y el tipo de biomasa. Este proceso se lleva a cabo utilizando ácido sulfúrico diluido en concentraciones entre 0.5-1.5 % (p p⁻¹) y un intervalo de temperatura entre 120-160 °C. Sin embargo, también se producen sustancias no deseadas como furfural e hidroximetilfurfural (HMF) así como la fracción no soluble que constituye a la lignina (Rafiqul y Sakinah, 2013).

Por otra parte en la purificación de la xilosa se eliminan o reducen los compuestos volátiles, fenólicos y subproductos indeseables. El hidrolizado pasa por

una serie de etapas de purificación que involucran la eliminación de sales disueltas, los productos de degradación y el color del hidrolizado. Los tratamientos con carbón activado y cromatografía de intercambio iónico son los más eficientes para decolorar el hidrolizado y eliminar compuestos fenólicos, furfural y HMF, sin pérdida de xilosa. Otros tratamientos de purificación utilizan métodos físicos, químicos y biológicos que incluyen ultrafiltración, neutralización y extracción con solventes por mencionar algunos (Ur-Rehman, 2015).

La hidrogenación es una reacción de tipo redox, donde dos átomos de hidrógeno se incorporan a la molécula orgánica en presencia de un catalizador metálico, a altas temperaturas y presiones. Los iones metálicos actúan como agentes de transferencia de electrones eficientes llevando a cabo la reducción del aldehído en alcohol. La molécula D-xilosa, monosacárido de tipo aldopentosa, se puede reducir mediante reacciones de hidrogenación formando polialcohol o alditol. La xilosa se adsorbe a los sitios activos en la superficie del catalizador, mientras que la molécula de hidrógeno sufre una disociación para después formar un nucleófilo, en el cual el par de electrones de la misma ataca al carbono del grupo carbonilo (C=O). La protonación resultante de la adición de hidrógeno con la aparición de un grupo alcohol (CH-OH) genera D-xilitol el cual se puede isomerizar de manera irreversible en un medio ácido. La xilosa se isomeriza para formar xilulosa presentando un mecanismo de hidrogenación como se muestra en la Figura 6, sin embargo, podría producirse D-arabinitol además de D-xilitol, dependiendo del lado de la molécula en la que el hidrógeno ataca al carbono del carbonilo (Delgado *et al.*, 2018).

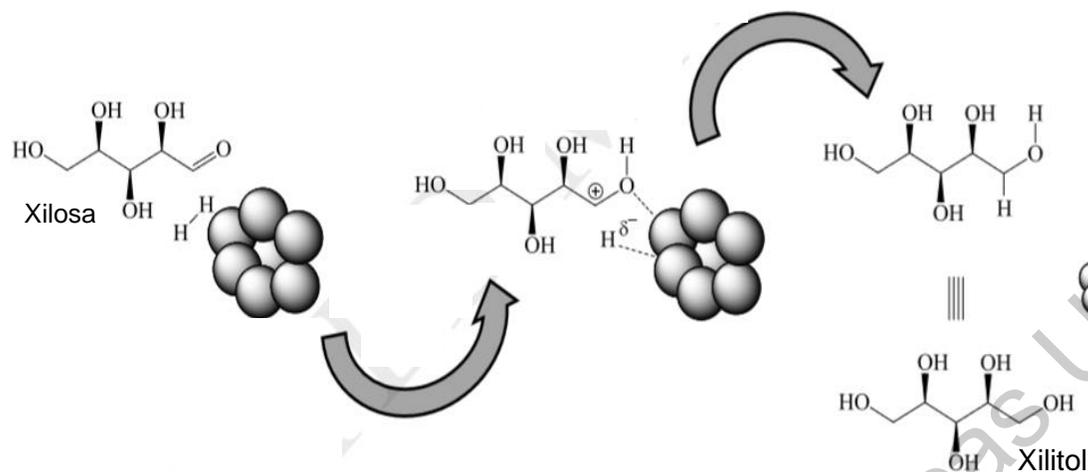


Figura 6. Hidrogenación catalítica de D-xilosa a D-xilitol (Delgado *et al.*, 2018).

Después de la hidrogenación de xilosa, sigue la purificación de xilitol donde las soluciones hidrogenadas pasan por las etapas de purificación, concentración y cristalización de xilitol (Rafiqul y Sakinah, 2014). La cristalización es un proceso de separación en el que se crea una fase sólida a partir de una fase líquida. Ocurre de varias maneras, entre ellas por enfriamiento, evaporación o precipitación, dependiendo de las pendientes de solubilidad y saturación con la temperatura. Los pasos principales en este proceso son la sobresaturación, la nucleación y el crecimiento de cristales. La pureza de la solución, la concentración de disolventes, la temperatura, la velocidad de enfriamiento y la agitación son factores que influyen en la velocidad de nucleación, el crecimiento y la pureza de los cristales de xilitol. El rendimiento de cristalización puede alcanzar más del 75 %, con una pureza superior al 98 % (Vallejos y Area, 2017).

Sin embargo, los rendimientos del proceso de conversión química de xilitol son bajos y costosos debido a la exigencia tanto de altos valores de temperatura como de presión. Además, se requieren altas cantidades de agua para la purificación de xilosa a partir de hidrolizados de hemicelulosa y debido a que se producen una cantidad invariable de subproductos los costos de purificación del

xilitol son altos, aunado al efecto negativo hacia el ambiente (Ghaffar *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2018).

2.3 Alternativas biotecnológicas para la obtención del xilitol

2.3.1 Producción microbiológica

Debido a los inconvenientes de la obtención del xilitol mediante el proceso químico se han buscado alternativas biotecnológicas. La obtención del xilitol se puede llevar a cabo mediante fermentación de xilosa en condiciones más suaves con la liberación de menores cantidades de subproductos (Oh *et al.*, 2013; Pérez-Bibbins *et al.*, 2016; Ghaffar *et al.*, 2017).

El xilitol puede ser producido biológicamente a través de microorganismos (hongos, bacterias y levaduras) capaces de convertir xilosa a xilitol de manera nativa (Cuadro 1) o mediante el uso de cepas recombinantes tales como se muestran en el Cuadro 2. Por lo tanto la producción a través del proceso de fermentación es más atractivo (Perez-Bibbins *et al.*, 2015).

De los microorganismos productores de xilitol, las levaduras tienen el potencial de producir un mayor rendimiento de xilitol dado que poseen la capacidad de consumir xilosa de manera nativa. Dentro de las cuales se encuentra *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida spp* y *Scheffersomyces stipitis* (Baptista *et al.*, 2018).

2.3.1.1. *Scheffersomyces stipitis*

Scheffersomyces stipitis, anteriormente conocida como *Pichia stiptis* (Figura 7), es capaz de fermentar los azúcares que se encuentran en los residuos agroindustriales tales como glucosa, manosa, galactosa, ramnosa, xilosa, arabinosa, celobiosa e incluso algunos compuestos relacionados con la lignina (Liu *et al.*, 2012). Es una levadura Crabtree negativa, es decir cultivadas en aerobiosis y a concentraciones altas de glucosa, la oxidan en lugar de fermentarla (Rodicio y Heinisch, 2009). Además, es muy conocida por su capacidad de fermentar pentosas

en etanol, teniendo una de las capacidades nativas más altas para la fermentación de xilosa a baja tasa de transferencia de oxígeno (Papini *et al.*, 2012).

Presenta requisitos de crecimiento simples, crece en intervalos de temperatura entre 25 - 37 °C y valores de pH entre 5 y 6, siendo 30 °C su temperatura óptima y pH óptimo 5.5. Tiene una gran resistencia a la contaminación y la desintoxicación de los inhibidores derivados de la biomasa (Liu *et al.*, 2012).

La capacidad para metabolizar xilosa por parte de *S. stipitis* se debe a que posee transportadores específicos y no específicos para esta pentosa (Kricka *et al.*, 2015). Los transportadores específicos emplean sistemas simporte protonados mientras que los no específicos son mediante difusión facilitada (Leandro *et al.*, 2006). Se ha observado que la poca afinidad de los transportadores de hexosas hacia la xilosa es un factor limitante, aunado a la fuerte regulación que ejerce la glucosa y que afecta su expresión (Sánchez *et al.*, 2015). Existen pocas especies de levadura que, además de la actividad común de xilosa reductasa (XR) ligada a NADPH, también contiene actividad XR ligada a NADH, por lo que la fermentación de xilosa en condiciones limitantes de oxígeno es posible ya que el exceso de NADH puede ser transportado a la formación de xilitol (Liang *et al.*, 2014). Sin embargo, existen algunos inconvenientes que aún no se han podido evitar tales como que la formación de xilitol va a expensas del rendimiento de etanol en xilosa, la fermentación alcohólica de xilosa sin formación de xilitol solo es posible cuando XR y XDH dependen del mismo cofactor. Esto es equivalente a la interconversión de un solo paso de xilosa a xilulosa por xilosa isomerasa que ocurre solo en bacterias y Archaea que metabolizan xilosa (Kuyper, Winkler, Van Dijken, & Pronk, 2004). Se han realizado varias investigaciones para modificación genética para aumentar o generar la producción de xilitol, sin embargo existen algunas limitantes tales como lo mencionado por Sonderegger y Sauer, (2003) quienes reportan que XR/XDH expresados en *S. cerevisiae* provocaron un crecimiento lento utilizando xilosa). Por lo tanto, a pesar de los trabajos de ingeniería genética que se han elaborado no se logra tener la capacidad de *S. stipitis* de crecer en xilosa y poder generar xilitol. Además *S. stipis* tiene mayor capacidad respiratoria que *S. cerevisiae* debido a que

esta última carece del complejo I. Complejo importante de la cadena respiratoria donde se lleva a cabo reducción de NAD⁺. Así mismo, *S. stipitis* cuenta con la presencia de un sistema de respiración alternativo que dona electrones directamente al O₂ de la ubiquinona, ramificándose antes del complejo del citocromo C (Caspeta *et al.*, 2012).

En la actualidad se está utilizando biomasa o el uso combinado de sustratos para potenciar la generación de productos de interés, sin embargo cuando se ha utilizado una mezcla de glucosa y xilosa como fuente de carbono se ha reportado un rendimiento máximo de xilitol de 2.02 g L⁻¹ (Santos *et al.*, 2016). No obstante, la cantidad de xilitol que produce es baja debido a que la formación de xilitol depende de las condiciones de aireación del medio, en condiciones limitantes de oxígeno se ve favorecida la producción de xilitol debido a la acumulación de NADH. Lo cual causa un desequilibrio metabólico en la capacidad reductora oxidativa de cofactores causado por las diferentes preferencias de las enzimas xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa (Farias *et al.*, 2014). Existen varios reportes donde se ha evaluado la aireación siendo desde 0.05 a 1 vvm en la producción de xilitol (Farias *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2016). Por lo tanto, se debe de tener en cuenta siempre la cantidad de oxígeno presente en el medio para garantizar que el consumo de xilosa se destine para la producción de xilitol y no a la generación de biomasa celular.

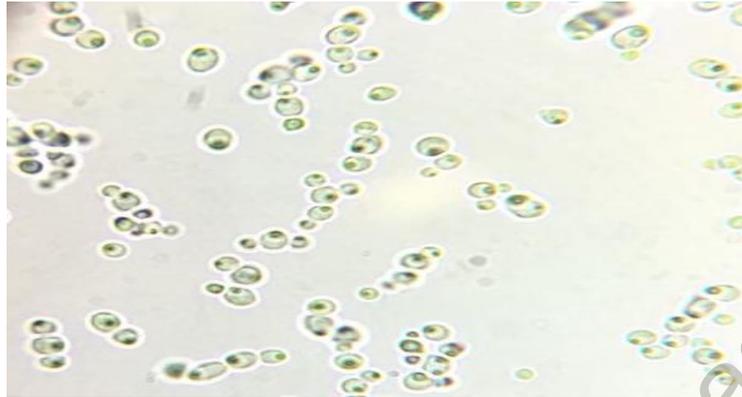


Figura 7. Micrografía electrónica de barrido (100 x) de un grupo de células de *Scheffersomyces stipitis* a las 48 horas de crecimiento en medio definido (g L^{-1}): xilosa 4, sulfato de amonio 0.755, sulfato de magnesio 0.034, fosfato de potasio 0.191, cloruro de calcio 0.015, vitaminas (biotina y tiamina), 30 °C, 170 rpm.

2.3.1.2. *Kluyveromyces marxianus*

Kluyveromyces marxianus es una levadura que tiene la capacidad de fermentar pentosas al igual que *S. stipitis*, es capaz de crecer en glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa y lactosa como única fuente de carbono. Crece a 40 °C como temperatura máxima pero soporta hasta 52 °C lo cual permite disminuir costos y tiempo para enfriar el reactor después de la hidrólisis cuando se utiliza material lignocelulósico. Es una levadura homotética, esta filogenéticamente relacionada con *S. cerevisiae*, tiene un tiempo de duplicación corto de 52 minutos y es el eucariote con la velocidad de crecimiento más rápida en el planeta, puede crecer a bajas concentraciones de oxígeno. Es capaz de utilizar dos metabolismos diferentes tales como respiración y fermentación, cuando el oxígeno no es limitante la respiración puede ser exclusiva en esta levadura (Melanie *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015; Gombetr *et al.*, 2016). Tiene ausente el complejo 1 en la cadena respiratoria por lo que posee tres NADH deshidrogenasas alternativas ubicado en la membrana interna mitocondrial, de esta manera, el NADH generado en la matriz mitocondrial se oxida por la deshidrogenasa NDE1P alternativa interna mitocondrial, mientras que las enzimas externas, NDE1P y NDE2P, oxidan NADH citosólico (Dos Santos *et al.*, 2013). Se considera como

levadura GRAS (generalmente reconocida como segura) y QPS (presunción de seguridad calificada) en EUA y unión europea (Melanie *et al.*, 2010). Tiene dos genes que codifican para permeasa de lactosa y β -galactosidasa los cuales le permiten transportar e hidrolizar intracelularmente lactosa, una vez hidrolizada en glucosa y galactosa, la glucosa se incorpora a la vía de la glucólisis y la galactosa se incorpora a la ruta de Leloir (Graciano *et al.*, 2008).

Es utilizada en la producción de bioingredientes, solventes, etilacetato, saborizantes, fragancias, etanol, feniletanol, fenilalanina, ácido hexanoico y acetato de etilo (Graciano *et al.*, 2008; Pentjuss *et al.*, 2017). En términos de estudios bioquímicos sobre enzimas de interés industrial *K. marxianus* se ha utilizado como fuente de inulinasa, β -galactosidasa, β -glucosidasa y endopoligalacturonasas (Graciano *et al.*, 2008).

Debido a que es una levadura termotolerante la enzima xilitol reductasa (XR) responsable de la producción de xilitol presenta ciertas características únicas a comparación de las que poseen otras levaduras no convencionales. Tales como temperatura óptima de 45 °C y termoestabilidad, la cual es atribuida a la presencia de ciertos aminoácidos como leucina y glutamato (12.2 y 8.20 % p p⁻¹ de toda su composición) en comparación con *S. stipitis*. Por otra parte, posee un pH óptimo de 6.5 esto debido a los cambios de protonación de los residuos de su sitio activo que cataliza la reacción de reducción (Dasgupta *et al.*, 2015).

Cuadro 1. Microorganismos productores de xilitol a través de la fermentación de xilosa o de material lignocelulósico.

Microorganismo	Condición y producción de xilitol	Referencia
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Medio YPX (100 g L ⁻¹ xilosa), levadura inmovilizada en matriz de alginato de calcio.	Prakash <i>et al.</i> , 2011 Xilitol 73.8 g L ⁻¹ y rendimiento de 0.82 g g ⁻¹ .
<i>Candida tropicalis</i> DSM7524	Cascara de plátano (70 g L ⁻¹ xilosa), 30 °C, 200 rpm.	Rehman <i>et al.</i> , 2013 Xilitol 24.7 g L ⁻¹ .
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Bagazo de manzana (36 g L ⁻¹ xilosa), 30 °C.	Alburquerque <i>et al.</i> , 2014 Xilitol 35 g L ⁻¹ .
<i>Candida Guillermondii</i> 20037	Paja de caña de azúcar (57 g L ⁻¹ xilosa) Fil suplementado con maltosa, sacarosa, celobiosa o glicerol, 200 rpm, 48 h.	Hernandez-Perez <i>et al.</i> , 2015 36.11 g L ⁻¹ xilitol con productividad volumétrica de 0.75 g L ⁻¹ h ⁻¹ .
<i>Candida tropicalis</i>	Tallo de algodón y 10.41 g L ⁻¹ xilosa.	Sapci <i>et al.</i> , 2015 Rendimiento 36 % v v ⁻¹ de xilitol y producción 0.06 g L ⁻¹ .
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	Jarabe de caña de azúcar, 200 rpm, 30°C.	Santos <i>et al.</i> , 2016 Xilitol 2 g L ⁻¹ .
<i>Sugiyamaella xilolitica</i>	Medio YPX (2 % xilosa), 200 rpm.	Sana <i>et al.</i> , 2017 Rendimiento de 0.668 g g ⁻¹ , 12.85 g L ⁻¹ xilitol.
<i>Trametes membranacea</i>	YPX (20 g L ⁻¹ xilosa + nutrientes), 150 rpm, 28 °C, 96 h.	Rissi <i>et al.</i> , 2018 Xilitol 0.97 g L ⁻¹ , rendimiento de 36 % v v ⁻¹ .
<i>Candida tropicalis</i>	Medio YPX (20 g L ⁻¹ xilosa), 48 h, 30 °C, 150 rpm.	Zegale <i>et al.</i> , 2018 Xilitol 9 g L ⁻¹ .
<i>Candida tropicalis</i>	Hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (177 g L ⁻¹ xilosa).	Morais <i>et al.</i> , 2019 Xilitol 109.5 g L ⁻¹ , rendimiento 0.86 g g ⁻¹ y productividad de 2.81 g L ⁻¹ h ⁻¹ .

Cuadro 2. Microorganismos productores de xilitol a través de alguna modificación genética.

Microorganismo	Condición y producción de xilitol	Referencia
<i>Gluconobacter thalandicus</i> + <i>E. coli</i> (cocultivo)	Expresión de genes xilitol y alcohol deshidrogenasa de <i>Gluconobacter thalandicus</i> en <i>E. coli</i> , 40 g L ⁻¹ arabitól. Xilitol 34.34 g L ⁻¹ .	Zhang <i>et al.</i> , 2018
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Expresión de xilosa isomerasa, XR y XDH a partir de <i>Clostridium phytofermentans</i> . Xilitol 13 g L ⁻¹ .	Cunha <i>et al.</i> , 2019
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Disrupción del gen <i>KmHX1</i> para evitar la represión de glucosa en la utilización de xilosa. Xilitol 120 g L ⁻¹ .	Hua <i>et al.</i> , 2019
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	Mutación XYL3-Δ1 (disrupción del gen que codifica D-xilulquinasa). Xilitol 26 g L ⁻¹	Yon-Su y Jeffries, 2005
<i>Escherichia coli</i>	Expresión de XR a partir de <i>Candida tropicalis</i> y glucosa deshidrogenasa a partir de <i>Bacillus cereus</i> . Xilitol 145.8 g L ⁻¹ , rendimiento de 0.97 g g ⁻¹ .	Chang <i>et al.</i> , 2018
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	Disrupción del gen de D- xilulokinasa. Xilitol 8 g L ⁻¹ con productividad de 0.18 g g ⁻¹ .	Rodriguez <i>et al.</i> , 2011
<i>Escherichia coli</i>	Expresión de XR a partir de <i>Neurospora crassa</i> eliminación de los genes de la xilosa isomerasa y xilulosa quinasa. Xilitol 172.4 g L ⁻¹ con una productividad de 1.57 g L ⁻¹ h ⁻¹ .	Su <i>et al.</i> , 2015
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Sustitución de aminoácido de cisteína a tirosina en la posición 36 causando aumento de actividad de XR. Xilitol 22 g L ⁻¹ .	Jin-Seong <i>et al.</i> , 2015

2.3.1.3 Inconvenientes de la producción microbiológica de xilitol

A pesar que la producción microbiológica de xilitol presenta varias ventajas a comparación del método químico, se deben de tener en cuenta diversos factores necesarios para tener una producción eficiente de xilitol. Tales como la fuente de carbono, fuente de nitrógeno, disponibilidad de oxígeno, control de las condiciones de cultivo (temperatura, pH, agitación, aireación, inhibidores celulares, condiciones del reactor, inmovilización y concentración del inóculo) y naturaleza genética de la cepa microbiana (Baptista *et al*, 2018).

Por lo tanto, la aplicación del proceso microbiano a nivel industrial presenta algunas dificultades tales como la alta demanda de tiempo debido a la necesidad de llevar a cabo la esterilización y preparación rutinaria de inóculos que implican gastos de energía, tiempo y trabajo, lo que se refleja a su vez en la productividad (Rafiqul y Sakinah, 2012). En cuanto al uso de cepas modificadas es importante la adición de cosustrato para obtener un mayor rendimiento de xilitol por gramo de xilosa consumida. Además, la nula aceptación de productos obtenidos mediante modificaciones genéticas por parte de la sociedad limita la obtención de xilitol mediante microorganismos modificados.

2.3.2 Tecnología enzimática para la producción de xilitol

El proceso enzimático es una de las alternativas biotecnológicas a los procesos químicos y microbianos para la producción de xilitol. La bioreducción de xilosa mediada por la enzima xilosa reductasa (XR) depende del cofactor NAD(P)H; por lo tanto, se utiliza 1 mol de cofactor por mol de xilitol producido. Se ha reportado una conversión de más del 90 % p p⁻¹ debido a la transformación directa de xilosa en xilitol lo cual no ocurre mediante el proceso fermentativo debido a la desviación de xilosa para mantenimiento celular (Freitas *et al.*, 2011; Rafiqul y Sakinah, 2012).

Existen varios trabajos de la conversión enzimática de xilosa a xilitol, Kitpreechavanich *et al.* (1986) reportaron el uso de XR de *Candida pelliculosa* junto con el sistema oxidorreductasa de *Methanobacterium sp* lográndose la reducción de

NADP⁺ a NADPH con una conversión de xilosa de 90 % p p⁻¹ a xilitol a las 24 h. Así mismo, Nidetzky *et al.* (1996) optimizaron la producción de xilitol haciendo uso de XR de *Candida tenuis* que en acción con la glucosa deshidrogenasa de *Bacillus cereus* lograron la regeneración de NADH. Se debe de tener en cuenta que la enzima XR debe de tener características tales como estabilidad a largo plazo, actividad dependiente a NADPH y usencia de inhibición del producto de xilitol. Se ha reportado que el uso de enzimas provee varias ventajas sobre el uso de microorganismos para la conversión de xilosa a xilitol, tales como transferencia de masa en reactores enzimáticos homogéneos sin limitaciones y transformación directa hacia la producción de xilitol (Freitas *et al.*, 2011).

2.3.3. Conversión de xilosa a xilitol

El proceso de conversión de la xilosa a xilitol se lleva a cabo a través de dos pasos: reducción y oxidación. En la primera etapa, la D-xilosa se reduce a xilitol por una xilosa reductasa (XR) la cual tiene la capacidad de utilizar como cofactor el NADH o NADPH. Posteriormente el xilitol se oxida a xilulosa por xilitol deshidrogenasa (XDH) la cual utiliza el NAD para después fosforilarse en xilulosa-5-fosfato, catalizada por xiluloquinasa (XK) para entrar a la vía de las pentosas fosfatos para ser convertido en compuestos de C6 y C3. Estos compuestos luego ingresan a la glucólisis como se muestra en la

Figura 8 (Kuyper *et al.*, 2004; Agbogbo y Coward-Kelly, 2008). La XR y XDH son enzimas clave en la fermentación de D-xilosa y la producción de xilitol (Chang

et al., 2018; Xu *et al.*, 2019). La acumulación de xilitol es promovida por una restricción en la disponibilidad de oxígeno, condición en la que la actividad XDH está limitada debido a un desequilibrio redox de NAD^+/NADH , que resulta en la reducción de la formación de xilulosa (Hernández-Pérez *et al.*, 2016).

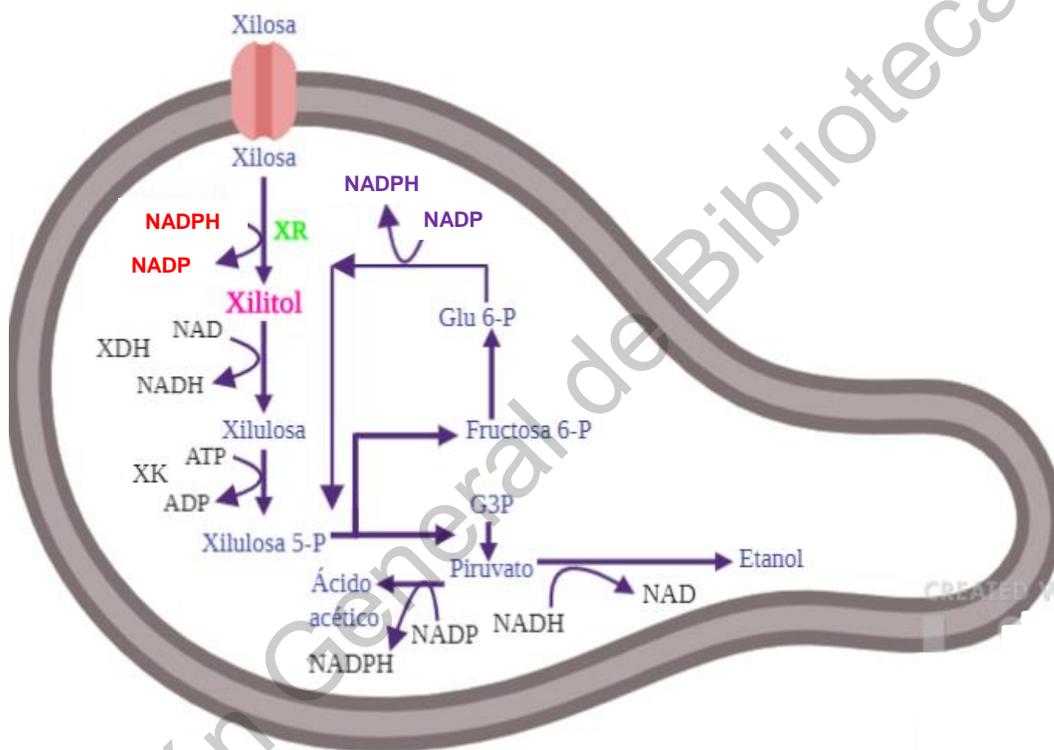


Figura 8. Vía metabólica de xilosa en levaduras. XR: xilosa reductasa, XDH: xilosa deshidrogenasa, XK: xilosa quinasa, G3P: gliceraldehído 3 fosfato.

El NADH es el principal cofactor responsable de ciertas reacciones enzimáticas resultando en la regulación de NAD a su forma reducida NADH para mantener la homeostasis celular. Modificando el flujo redox dependiente de NADH en una reacción biocatalítica se busca la regeneración del rango de NADH para mantener el equilibrio. Potencialmente el balance redox podría ser alcanzado a

través de fermentación electroquímica conocida como electrofermentación (Nikolaos *et al.*, 2017).

2.4 Electrofermentación

El balance redox se puede regular a través de la electrofermentación, un concepto donde los microorganismos usan electrodos para disponer o recibir electrones. Es un proceso en el cual se modifica el potencial óxido reducción extracelular por suministro de energía en forma de corriente eléctrica a través del uso de electrodos (Shin *et al.*, 2002; Nikolas xafenias *et al.*, 2017). El sistema de electrofermentación consiste en un reactor tipo H el cual tiene dos celdas unidas a través de una membrana de intercambio catiónico. Una celda funciona como el cátodo donde se utiliza la fuente de carbono, el microorganismo, un mediador de electrones y la otra funciona como el ánodo donde se utiliza una solución amortiguadora. En el ánodo se producen iones de hidrogeno en condiciones abióticas debido a la oxidación del agua, estos pasan a través de la membrana de intercambio catiónico donde los microorganismos los utilizan junto con los electrones, sustrato y el NADH para producir metabolitos reducidos. De esta manera las rutas fermentativas pueden potenciarse electrónicamente al influir en los transportes electrónicos específicos y mediante la mejora de los mecanismos de conservación de la energía en forma de ATP. A diferencia de las celdas microbianas en este sistema se utilizan los electrones para generar más productos de valor agregado. La transferencia de electrones del cátodo puede modificar el potencial redox del microorganismo, lo cual puede ser utilizado para resolver algunas restricciones de la fermentación convencional (Ali *et al.*, 2016; Schievano *et al.*, 2016).

En el reactor tipo H se utilizan electrodos los cuales van conectados a una fuente de poder. Sin embargo, los electrodos deben de tener ciertas características tales como: conductividad moderada a alta, estabilidad biológica, química y física, deben de ser económicos, además de tener una superficie de contacto alta. Se pueden utilizar como electrodos acero inoxidable, platino, grafito y carbono. Los electrodos de grafito y carbono presentan varios beneficios como costo adecuado,

mayor área de superficie (debido a la porosidad), estabilidad, buena conducción electrónica, capacidad de absorción perfecta y buena biocompatibilidad. No obstante, tienen menor resistencia mecánica en comparación con los electrodos metálicos (Ali *et al.*, 2016; Zhen *et al.*, 2018).

La transferencia de electrones extracelulares entre los electrodos y los microorganismos electroactivos es a través de la transferencia directa y transporte transmembrana utilizando nanocables, citocromos, NADH-ubiquinona oxidorreductasa, hidrogenasa y otras enzimas unidas a la membrana (Moscoviz, 2016). El transporte transmembranal al citoplasma esta mediado por moléculas específicas. Los mediadores redox solubles como tionina, metilviológeno, rojo neutro, riboflavinas, ácidos húmicos, entre otros, pueden actuar como lanzaderas electrónicas desde la superficie del electrodo al microorganismo y también difunden a través del periplasma a los citoplasmas agentes oxidantes/reductores para la pareja NADH/NAD⁺ (Schievano *et al.*, 2016; Bhanu *et al.*, 2018; Mohan *et al.*, 2019). El rojo neutro (RN) es un transportador de electrones de uso común debido a su alta estabilidad, solubilidad, baja toxicidad así como a su bajo potencial de reducción estándar (-525 mV a Ag/AgCl⁻¹) el cual es similar al NAD⁺/NADH. Los electrones del electrodo se utilizan para reducir el rojo neutro para posteriormente ser entregados al producto de interés (In *et al.*, 2017).

En la electrofermentación existe una modificación electroquímica del metabolismo fermentativo microbiano a través de cambios en el balance de NAD⁺/NADH lo cual impacta significativamente en el espectro de productos finales obtenidos en la fermentación (Schievano *et al.*, 2016). En el metabolismo microbiano se genera NADH (NAD⁺ a NADH) por reacciones de oxidación, es decir 2 moléculas de NADH generados a partir de una molécula de glucosa en la glucólisis (Ali *et al.*, 2016).

Se ha reportado que cuando se aplica voltaje a un cultivo microbiano se modifica su metabolismo, expresándose más genes responsables de la reducción de NAD⁺ a NADH (Zhen *et al.*, 2018). Por otro lado, Kim *et al.* (2018) reportaron una

modificación en la expresión de enzimas involucradas en el metabolismo del carbono intracelular lo que permitió la regulación de la vía metabólica.

En la electrofermentación se debe de buscar una menor pérdida óhmica, la cual es la resistencia lineal del flujo de electrones a través del material del electrodo y las varias interconexiones, también como la resistencia al flujo de iones a través de la membrana y el electrolito. Las pérdidas pueden ser reducidas minimizando el espacio entre los electrodos del cátodo y ánodo usando un separador de baja resistencia e incrementando la conductividad del electrolito al máximo tolerado por el microorganismo (Koroglu *et al.*, 2019).

De esta manera se ha reportado que modificando el metabolismo de *S. cerevisiae* de manera reductiva u oxidativa se disminuye el uso de reactivos para equilibrio redox, se tiene mayor crecimiento microbiano y producción de etanol a las 20 horas mediante electrofermentación (Shin *et al.*, 2002). Así mismo, Kracke y Kromer, 2014 demostraron que existe un potencial para aumentar los rendimientos de glutamato a partir de glucosa en un 10-15 % cuando el rojo neutro está mediando los electrones del cátodo como fuente de energía adicional. En el Cuadro 3 se pueden ver algunos ejemplos de electrofermentación utilizando diferentes levaduras y condiciones de fermentación. Actualmente no existen reportes sobre el uso de electrofermentación utilizando la levadura *S. stipitis* o *K. marxianus* para la producción de xilitol. Sin embargo, este es un subproducto común de la fermentación de xilosa. Principalmente como resultado del desequilibrio del cofactor entre la reacción catalizada por la xilosa reductasa dependiente de NADPH (normalmente con preferencia por NADPH y xilitol deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (Albuquerque *et al.*, 2014). Debido a lo anterior, la electrofermentación podría impactar significativamente en el espectro de productos finales obtenidos en la fermentación a través de cambios en el balance de NAD⁺ /NADH.

Cuadro 3. Ejemplos donde se ha utilizado el proceso de electrofermentación.

Levadura	Condiciones	Electrofermentación alcohólica	Referencia
<i>Clostridium thermocellum</i> y <i>S. cerevisiae</i>	Electrofermentación: 0-10 V, 100 rpm, pH 5.5-6, cada microorganismo fue crecido en medios diferentes.	La mayor producción de etanol se obtuvo a 1.5 V. <i>C. thermocellum</i> 1.68 g L ⁻¹ y <i>S. cerevisiae</i> produjo 52.50 g L ⁻¹ .	Shin <i>et al.</i> , 2002
<i>S. cerevisiae</i>	Electrofermentación con 15 V; mezcla de fermentación es levadura seca (12 g L ⁻¹), glucosa (200 g L ⁻¹), agua desionizada, pH 5, 30 °C.	Se obtuvo un rendimiento de 12.30 % a las 24 h de fermentación; control sin aplicación de voltaje 4.8 % rendimiento.	Mathew <i>et al.</i> , 2015
<i>Candida peltata</i>	Electrofermentación con 2 V 30 g L ⁻¹ xilosa.	Se generó xilitol 0.5 g L ⁻¹ , mientras que se produjo 0.22 g L ⁻¹ en el biorreactor convencional a las 48 h.	Park <i>et al.</i> , 2005

2.5 Justificación

El xilitol es un polialcohol de azúcar de cinco carbonos. Es un edulcorante natural de alimentos que se ha utilizado como sustituto de sacarosa, es una fuente de carbohidratos independiente de insulina para los diabéticos. Así mismo, tiene capacidad potencial para reducir la caries dental y se caracteriza por tener menor valor calórico (2.4 cal g^{-1}). No se han reportado efectos secundarios en el cuerpo (Ghaffar *et al.*, 2017; López-Linares *et al.*, 2018a). Su uso en la formulación de alimentos cada vez va en aumento, principalmente por su alta estabilidad química y biológica. Es una opción como agente conservante de alimentos y no reacciona con los aminoácidos responsables de los efectos del oscurecimiento, por lo tanto puede ser utilizado en productos como caramelos, helados, gelatinas y bebidas (Lima *et al.*, 2014; Mohamad *et al.*, 2014). Actualmente, se estima que la demanda del mercado anual de xilitol es 125,000 toneladas y un precio por kg de USD\$ 4.5-5.5. Debido a que la obtención de xilitol mediante hidrogenación de xilosa es costosa y provoca daños ambientales, se plantean alternativas biotecnológicas para la obtención de xilitol mediante fermentación de xilosa utilizando levaduras como *Scheffersomyces stipitis* y *K. marxianus* (Ashoor, Comitini y Ciani, 2015). Otra alternativa a las fermentaciones microbianas es el uso de enzimas dado que se evitan las limitaciones de transferencia celular, se puede permitir una fácil recuperación de xilitol. Sin embargo la cantidad de xilitol obtenida por fermentación con estas levaduras depende del desequilibrio metabólico en la capacidad reductora oxidativa de cofactores, causado por las diferentes preferencias de las enzimas xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa. Así mismo, éstas dependen de la cantidad de oxígeno presente en el medio de cultivo, se ha reportado que condiciones limitantes de oxígeno favorecen la acumulación de NADH y con esto se tiene mayor producción de xilitol. De la misma manera, se ha reportado que el uso de electrodos en el medio de cultivo provee electrones por lo que estos podrían ser utilizados por la enzima xilosa reductasa para la reducción de NAD y con ello favorecer la oxidación de xilosa y la generación de xilitol.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la electrofermentación y reducción enzimática de xilosa para la producción de xilitol utilizando *Scheffersomyces stipitis* y *Kluyveromyces marxianus*

3.1.1 Objetivos específicos

- Diseñar y construir un reactor para la fermentación electrostática y electrofermentación a nivel laboratorio.
- Evaluar el efecto del voltaje sobre la producción de xilitol variando la fuente de carbono, tipo de levadura, tipo y sistema de bioconversión electrostática.
- Caracterizar los productos de fermentación de los sistemas de bioconversión ensayados.
- Determinar la actividad enzimática de xilosa reductasa y regeneración de NADH del sistema y productividad de xilitol.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Construcción del sistema para fermentación electrostática

El sistema de electrofermentación se construyó modificando el modelo lo reportado por Mathew *et al.*, (2015). El sistema de fermentación electrostático (Figura 5) se construyó con un conjunto de dos electrodos y un recipiente de polipropileno de 5.2 x 7.5 x 5 cm de área. Los electrodos fueron de las siguientes características: un electrodo de carbono de 13 cm de alto y un electrodo de alambre de cobre calibre 24. Los dos electrodos fueron conectados a una fuente con voltaje en corriente continua (GPS-3030DD, Gwinstek, EUA) y un amperímetro (Mut-33, Truper, China). Con este arreglo se evitó que el voltaje aplicado causara una corriente en el circuito. Los electrodos estuvieron sostenidos a la tapa del recipiente (4 cm de diámetro), la cual fue perforada para introducir una manguera de silicón de 6 mm de diámetro (AZ15005A, Azoo, China) que fue conectado a una bomba de aire (HA802, Hagen, España) para permitir la aireación del sistema.

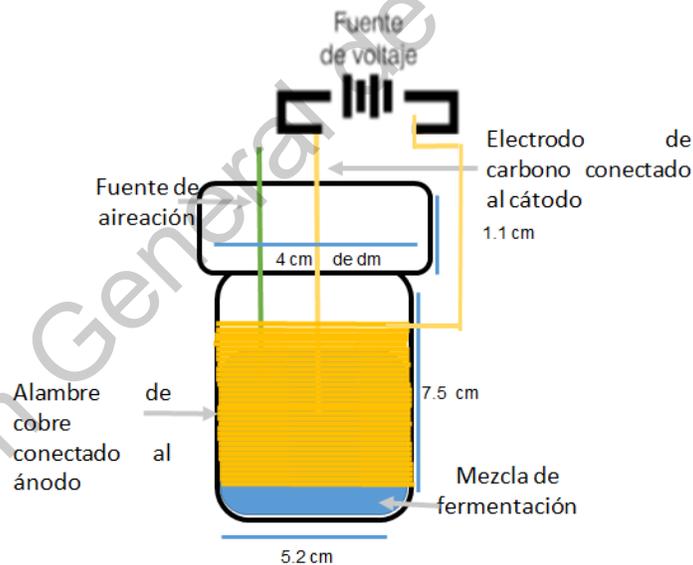


Figura 9. Diseño del sistema de electrostática. dm: diámetro

4.2 Construcción del reactor tipo H para la electrofermentación

Se diseñó y construyó un reactor tipo H tal como lo reporta Xiang *et al.*, 2017 con algunas modificaciones. El reactor consistió en dos cámaras de vidrio (ánodica y cátodica) de borosilicato con capacidad de 250 mL con una altura de 143 y 70 mm de diámetro cada uno, las cuales fueron separadas con una membrana de intercambio protonico (Nafion® N117; Ion Power, EUA). Como electrodo de trabajo contraelectrodo se utilizó fieltro de grafito con 20 % p p⁻¹ de platino con un área de 52 cm². El electrodo de trabajo (cátodo) fue conectado a través de un potencióstato multicanal (VSP, BioLogic, EUA), para la determinación de cronoamperogramas y voltamperometría cíclica.

4.3 Evaluación del efecto del voltaje sobre la producción de xilitol variando la fuente de carbono, tipo de levadura, tipo y sistema de bioconversión electrostática.

4.3.1 Material biológico

Se empleó la levadura *S. stipitis* ATCC 58376 y *K. marxianus* obtenida del cepario de la planta piloto de biotecnología (parque biotecnológico, UAQ), ambas se cultivaron en placas de agar con extracto de levadura, peptona y xilosa (YPX, Difco, Michigan, E.U.A) compuesto por (g L⁻¹): extracto de levadura (10); peptona (20); agar (20) y xilosa (20) a pH 5.0. Las cepas se mantuvieron en crioconservación (- 70 °C), según la metodología descrita por Reddy y Gherna, 2007 empleando esferas de acrílico de 2 mm de diámetro para su conservación,. Las conservas se activaron en medio YPX con xilosa 15 g L⁻¹ por 24 h a 30 °C y 200 rpm.

4.3.2 Medio de cultivo

El medio YPX o YPD se utilizó para la activación de las cepas de levaduras los cuales contenían (g L⁻¹): extracto de levadura (10); peptona; (20) y xilosa/glucosa (10) respectivamente. Para la elaboración de medio sólido YPX/YPD se añadió 10 g L⁻¹ de agar base al medio.

4.3.3 Pre inóculo

Se preparó un pre inóculo tomando una colonia de levadura crecida en caja Petri con agar YPX o YPD el cual se cultivó en 100 mL de medio YPX/YPD, según corresponda. Se incubó por 15 horas a 30 °C, 100 rpm y pH 6.0. hasta alcanzar una concentración de 1 g de células L⁻¹, cuantificando la absorbancia con un espectrofotómetro (iMark Microplate reader, BIO RAD) a una longitud de onda de 595 nm.

4.3.4 Fermentación electrostática utilizando glucosa o xilosa

Para evaluar el efecto de la aplicación de voltaje sobre la fermentación de glucosa y xilosa utilizando *S. stipitis* se realizó un diseño unifactorial donde el factor evaluado fue la aplicación de voltaje (15 y 30 V). En los experimentos se incluyó un control el cual consistió de las mismas condiciones de fermentación pero sin la aplicación de voltaje. 100 mL de medio YPX/YPD fueron inoculados con el 10 % v v⁻¹ de la levadura la cual estaba a una concentración de 1 g L⁻¹. La fermentación electrostática se llevó a cabo a 30 °C durante 72, pH 6.0. Se tomaron muestras cada 4 horas del medio fermentado y se conservaron a -65 °C para su posterior análisis.

4.4 Evaluación de las células y extracto enzimático de *S. stipitis* y *K. marxianus* sobre la producción de xilitol utilizando el sistema de electrofermentación

4.4.1 Obtención del extracto enzimático de *S. stipitis* y *K. marxianus*

Cuando la biomasa alcanzó la concentración de 1 g L⁻¹, se centrifugó (Eppendorf, 5424 R, España) a 6,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. La pastilla celular se lavó 2 veces con solución amortiguadora de fosfato monopotásico 50 mM pH 6.5, después se agregó 25 mL de la solución amortiguadora de fosfato 50 mM y se aplicó ultrasonido (Sonics Materials VCX-750-220) bajo las siguientes condiciones: 5 minutos de pulso y 1 minutos sin pulso durante 4 ciclos a una amplitud del 50 %. Para el tratamiento con células enteras se omitió el tratamiento de ultrasonido.

4.4.2 Evaluación de la producción de xilitol utilizando el sistema de electrofermentación con *S. stipitis* y *K. marxianus*

Para evaluar el efecto del sistema de electrofermentación sobre la producción de xilitol se llevó a cabo un diseño unifactorial donde el factor evaluado fue la condición de la levadura (células o extracto enzimático). El diseño unifactorial fue evaluado en las dos levaduras *S. stipitis* y *K. marxianus* para posteriormente seleccionar la levadura y condición en la cual se produjera más xilitol.

La evaluación de la condición de la levadura utilizando un sistema de electrofermentación se realizó conforme a lo reportado por Park *et al.*, (2005). En la cámara catiónica del reactor tipo H se colocó medio de cultivo el cual consistió de una solución amortiguadora de fosfato di potásico 50 mM pH 6.5, 100 μ M de rojo neutro y 100 mM de xilosa, éste se inóculo con 10 mL de *S. stipitis* o de *K. marxianus* (células o extracto enzimático según fuera el caso). En la cámara aniónica del reactor se colocó solución amortiguadora de fosfato di potásico 200 mM pH 7 conteniendo 200 mM de NaCl utilizado como anolito. Los electrodos de trabajo y contraelectrodo fueron de fieltro de grafito con 20 % p p⁻¹ de platino con un área de 52 cm². Se aplicó un voltaje de -700 mV durante 72 h, además se incluyeron frascos con las mismas condiciones de fermentación pero sin la aplicación de voltaje los cuales fueron considerados como controles. Los tratamientos se realizaron por triplicado, se utilizó un potencióstato multicanal (VMP, BioLogic, Francia), para llevar a cabo la realización de cronoamperogramas tanto de las células y del extracto enzimático de *S. stipitis* y de *K. marxianus* utilizando el programa EC-lab[®] (versión 10.40).

4.5 Evaluación del potencial de la levadura (célula o extracto enzimático) con mayor producción de xilitol en un sistema de fermentación electrostática.

Se evaluó el efecto de la aplicación de voltaje sobre la fermentación electrostática de xilosa, para ello se seleccionó la levadura y condición en la cual se obtuvo la mayor producción de xilitol. Se realizó un diseño unifactorial donde el factor evaluado fue la aplicación de voltaje (5, 10, 20 y 30 V), además se incluyó un control el cual consistió de las mismas condiciones de fermentación pero sin la

aplicación de voltaje (SV). Se utilizó 100 mL de medio de cultivo el cual consistió de una solución amortiguadora de fosfato di potásico 50 mM pH 6.5, 100 μ M de rojo neutro y 100 mM de xilosa el cual se inoculó con el 10 % v v⁻¹ de la levadura (condición en la cual se obtuvo la mayor producción de xilitol). La fermentación electrostática se llevó a cabo durante 72 h.

4.6 Evaluación del efecto del rojo neutro en la fermentación electrostática

La evaluación del efecto del rojo neutro se llevó a cabo utilizando la misma metodología de la sección 4.5. Se utilizó la misma composición del medio de cultivo pero sin la adición del mediador rojo neutro, se utilizaron los dos voltajes los cuales permitieron mayor producción de xilitol. Se tomaron muestras cada 24 h para posteriormente evaluar el consumo de azúcares totales y reductores, además de la producción de etanol.

4.7 Caracterización de los parámetros de electrofermentación con *Scheffersomyces stipitis* y *Kluyveromyces marxianus*

Se determinó la biomasa mediante absorbancia con un espectrofotómetro (iMark Microplate reader, BIO RAD) a una longitud de onda de 595 nm, así como por peso seco. Para ello se centrifugó (22331 Eppendorf AG, Hamburgo) a 10,000 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante y el precipitado se secó en un horno (69330, Froilabo, Francia) a 70 °C hasta peso constante. El sobrenadante se utilizó para determinar azúcares totales y reductores por medio de método fenol-ácido sulfúrico (Wood *et al.*, 2012), y método de ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), respectivamente. La concentración de azúcares se calculó usando curvas estándar de glucosa y xilosa, se expresó en gramos de azúcar por L⁻¹. La producción de etanol se determinó por el método de oxidación con una solución ácida de dicromato (Kiransree *et al.*, 2000). Así mismo, las muestras se filtraron a través de una membrana de nylon (Millipore, Burlington, MA, EUA) estéril de 0.22 μ m para analizar xilosa, xilitol y ácido acético por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC Acquity waters, EUA) acoplado a un detector de índice de refracción (IR), empleando la columna Aminex HPX-87H (BioRad). Se establecieron las condiciones experimentales con base en reportes para el uso de esta columna con

modificaciones (Landaeta *et al.*, 2013; Gong *et al.*, 2015; Sá *et al.*, 2015). Se utilizó H_2SO_4 0.05 M con un flujo de 0.4 mL min^{-1} , la velocidad de flujo de las muestras fue de $10 \mu\text{L min}^{-1}$, la temperatura de la columna de $55 \text{ }^\circ\text{C}$ y la del detector IR de $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Para la cuantificación de xilosa, xilitol y ácido acético se elaboraron curvas de calibración a una longitud de onda de 280 nm. Además se calculó el rendimiento g xilitol $(\text{g xilosa})^{-1}$ (Anexo 1).

4.8 Determinación de la actividad enzimática de xilosa reductasa y regeneración de NADH de la levadura con mayor producción de xilitol al utilizar un sistema de electrofermentación y electrostática

La actividad enzimática de xilosa reductasa se evaluó de acuerdo a la metodología propuesta por Slininger *et al.*, 2011 con algunas modificaciones. La obtención del extracto enzimático se hizo de acuerdo a lo mencionado en la sección 4.4.1. La concentración de proteínas en la mezcla de reacción se midió a una absorbancia de 280 nm utilizando albumina de suero bovino como estándar relacionando la absorbancia con la concentración (Hammond y Kruger, 2009). La concentración de NADH en la mezcla de reacción se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Kupper *et al.*, 2016, las determinaciones se realizaron por triplicado y por cada condición de fermentación (electrostática o electrofermentación).

4.9 Diseño experimental

Se utilizó como unidad experimental el sistema de fermentación electrostático o reactor tipo H para electrofermentación. Se utilizó un diseño unifactorial 2^n los cuales se mencionaron de acuerdo a cada objetivo. El control a comparar para los consumos tanto de carbono así como la producción de xilitol y etanol en los experimentos fue mediante una fermentación tradicional con las mismas concentraciones de sustrato, temperatura y aireación pero sin la aplicación de voltaje.

5.0 Evaluación de la voltamperometría cíclica

Para la evaluación de la voltamperometría cíclica se utilizó medio de cultivo con solución amortiguadora de fosfato monopotásico 50 mM pH 6.5 y 100 μ M de rojo neutro. El electrodo fue conectado a un potenciostato multicanal (VMP, BioLogic, Francia), para llevar a cabo la realización de la voltamperometría cíclica utilizando el programa EC-lab (versión 10.40).

5.1 Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y fueron reportadas como la media de los ensayos de acuerdo a la prueba de Tukey. La comparación de medias ($p < 0.05$ como el nivel mínimo significativo) se realizó mediante el software R (2017, versión 3.4.3).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para poder evaluar el efecto del voltaje en la fermentación de xilosa, en la producción de xilitol se diseñaron dos reactores, uno para poder llevar a cabo la fermentación electrostática y el otro para la electrofermentación. En el primer reactor se utilizó una fuente de poder la cual permitió que el circuito eléctrico convirtiera electricidad de un voltaje de corriente alterna a un voltaje de corriente directa (Figura 10 A). En el segundo reactor (Figura 10 B) se utilizaron dos electrodos uno de trabajo y otro de referencia, además de un contraelectrodo. El primero se utilizó para controlar el potencial y medir la corriente del sistema, por otra parte el electrodo de referencia se utilizó para medir el potencial del electrodo de trabajo y el contraelectrodo se utilizó para cerrar el circuito de corriente en la celda electroquímica. Los electrodos fueron conectados a un potenciostato/galvanostato el cual permitió controlar la diferencia de voltaje entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia. Además de los electrodos se utilizó una membrana de intercambio catiónico (Nafion) la cual permitió el paso de los protones originados a través de la electrolisis del agua del ánodo hacia el cátodo.



Figura 10. Reactor para A) fermentación electrostática y B) reactor para electrofermentación.

Se evaluó la capacidad de fermentar glucosa y xilosa de *S. stipitis* mediante un sistema de fermentación electrostática para conocer su comportamiento bajo estas condiciones. En la Figura 7 y 8 A se puede observar la producción de biomasa de *Scheffersomyces stipitis* durante las 72 h al utilizar glucosa y xilosa como fuente de carbono respectivamente. Al utilizar glucosa como fuente de carbono no se observan diferencias significativas ($p \geq 0.05$) en la productividad de biomasa. Con la aplicación de voltaje de 15 y 30 V se obtuvo una productividad de $0.010 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y cuando no se aplicó voltaje (SV) la productividad fue de $0.008 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de biomasa a las 72 h. Por otra parte cuando se utilizó xilosa como fuente de carbono la productividad de biomasa al utilizar 15 V así como donde no se aplicó voltaje (SV) fue de $0.002 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Por otra parte cuando se utilizó 30 V la productividad fue de $0.004 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a las 72 h. De esta manera la mayor producción de biomasa de *S. stipitis* se obtuvo cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono. Esto concuerda con Agbogbo *et al.* (2006) quienes mencionan que al utilizar glucosa como fuente de carbono se obtiene una mayor productividad de biomasa a comparación de utilizar xilosa. Así mismo, esto se ve reflejado en el consumo de glucosa y xilosa Figura 7 y 8 (C: azúcares totales y D: reductores) respectivamente. Con glucosa como fuente de carbono *S. stipitis* mostró 0.83 veces mayor consumo cuando no se aplicó un voltaje al medio de fermentación, por otra parte al utilizar xilosa el consumo fue 0.54 veces más. De esta manera, el mayor consumo se dio al utilizar glucosa como fuente de carbono relacionándose así con la productividad de biomasa. Por otra parte en la Figura 7 y 8 B se puede observar la producción de etanol utilizando como fuente de carbono glucosa y xilosa respectivamente, siendo mayor al utilizar como fuente de carbono glucosa. Cuando se utilizó glucosa la productividad de etanol fue de $0.080 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a 15 V y $0.069 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a 30 V y SV. Al utilizar xilosa la productividad fue de $0.047 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a 15 V, seguido de $0.043 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a 30 V siendo la menor al no aplicarse voltaje (SV) ($0.030 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). El bajo consumo de xilosa como fuente de carbono y por ende la baja producción de biomasa y etanol al utilizar este sustrato se debe a su baja afinidad de asimilar xilosa mediante el sistema de transportadores de hexosas (Hxt1p, Hxt2p y Hxt7) los cuales participan en un sistema de difusión facilitada (Sharma *et al.*, 2018). Esto concuerda con lo reportado

por Biswas *et al.* (2013) quienes mencionan que la glucosa es utilizada principalmente como fuente de carbono por *S. stipitis*. Por otra parte se puede observar que al aplicar voltaje se tiene mayor producción de bioetanol independientemente de la fuente de carbono. Esto debido que para la producción de metabolitos tales como el xilitol y el etanol debe de existir un equilibrio redox de los cofactores NAD^+/NADH Xafenias *et al.* (2016) reportan que el balance redox se logra por fermentación electroquímica, donde se usan electrodos para disponer o recibir electrones.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

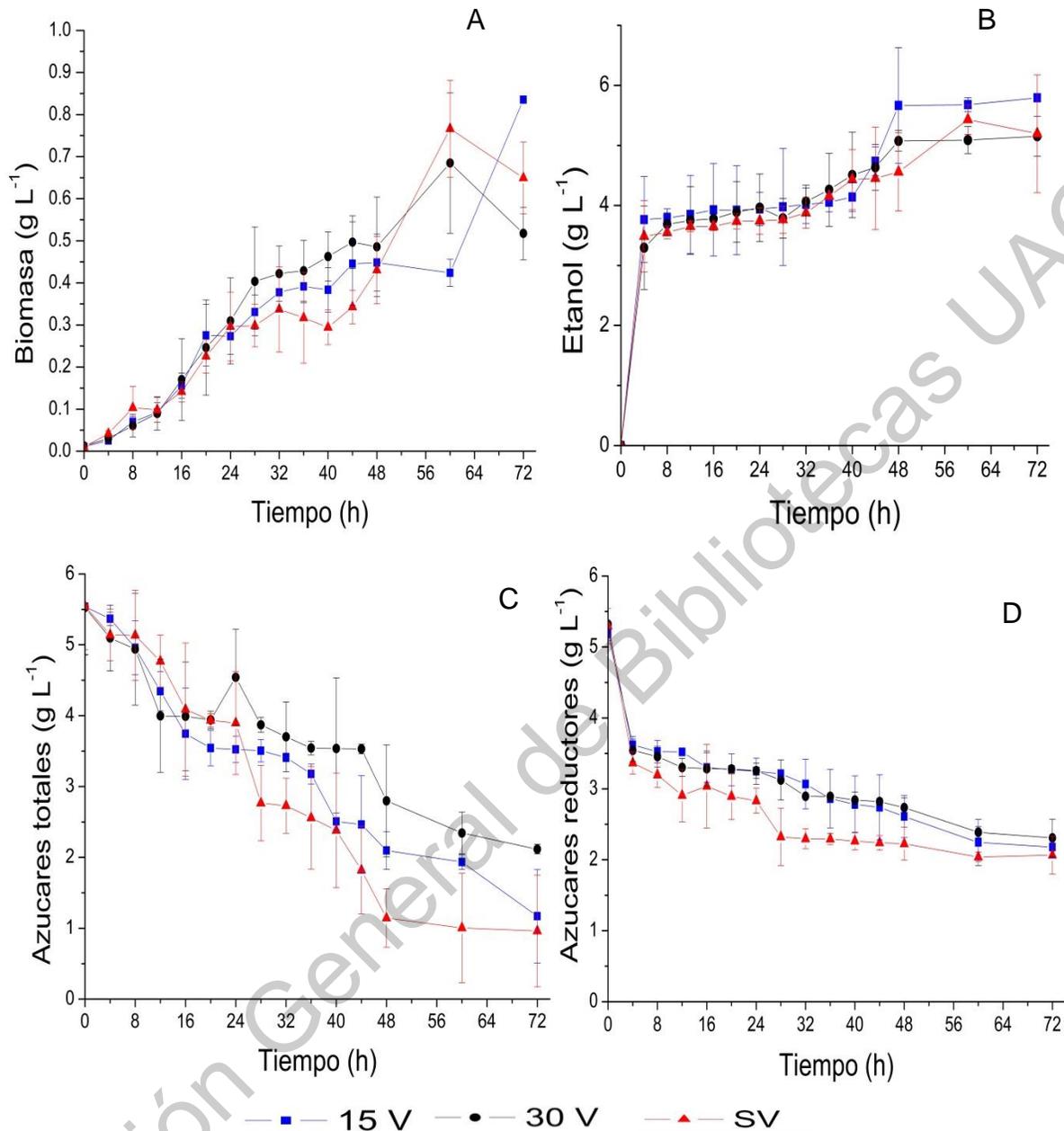


Figura 11. Perfil de producción de a) biomasa, b) producción de etanol y consumo de c) azúcares totales y d) azúcares reductores utilizando *Scheffersomyces stipitis* en medio YPD en fermentación electrostática aplicando 15 y 30 V. Se utilizó el mismo sistema sin la aplicación de voltaje (SV) como experimento control.

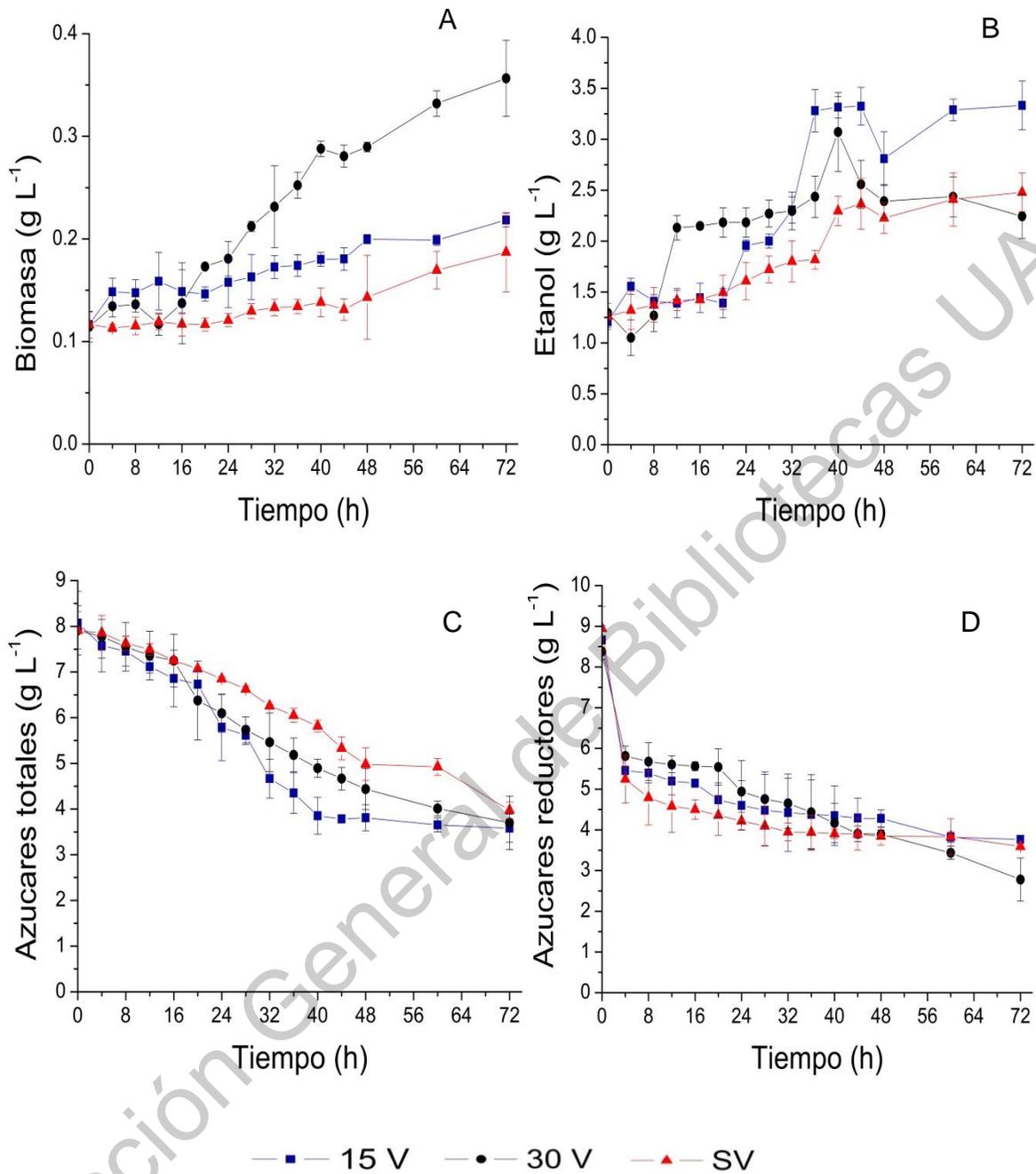


Figura 12. Perfil de producción de a) biomasa, b) producción de etanol y consumo de c) azúcares totales y d) azúcares reductores utilizando *Scheffersomyces stipitis* en medio YPX en fermentación electrostática aplicando 15 y 30 V. Se utilizó el mismo sistema sin la aplicación de voltaje (SV) como experimento control.

Una vez que se comprobó que la fermentación electrostática no afectaba en la producción de etanol utilizando *S. stipitis*, se seleccionó xilosa como fuente de carbono con la finalidad de evaluar si al utilizar un sistema de electrofermentación se lograba aumentar la producción de metabolitos de interés. Además se decidió comparar células o extracto enzimático de *S. stipitis* con *K. marxianus* (en las mismas condiciones). En el anexo 2 y 3 se muestra el cromatograma con los diferentes compuestos obtenidos de la fermentación electrostática y electrofermentación de xilosa, así como los tiempos de retención de cada uno de ellos a 280 nm. En la Figura 9 y 10 A) se puede observar el consumo de xilosa al utilizar *S. stipitis* y *K. marxianus* respectivamente. El consumo de xilosa al utilizar *S. stipitis* siguió una tendencia similar tanto de células como del extracto enzimático con o sin la aplicación de voltaje. Sin embargo, se obtuvo 0.7 veces mayor consumo de xilosa a las 72 h por parte de *S. stipitis* al emplear extracto enzimático con y sin voltaje. Por otra parte, *K. marxianus* siguió la misma tendencia pero con un consumo menor al realizado por *S. stipitis*. Al utilizar extracto enzimático y células sin la aplicación de voltaje a las 72 horas se tuvo 0.6 y 0.7 veces mayor consumo de xilosa respectivamente a comparación de donde se aplicó voltaje, siendo 0.8 veces mayor el consumo al utilizar extracto enzimático a comparación de utilizar células.

En cuanto a la producción de xilitol por parte de *S. stipitis* se puede observar en la Figura 9 B que la mayor productividad $0.002 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de xilitol fue al utilizar extracto enzimático sin la aplicación de voltaje, siendo 0.1 veces más a comparación de utilizar células. Al utilizar *K. marxianus* (Figura 10 B) se puede observar una productividad de $0.005 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a las 72 h al utilizar células con la aplicación de voltaje siendo 0.2 veces más a comparación de utilizar células sin la aplicación de voltaje ($0.001 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Se ha reportado que la utilización de electrodos en el medio de fermentación puede suministrar electrones para modificar el metabolismo de los microorganismos, dicho proceso es conocido como electrofermentación. Se decidió utilizar un voltaje de -0.7 V para llevar a cabo la electrofermentación de xilosa y lograr un balance de los cofactores NADH y NADPH los cuales son fundamentales

para la reducción enzimática de xilosa a xilitol por la xilosa reductasa. Sin embargo, fue necesario utilizar un mediador de electrones tal como el rojo neutro (el cual puede ser oxidado y reducido electroquímicamente en la superficie de un electrodo y este a su vez permitir la oxidoreducción de NAD a NADH en el citoplasma de las células de levaduras). Hasta este momento solo Sun *et al.* (2005) han reportado el uso de electrofermentación catódica es decir en el cual el microorganismo acepta electrones a partir del electrodo para la generación de un producto de interés. Ellos mencionan que la reducción electroquímica del rojo neutro activa la reducción de NAD⁺ a NADH y con esto se logra un balance de NAD⁺/NADH para ser mantenido en el citoplasma de *Candida peltata*, aumentando la producción de xilitol 0.3 veces más en el biorreactor electroquímico a comparación del reactor convencional. Estos autores reportan que la reducción electroquímica del rojo neutro puede ser reoxidado con la reducción de NAD⁺ a NADH en el citoplasma de levaduras donde la xilosa reductasa cataliza la reducción de xilosa a xilitol combinado con la oxidación de NADH a NAD⁺. Áunado a esto, mencionan que el rendimiento de xilitol nunca puede exceder la concentración de NADH porque el rango de reducción de xilosa a xilitol es proporcional al rango de oxidación de NADH en el reactor bioquímico. Sin embargo, el rendimiento de xilitol es proporcional al número de reciclaje de NAD⁺/NADH en un biorreactor electroquímico. Sun *et al.* (2005) evaluaron el uso de extracto enzimático de *Candida peltata* sobre la producción de xilitol, reportando una productividad de 0.004 g L⁻¹ h⁻¹ a las 150 h mediante la aplicación de 2 V. De esta manera la productividad de xilitol obtenido al utilizar extracto enzimático de *K. marxianus* mediante la aplicación de -0.7 V y con el uso del mediador de electrones (rojo neutro) es mayor a lo reportado por estos autores a la mitad del tiempo de fermentación utilizado por estos autores.

Esto a su vez se puede ver en el Cuadro 4 donde se muestra el análisis de varianza sobre el rendimiento de xilitol obtenido a las 24 h. Se puede observar que el tratamiento es decir con o sin la aplicación de voltaje (electrofermentación) y la levadura (*S. stipitis* o *K. marxianus*) tienen efecto significativo ($p \geq 0.05$) sobre el rendimiento de este metabolito.

Cuadro 4. Análisis de varianza para los factores evaluados de electrofermentación EF -0.7 V, células (C) y extracto enzimático (EE) de *S. stipitis* y *K. marxianus* sobre el rendimiento de conversión en masa (g) de xilosa a xilitol a las 24 h

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	6.267	2.089	7.849	0.00192
Levadura	1	13.781	13.781	51.781	2.13E-06***
Tratamiento:levadura	3	6.116	2.039	7.660	0.00214
Residuales	16	4.258	0.266		
Códigos de significancia	0.05	***			

En el Cuadro 5 se muestran los rendimientos (calculados como se indica en el anexo 1) de acuerdo al tratamiento y a la levadura, se observa que los mayores rendimientos se obtuvieron al utilizar *K. marxianus*, siendo mayor (0.43 ± 0.04 g xilitol (g xilosa)⁻¹) al utilizar extracto enzimático pero sin la aplicación de voltaje (SV EE) a comparación de las células. Siendo significativamente diferente ($p \geq 0.05$) al utilizar células sin la aplicación de voltaje (fermentación tradicional). Por lo que al utilizar extracto enzimático de *K. marxianus* con o sin la aplicación de voltaje son similares a lo reportado por (Mueller *et al.* (2011) quienes reportan un rendimiento de 0.41 g xilitol (g xilosa)⁻¹ a 40 °C. Siendo mayor a lo reportado por Furlan *et al.* (1994) quienes mencionan que al utilizar *S. stipitis* no encontraron producción de xilitol y que al utilizar *Pachysolen tannophilus* obtuvieron una producción de 0.27 g de xilitol (g xilosa)⁻¹, pero similar al utilizar *Candida parapsilosis* con una producción de 0.44 g de xilitol (g xilosa)⁻¹. Así como a lo reportado por López-Linares *et al.* (2018b) quienes mencionan que al emplear *Debaryomyces hansenii* y *Candida guilliermondii* individualmente presentaron un rendimiento de xilitol de 0.42 ± 0.01 g de xilitol (g xilosa)⁻¹ al utilizar el hidrolizado y destoxificado de paja de canola. De la misma manera Morais *et al.* (2019) mencionan un rendimiento de 0.45 g de xilitol (g xilosa)⁻¹ al utilizar *C. tropicalis* mediante el uso de bagazo de caña.

Cuadro 5. Rendimiento del xilitol a las 24 h de acuerdo a la levadura y de los tratamientos (electrofermentación EF -0.7 V, células (C) y extracto enzimático (EE), sin aplicación de voltaje (SV).

Levadura	Tratamiento	Y g xilitol (g xilosa) ⁻¹		
<i>K. marxianus</i>	SV EE	0.43 ±	0.04	A
	EF EE	0.37 ±	0.01	AB
	EF C	0.28 ±	0.01	AB
	SV C	0.18 ±	0.03	B
<i>S. stipitis</i>	SV EE	0.03 ±	0.00	C
	EF EE	0.03 ±	0.00	C
	EF C	0.07 ±	0.00	C
	SV C	0.01 ±	0.00	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0.05$)

En la producción de etanol el uso de extracto enzimático mediante la aplicación de -0.7 V al medio de cultivo al utilizar *K. marxianus* permitió una productividad de 0.007 g L⁻¹ h⁻¹ siendo mayor al obtenido al utilizar células y sin la aplicación de voltaje (fermentación tradicional 0.006 g L⁻¹ h⁻¹). Durante la fermentación tradicional xilosa es usado como fuente de carbono y de electrones, sin embargo, con el sistema electroquímico el cátodo puede ser usado como donador de electrones adicionales para influenciar en el metabolismo del microorganismo. Los microorganismos toman los electrones a partir del electrodo de trabajo por transferencia directa o a través de mediadores que actúan como donadores de electrones entre el electrodo y los microorganismos. Los resultados son mayores a lo reportado por Engel *et al.* (2019) quienes reportan una productividad de 0.002 g L⁻¹ h⁻¹ en una fermentación tradicional y 0.7 veces menor a cuando se aplicó voltaje de -0.6 V (productividad de 0.010 g L⁻¹ h⁻¹ al utilizar *Clostridium acetobutylicum* (DSM 792). Así como 0.01 veces menor a lo reportado por Harrington *et al.*, 2015 quienes mencionan una productividad de 0.054 g L⁻¹ h⁻¹ al utilizar *E. coli* mediante la aplicación de -0.65 V, cabe mencionar que ellos utilizaron una cepa modificada genéticamente. Mathew *et al.* (2015) utilizaron 180 g L⁻¹ de glucosa con 12 g L⁻¹ de *S. cerevisiae* mediante el uso de 15 V reportando una productividad de 1.26 g L⁻¹ h⁻¹ de etanol a comparación del control donde solo se produjo 0.36 g L⁻¹h⁻¹.

La conversión de etanol toma lugar por los electrones suministrados a partir del medio, los cuales se originan en el cátodo de una celda de electrofermentación donde el rango de NAD^+/NADH , las actividades biológicas y los productos son balanceados (Civelek *et al.*, 2019). El paso de electrones a partir del electrodo es favorecido por el uso del rojo neutro, Park y Zeikus. (1999) mencionan que el rojo neutro reducido catódicamente impulsó la reducción de fumarato en *Actinobacillus succinogenes*. Resultados similares fueron reportados por Shin *et al.* (2002) quienes mencionan que el rojo neutro genera una fuerza motriz de protones en combinación con una fumarato reductasa de translocación de protones para reducir el cofactor NAD^+ mejorando la producción de etanol en *Clostridium thermocellum* y *Saccharomyces cerevisiae*. Es evidente que la aplicación de voltaje aumenta la producción de etanol. La aplicación de voltaje puede permitir la transferencia de electrones durante la oxidación de la fuente de carbono debido a cambios en las cargas iónicas de las células de levaduras. Lo anterior resulta en la generación de una barrera baja para la transferencia de electrones resultando más piruvato y aumentando el crecimiento celular y la producción de etanol. Al suministrar un voltaje el NAD^+ es convertido directamente a NADH incrementando su concentración de este cofactor, causando un desbalance en el metabolismo de las levaduras favoreciendo la producción de etanol por forzar a las levaduras a convertir el piruvato a acetaldehído y este a etanol mediante el uso de NADH . Aunado a esto, existen reportes donde se menciona que el incrementar la cantidad de NADH se inhibe la actividad de piruvato deshidrogenasa y se previene la conversión de piruvato a acetyl coenzima A (Harris *et al.*, 2002). De la misma manera, Song *et al.* (2014) menciona que se puede controlar el metabolismo de glucosa en *S. cerevisiae* al aplicar un voltaje. Joshi *et al.* (2019) reportan que al utilizar *S. cerevisiae* y *Wickerhamomyces anomalus* obtuvieron 0.9 y 0.8 veces mas en la producción de etanol al aplicar 4 V respectivamente a comparación de lo obtenido en una fermentación tradicional (Li *et al.*, 2012).

Por otra parte, ácido acético es un producto no deseado del metabolismo de las levaduras, es un inhibidor de las levaduras en general, aunque algunas levaduras y bacterias pueden utilizarlo para crecimiento y mantenimiento. El efecto

tóxico de este producto se debe principalmente a la concentración no disociada de ácido acético al pH óptimo para la fermentación de la levadura (pH 4-5). Penetra en la célula microbiana por difusión pasiva y se disocia directamente en el citosol, causando disminución del pH intracelular provocando un desequilibrio del gradiente de protones además de alterar el transporte de varios nutrientes (Casey *et al.*, 2010; Huahua *et al.*, 2019). En la Figura 9C y 10C se puede observar la producción de ácido acético por parte de *S. stipitis* y *K. marxianus* respectivamente. La mayor productividad de ácido acético se obtuvo al utilizar células de *K. marxianus* pero sin la aplicación de voltaje $0.027 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ seguido de utilizar células pero con la aplicación de voltaje $0.018 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ siendo la menor producción de ácido acético al utilizar extracto enzimático e independientemente de la aplicación de voltaje. Esto se puede deber principalmente a la demanda de energía por parte de las células para acumular biomasa por lo que se incrementa la cantidad de ácido acético relacionado a la demanda de NADPH cofactor necesario para que la enzima xilosa reductasa inicie la reducción de xilosa (Nitiyon *et al.*, 2016). A su vez, el aumento de ácido acético promueve una caída del pH intracelular por lo que las células para neutralizar su interior bombean los protones fuera de la célula, esto requiere ATP que en condiciones anaeróbicas se logra mediante el aumento de la formación de etanol (Larsson *et al.*, 1999). Aunado a esto existen reportes donde mencionan que en la electrofermentación ocurre un proceso de oxidación del etanol el cual produce ácido acético y acetaldehído, que depende del tipo de electrodo, del área, de la concentración de etanol, del tiempo de electrolisis (Riyanto, 2005). Así mismo, Riyanto (2005) menciona que el ácido acético puede ser formado cuando el tiempo de electrolisis es superior a 30 minutos. En el presente trabajo la electrofermentación de xilosa se realizó durante 72 h, por lo que no se descarta que el etanol producido pudiera oxidarse a ácido acético y acetaldehído. Además, Jiang *et al.* (2019) reportan que la producción de ácido acético se da por utilizar un potencial negativo en el cátodo. La producción de ácido acético en este trabajo mediante la aplicación de -0.7 V concuerda con lo reportado anteriormente. La cantidad producida de ácido acético para ambas levaduras es 0.5 veces mayor a lo reportado por Kundiyana *et al.* (2009) quienes utilizaron *K. marxianus* y obtuvieron

una productividad de ácido acético de $0.016 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en una fermentación tradicional y a lo reportado por Engel *et al.* (2019) quienes reportan una productividad de $0.002 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ con electrofermentación. No obstante, la cantidad de ácido acético es 0.5 veces menor a lo reportado por Nitiyon *et al.* (2016) quienes reportan una productividad de $0.051 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ al utilizar *K. marxianus* y *S. stipitis* en una fermentación tradicional.

La temperatura es un factor clave en la generación de especies reactivas de oxígeno ROS, principalmente a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatura a la cual se llevaron a cabo los experimentos para *K. Marxianus*. Kim *et al.* (2017) mencionan que las células acumulan ROS a una temperatura alta y a través de la vía de producción de ácido acético suministran NADPH para la desintoxicación de ROS. Aunado a esto el NADH suministrado para la actividad de la xilosa reductasa por la vía de las pentosas fosfato es limitada por lo que la compensación de ese cofactor es a través de la reacción mediada por la acetaldehído deshidrogenasa, así mismo el NADPH es suministrado para remover especies reactivas de oxígeno por la vía de antioxidantes incluyendo glutionato. Además existe evidencia que existe una regulación de los genes para el mecanismo de defensa del estrés oxidativo los cuales están regulados en medio utilizando xilosa por lo que *K. marxianus* acumula ROS. La producción de ácido acético en el reactor tipo H puede ser utilizado como precursor para la formación de metano así como sustrato para celdas de combustible microbianas (MFC) y celdas de electrolisis microbianas (MEC) para producir bioenergía (bioelectricidad, biohidrógeno y biometano).

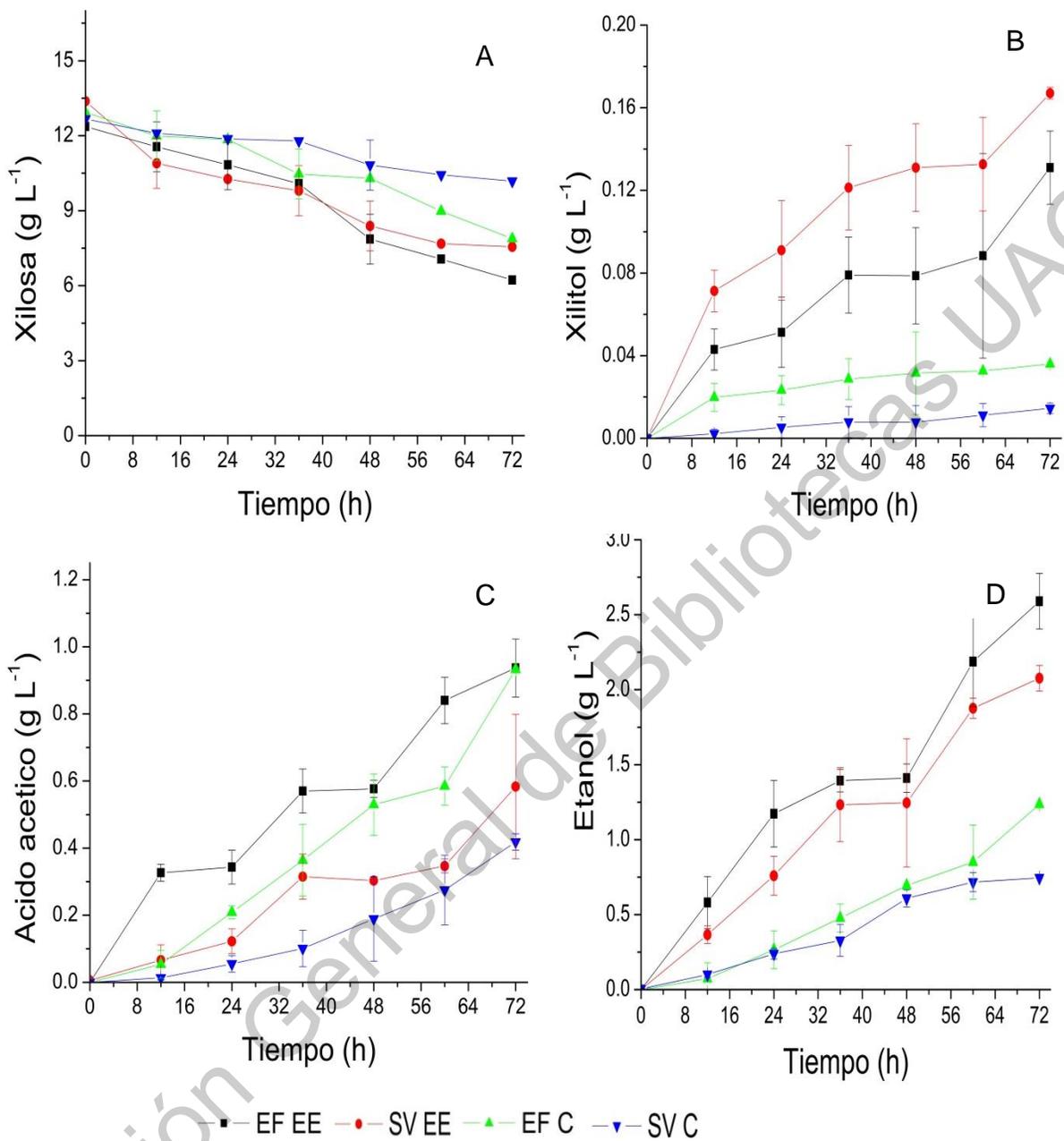


Figura 13. Efecto del voltaje (electrofermentación EF -0.7 V) en la fermentación de células (C) y extracto enzimático (EE) de *S. stipitis*. C: sin aplicación de voltaje, a) consumo de xilosa, producción de b) xilitol, c) ácido acético, d) etanol.

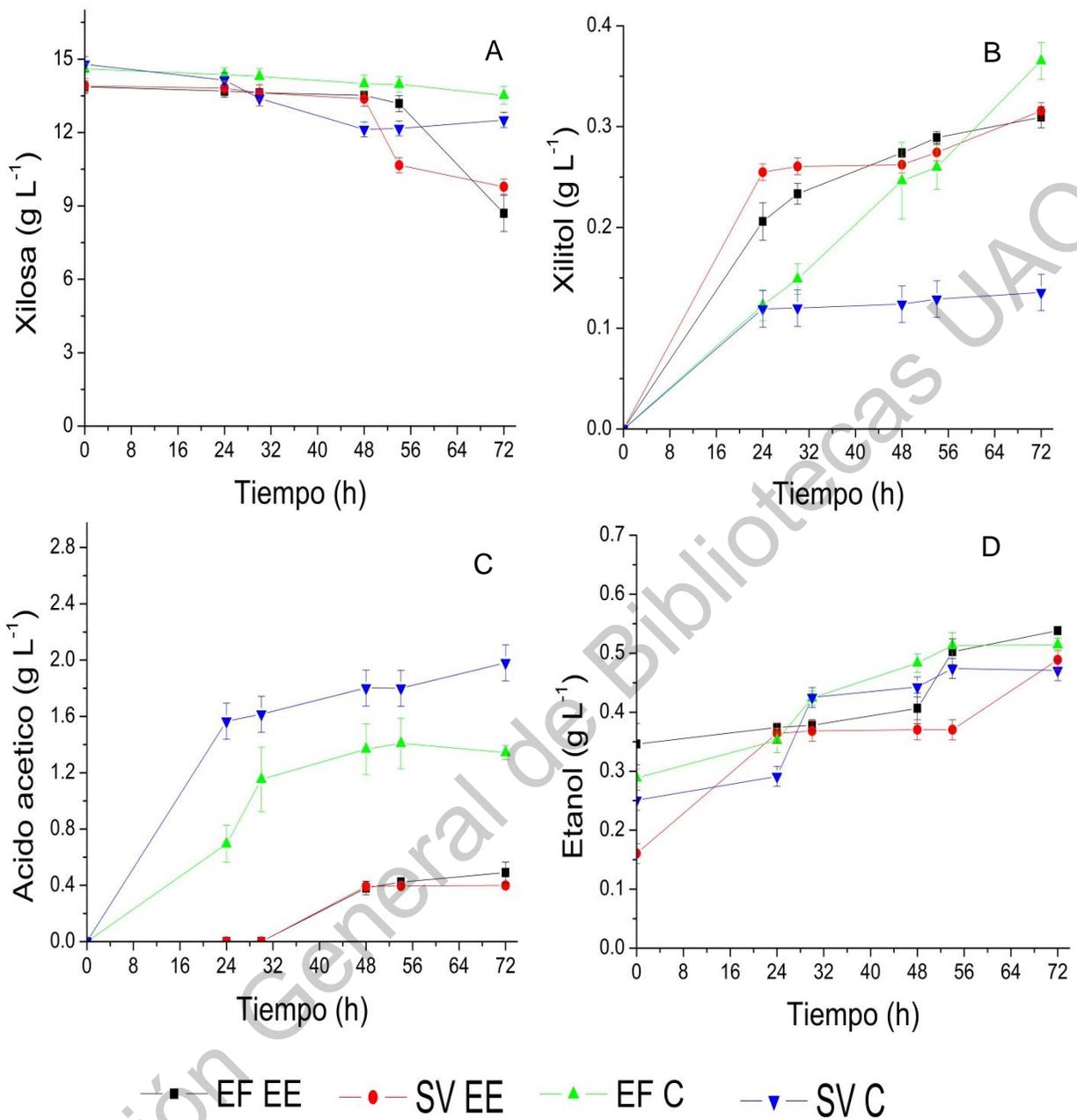


Figura 14. Efecto del voltaje (electrofermentación EF -0.7 V) en la fermentación de células (C) y extracto enzimático (EE) de *K. marxianus* SV: sin aplicación de voltaje, a) consumo de xilosa, producción de b) xilitol, c) ácido acético, d) etanol.

En la Figura 11 y 12 se muestran los cronoamperogramas (tres réplicas) de las células y extracto enzimático de *K. marxianus* bajo el efecto de la electrofermentación, donde se puede ver el flujo de la corriente conforme el tiempo, se observa la misma tendencia en las réplicas.

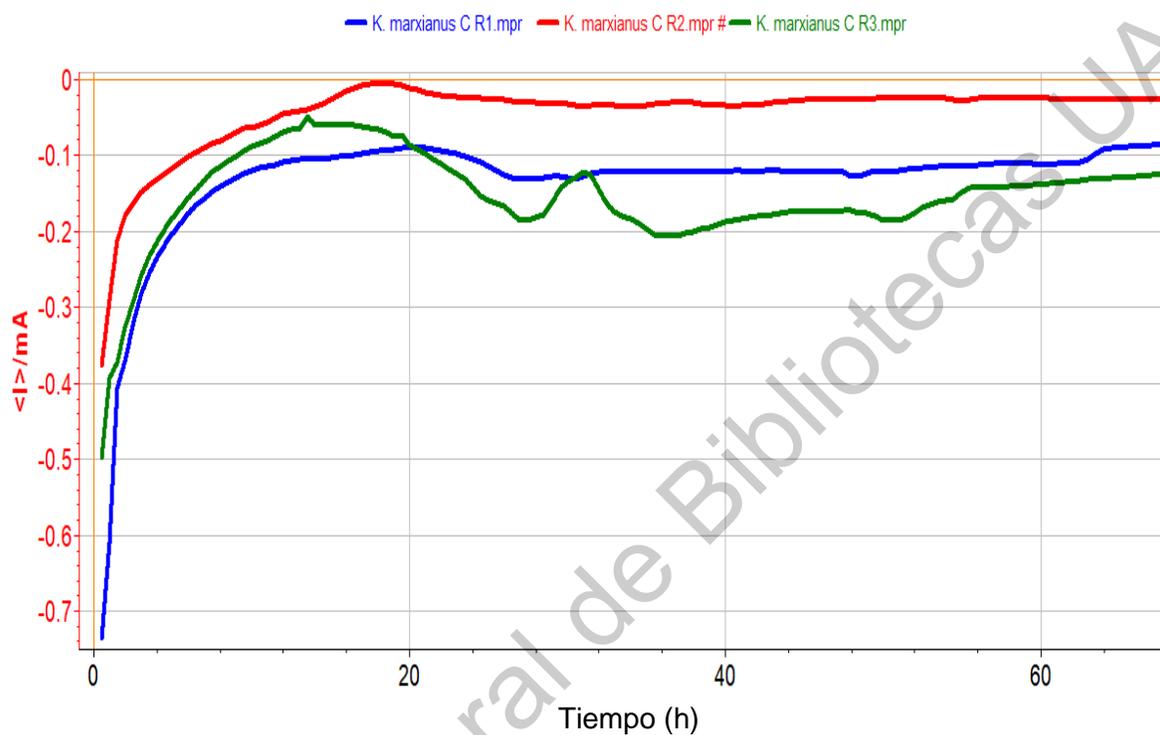


Figura 11. Cronoamperograma (tres réplicas) de las células de *K. marxianus* bajo el efecto de la electrofermentación, C R1: células réplica 1, C R2: células réplica 2, C R3: células réplica 3.

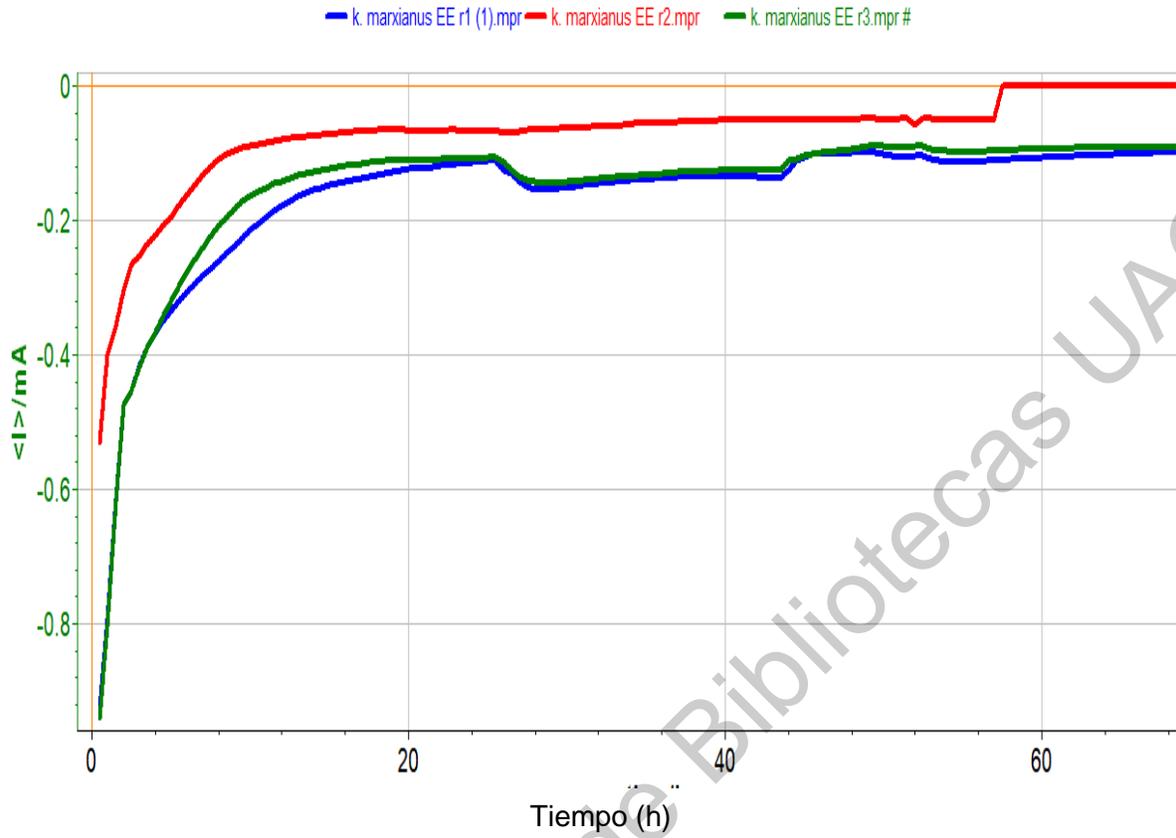
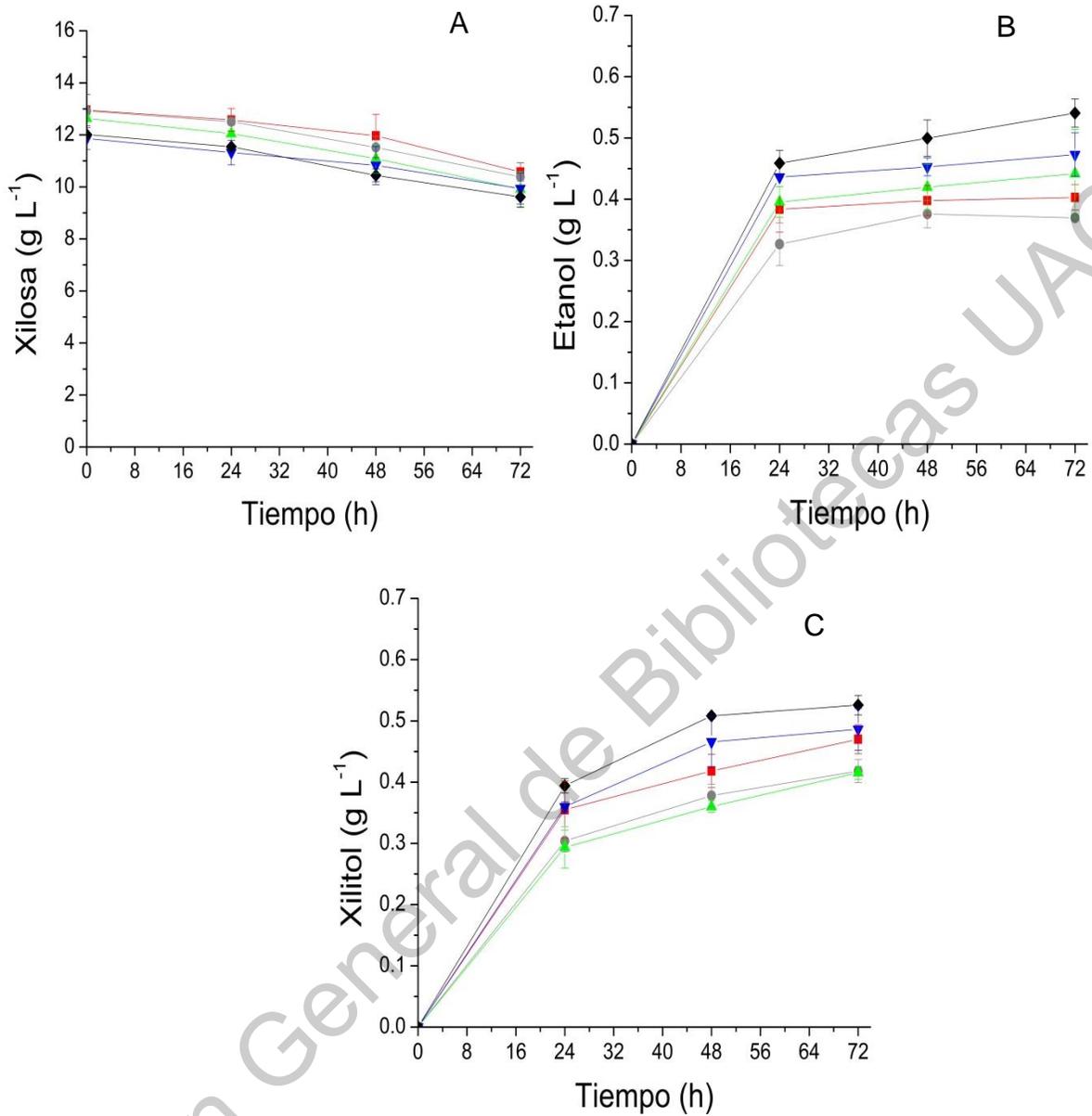


Figura 12. Cronoamperograma (tres réplicas) del extracto enzimático de *K. marxianus* bajo el efecto de la electrofermentación, EE R1: extracto enzimático réplica 1, EE R2: extracto enzimático réplica 2, EE R3: extracto enzimático réplica

Una vez que había sido evaluado el efecto de la electrofermentación al utilizar *K. marxianus* y *S. stipitis* se decidió evaluar el efecto de los diferentes voltajes (5, 10, 20 y 30 V) en la fermentación electrostática mediante el uso de extracto enzimático de *K. marxianus* por ser la que produjo mayor cantidad de xilitol. En la Figura 13a se puede observar el consumo de xilosa durante las 72 h de fermentación electrostática. Se observa que disminuye conforme el tiempo hasta 12-11 g L⁻¹ independientemente del voltaje aplicado e incluso de donde no se aplicó voltaje, presentándose un consumo bajo de xilosa. En la Figura 13b se puede observar 0.7 veces más la producción de etanol al aplicar 30 V (0.007 g L⁻¹ h⁻¹) a comparación de dónde no se aplicó voltaje (0.005 g L⁻¹ h⁻¹). El uso de 30 V permite una producción de etanol similar al obtenido al utilizar -0.7 V en el sistema de electrofermentación esto podría deberse de al suministro de electrones a partir del electrodo de trabajo mediante el uso de rojo neutro para la conversión de NAD⁺ a NADH favoreciendo la producción de etanol por forzar a las levaduras a convertir piruvato a acetaldehído y este a etanol mediante el uso de NADH. Sin embargo, nuestros resultados son 0.007 veces menores a lo reportado por Mathew *et al.*, (2015) quienes reportan valores de 0.9 g L⁻¹ h⁻¹ de etanol al utilizar 180 g L⁻¹ de glucosa con 12 g L⁻¹ de *S. cerevisiae* mediante el uso de 15 V. Esto debido a que ellos utilizan una mayor concentración de sustrato y de inóculo.



—■— SV EE —●— 5 V EE —▲— 10 V EE —▼— 20 V EE —◆— 30 V EE

Figura 13. Perfil de producción de a) consumo de xilosa, b) producción de xilitol y c) etanol utilizando extracto enzimático de *K. marxianus* mediante fermentación electrostática aplicando 5, 10, 20 y 30 V. Se utilizó el mismo sistema sin la aplicación de voltaje (SV) como experimento control.

Por otra parte, en la Figura 13C se observa el aumento de la producción de xilitol con respecto al tiempo, a su vez en el Cuadro 6 donde se muestra el análisis de varianza, lo cual indica que existen diferencias ($p \geq 0.01$) de acuerdo a los diferentes voltajes sobre el rendimiento de xilitol.

Cuadro 6. Análisis de varianza para los factores evaluados (voltajes) en un sistema de electrostática al utilizar *K. marxianus* sobre el rendimiento g xilitol (g xilosa)⁻¹ a las 24 h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Tratamiento	4	0.3000	0.075	5.263	0.0152*
Residuales	10	0.1425	0.014		
Código de significancia.		0.01**			

Al aplicar 30 V a las 24 h se observa 0.5 veces mas rendimiento de xilitol a comparación de donde no se aplico voltaje (Cuadro 7). Esto podría deberse al suministro de electrones provenientes del electrodo los cuales modifican el metabolismo de esta levadura por medio de un balance de los cofactores NAD⁺/NADH (Sun *et al.*, 2005).

Cuadro 7. Rendimiento g xilitol (g xilosa)⁻¹ de acuerdo a los diferentes voltajes aplicados en la fermentación electrostática de xilosa al utilizar *K. marxianus*.

Tratamiento	Y g xilitol (g xilosa) ⁻¹					
	24 h		48 h		72 h	
30 V EE	0.84 ± 0.04	A	0.32 ± 0.02	A	0.31 ± 0.01	A
5 V EE	0.75 ± 0.05	AB	0.28 ± 0.04	A	0.17 ± 0.01	B
20 V EE	0.68 ± 0.08	AB	0.50 ± 0.03	A	0.26 ± 0.01	AB
10 V EE	0.51 ± 0.05	B	0.25 ± 0.02	A	0.16 ± 0.02	B
SV EE	0.48 ± 0.06	B	0.52 ± 0.09	A	0.20 ± 0.02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0.05$). EE: extracto enzimático, SV EE: extracto enzimático sin la aplicación de voltaje.

Se realizó un análisis de varianza al efecto de la electrofermentación y fermentación electrostática sobre el rendimiento de masa de producción de xilitol respecto a xilosa utilizando *K. marxianus* (Cuadro 8) observándose diferencias significativas ($p \geq 0.05$).

Cuadro 8. Análisis de varianza para los factores evaluados (voltajes (electrofermentación y electrostática), en células y extracto enzimático de *K. marxianus* sobre el rendimiento g xilitol (g xilosa)⁻¹ a los diferentes tiempos (24, 48 y 72 h) de fermentación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Tratamiento	8	7.192	0.899	9.469	1.74e ^{-08***}
Tratamiento:Tiempo	8	9.221	1.153	12.141	2.57e ^{-10***}
Residuales	63	5.981	0.096		
Codigos de significancia	0.05 `***`				

Se observa que a las 24 h hubo mayor rendimiento de xilitol (Cuadro 9) al aplicar 5, 10, 20 y 30 V (fermentación electrostática) a comparación de donde no se aplicó voltaje y a cuando se utilizó el reactor tipo H (electrofermentación), esto probablemente se deba a la mayor regeneración de NADH, lo cual es importante para llevar a cabo la oxidación de xilosa a xilitol por la enzima xilosa reductasa (Nikolaos *et al.*, 2017). Además de que la levadura necesita también cierto tiempo para adaptarse a la aplicación de voltaje y quizás por ello una vez que la levadura fue adaptada (48 h) no presentó diferencias significativas cuando se aplicó -0.7 V, 20 V y sin la aplicación de voltaje en la fermentación electrostática. En la actualidad no existen reportes sobre la comparación de dos sistemas de fermentación sobre el rendimiento de xilitol, sin embargo no se logró observar diferencias significativas ($p \geq 0.05$) entre ambos sistemas.

Cuadro 9. Comparación del rendimiento de g xilitol (g xilosa)⁻¹ en la fermentación de xilosa por *K. marxianus* utilizando un sistema de electrofermentación contra el de electrostática.

Tratamiento	Y g xilitol (g xilosa) ⁻¹								
	24 h			48 h			72 h		
EF EE	0.37	± 0.01	B	0.64	± 0.12	A	0.06	± 0.01	D
SV EE	0.43	± 0.04	B	0.50	± 0.05	A	0.07	± 0.00	CD
EF C	0.28	± 0.01	B	0.43	± 0.03	AB	0.31	± 0.01	A
SV C	0.18	± 0.01	C	0.04	± 0.00	B	0.05	± 0.00	D
5 V EE	0.75	± 0.05	A	0.28	± 0.04	AB	0.16	± 0.01	BC
10 V EE	0.50	± 0.05	A	0.25	± 0.02	AB	0.16	± 0.02	BC
20 V EE	0.68	± 0.08	A	0.50	± 0.03	A	0.25	± 0.01	AB
30 V EE	0.84	± 0.04	A	0.32	± 0.02	AB	0.30	± 0.01	A
SV EE*	0.47	± 0.06	B	0.52	± 0.09	A	0.19	± 0.02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0.05$).

EF EE: extracto enzimático bajo electrofermentación; SV EE: extracto enzimático sin la aplicación de voltaje; EF C: células bajo electrofermentación, SV C: células sin la aplicación de voltaje, SV EE*: sin la aplicación de voltaje utilizando el reactor de electrostática.

En la Figura 14 se muestra el efecto del voltaje sobre la actividad de xilosa reductasa (A) así como la cantidad de NADH en células y extracto enzimático (B) tanto en electrofermentación como en el sistema de fermentación electrostática (Figura 14C y D). En todos los reactores se utilizó una concentración inicial de enzimas de 87.6 U. Durante las primeras 24 horas la actividad de XR fue alta sin embargo, disminuyó durante las siguientes ocho horas volviendo a recuperar la actividad después de las 32 horas lo mismo se observa en la regeneración de NADH bajo el sistema de electrofermentación. No obstante, en la fermentación electrostática la actividad de XR fue alta en las primeras 48 horas al utilizar 5, 10, 20 y 30 V, sin embargo, al no aplicarse voltaje la actividad fue 20 veces menor. Después de las 24 horas al utilizar 20 V y donde no se aplicó voltaje la actividad fue 100 veces menor a comparación de donde se utilizó los otros voltajes.

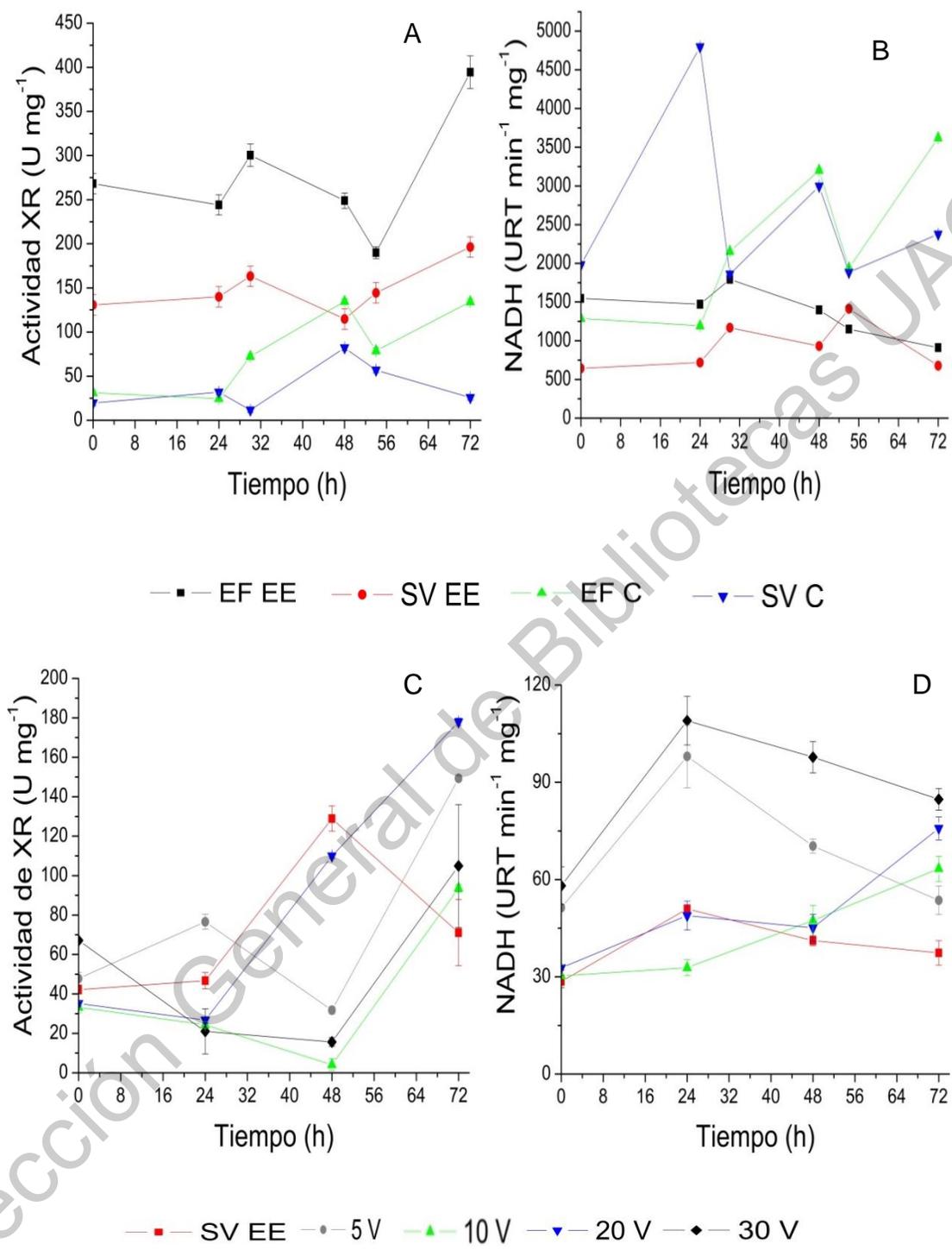


Figura 14. Efecto del voltaje sobre la actividad de xilosa reductasa (XR) y rango de regeneración de NADH en células (A) y extracto enzimático (B) bajo electrofermentación, C) actividad de XR y D) cantidad de NADH bajo electrostática de *K. marxianus*

En el Cuadro 10 y 11 se puede observar el análisis de varianza para los factores evaluados (voltaje, célula y extracto enzimático) en la electrofermentación y fermentación electrostática respectivamente, observándose diferencias significativas ($p \geq 0.05$).

Cuadro 10. Análisis de varianza para los factores evaluados (voltajes y condición de la célula) en *K. marxianus* sobre la actividad enzimática de xilosa reductasa (XR) a las 24 h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	577967	192656	131.876	$2e^{-16}$ ***
Tratamiento:Tiempo	3	7604	2535	1.735	0.169
Residuales	64	93496	1461		
Código de significancia	0.05	****			

Cuadro 11. Análisis de varianza del efecto de la fermentación electrostática o SV en *K. marxianus* sobre la actividad enzimática de xilosa reductasa (XR) a las 24 h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Tratamiento	4	6475	1618.7	48.28	$1.66e^{-06}$ ***
Residuales	10	335	33.5		
Código de significancia	0.05	****			

En el Cuadro 12 se muestran las actividad de la enzima xilosa reductasa tanto de las células y del extracto enzimático de *K. marxianus*. Se puede observar que las células presentan mayor actividad enzimática independientemente de la aplicación o no de voltaje, lo cual podría deberse a lo discutido en la producción de ácido acético. La mayor actividad se obtuvo a las 24 h y 72 h al utilizar células.

Cuadro 12. Actividad enzimática de xilosa reductasa del extracto enzimático o células de *K. marxianus* con (EF=-0.7 V).

Tratamiento	XR U mg ⁻¹					
	24 h		48 h		72 h	
EF EE	244.10	± 11.42 C	248.90	± 8.79 C	394.44	±18.46 C
SV EE	139.94	± 11.60 B	114.77	± 11.60 A	196.38	±11.60 B
EF C	24.59	± 1.81 A	134.58	± 2.87 B	134.29	±3.49 A
SV C	31.85	± 2.83 A	82.11	± 2.83 A	25.67	±2.83 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0.05$)
 EF EE: extracto enzimático bajo electrofermentación; SV EE: extracto enzimático sin la aplicación de voltaje; EF C: células bajo electrofermentación, SV C: células sin la aplicación de voltaje

Por otra parte, la regeneración del NADH fue evaluado de acuerdo a la reacción de la resazurina la cual se reduce a resorufina por deshidrogenasas dependientes de NADH (Kuepper *et al.*, 2016). En el Cuadro 13 y 14 se muestra el efecto significativo ($p \geq 0.05$) del tratamiento sobre la regeneración de NADH de la electrofermentación y fermentación electrostática respectivamente.

Cuadro 13. Análisis de varianza para los factores evaluados (voltajes y condición de la célula) en *K. marxianus* sobre la regeneración del NADH.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Tratamiento	3	32796021	10932007	26.362	3.2E-11***
Tiempo	1	1066407	1066407	2.572	0.113722
Tratamiento:Tiempo	3	9981756	3327252	8.024	0.000128***
Residuales	64	26540012	414688		
Código de significancia	0.05 `***`				

Cuadro 14. Análisis de varianza del efecto del voltaje (electrostática 15 y 30 V o SV) en *K. marxianus* sobre la regeneración del NADH a las 24 h.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
Tratamiento	4	18931	4733	23.808	4.6E-11***
Tiempo	1	2764	2764	13.905	0.000491***
Tratamiento:Tiempo	4	2343	586	2.947	0.029036
Residuales	50	9939	199		
Código de significancia	0.05 `***`				

En el Cuadro 15 se observa la regeneración de NADH del extracto enzimático y de las células de *K. marxianus*. La mayor regeneración de NADH se obtuvo al utilizar extracto enzimático pero sin la aplicación de voltaje, esto concuerda con el mayor rendimiento de xilitol pero no con la actividad de la enzima xilosa reductasa. Yablochkova *et al.* (2004) mencionan que *K. marxianus* tiene una baja actividad de xilosa reductasa mientras usa NADH como cofactor lo cual explica que a pesar de obtener mayor regeneración de NADH la actividad enzimática fue baja posiblemente debido a la preferencia de NADPH.

Cuadro 15. Regeneración del NADH del extracto enzimático o células de *K. marxianus* bajo electrofermentación (-0.7 V).

Tratamiento	NADH (URT min ⁻¹ mg ⁻¹)							
	0 h		24 h		48 h		72 h	
EF EE	1544.94 ± 1.87	C	1471.07 ± 10.17	A	1398.04 ± 9.32	B	910.39 ± 12.46	B
SV EE	643.61 ± 4.70	A	718.53 ± 4.70	A	931.05 ± 4.70	A	678.07 ± 4.70	A
EF C	1288.80 ± 3.50	B	1192.45 ± 14.28	A	3201.92 ± 22.48	D	3621.61 ± 7.11	D
SV C	1981.98 ± 11.21	D	4796.03 ± 11.21	B	2997.04 ± 11.21	C	2375.23 ± 11.21	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0.05$)

EF EE: extracto enzimático bajo electrofermentación; SV EE: extracto enzimático sin la aplicación de voltaje; EF C: células bajo electrofermentación, SV C: células sin la aplicación de voltaje

En el Cuadro 16 y 17 se pueden observar tanto la actividad enzimática como la regeneración de NADH obtenidos al utilizar diferentes voltajes en la fermentación electrostática. La mayor actividad y regeneración de NADH se obtuvo al utilizar 10 y 20 V manteniéndose durante todo el tiempo de fermentación. Los mayores valores $4 \pm 3.10 \text{ U mg}^{-1}$ se obtuvieron al utilizar 10 V durante las primeras 48 h. Sin embargo, es necesario mencionar que cuando se utilizó este voltaje se obtuvo $0.51 \pm 0.05 \text{ g xilitol (g xilosa)}^{-1}$ siendo 0.6 veces menor al obtenido al utilizar 30 V $0.84 \pm 0.04 \text{ g xilitol (g xilosa)}^{-1}$. La xilosa se reduce a xilitol a la par que el NADH es oxidado a NAD^+ , probablemente al utilizar 10 V se obtuvo una alta generación de NAD^+ lo cual condujo a la oxidación de xilitol a xilulosa; por lo tanto, se acumuló menos xilitol (Furlan *et al.*, 1994). Sin embargo, no se dirigió hacia la producción de etanol por lo que pudiera haberse dirigido a otra ruta metabólica. Además la

regeneración de NADH no fue adecuada dado que el potencial aplicado está por encima del potencial redox de la pareja de NAD^+/NADH (-524 mV vs. Ag/AgCl). Engel *et al.* (2018) reporta que al ocurrir esto se induce un flujo de electrones termodinámicamente desfavorable desde el electrodo a la pareja redox más negativa de NAD^+/NADH . El suplemento de electrones a partir del cátodo (10 V) al microorganismo aumenta la reacción de reducción de cofactores tales como NADH (Choi y Sang, 2016). De acuerdo a los resultados los valores de máxima producción de xilitol no se relacionan directamente con la actividad de la enzima xilosa reductasa así como la regeneración del NADH. Lo anterior pudo deberse a un posible aumento de la actividad de la enzima xilitol deshidrogenasa utilizada para transformar el xilitol a xilulosa y seguir las vías metabólicas para la generación de otros compuestos. Aunado a esto, la aplicación de voltaje puede modificar el potencial de reducción de oxidación de un medio (ORP extracelular), que posteriormente afecta el ORP intracelular a través del equilibrio oxidado/reducido de NAD (NAD^+/NADH), impactando el proceso metabólico (Berríos-Rivera *et al.*, 2002). Con la aplicación de voltaje los ambientes redox se controlan para estabilizar la fermentación y obtener altos rendimientos de los productos objetivo de los electrodos de referencia mediante reacciones electroquímicas en los electrodos (Moscoviz *et al.*, 2016). En esta investigación no se midieron los niveles de expresión de genes sin embargo, Sasaki *et al.*, 2018 mencionan que los microorganismos alteran su expresión de genes y vías metabólicas en respuesta al balance redox intracelular. Lo anterior podría estar relacionado indirectamente con las actividades enzimáticas dado que los electrones inyectados a partir del cátodo provocan cambios en las actividades metabólicas.

Cuadro 16. Actividad enzimática de xilosa reductasa del extracto enzimático de *K. marxianus* bajo un sistema de electrostática (5, 10, 20 y 30 V) o sin la aplicación de voltaje (SV).

Tratamiento	XR U mg ⁻¹							
	0 h		24 h		48 h		72 h	
5V EE	47.79 ± 3.08	B	76.56 ± 3.81	C	31.75 ± 1.86	C	149.34 ± 1.52	B
10 V EE	33.29 ± 2.92	A	24.33 ± 1.56	A	4.12 ± 3.10	A	93.60 ± 1.91	A
20 V EE	35.13 ± 1.25	A	26.75 ± 1.57	A	109.98 ± 1.25	D	177.95 ± 1.85	B
30 V EE	67.11 ± 1.26	C	27.16 ± 1.51	A	15.66 ± 2.23	B	104.88 ± 31.14	A
SV EE	42.13 ± 2.26	B	46.72 ± 4.10	B	128.92 ± 6.38	E	71.05 ± 16.80	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0.05$)

Cuadro 17. Regeneración del NADH del extracto enzimático de *K.* bajo un sistema de electrostática (5, 10, 20 y 30 V) o sin la aplicación de voltaje (SV).

Tratamiento	NADH (URT min ⁻¹ mg ⁻¹)							
	0 h		24 h		48 h		72 h	
5V EE	51.29 ± 0.46	B	97.97 ± 9.64	C	70.34 ± 2.16	B	53.59 ± 4.37	B
10 V EE	30.30 ± 3.39	A	32.81 ± 2.40	A	47.38 ± 4.65	A	63.32 ± 3.87	B
20 V EE	32.74 ± 0.66	A	48.85 ± 4.45	B	45.08 ± 4.20	A	75.78 ± 3.54	C
30 V EE	58.09 ± 5.78	B	108.98 ± 7.49	C	97.73 ± 4.84	C	84.73 ± 3.35	C
SV C	28.54 ± 1.95	A	50.97 ± 0.41	B	41.15 ± 1.48	A	37.36 ± 3.80	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0.05$)

Una vez que ya se había comparado el efecto de la electrofermentación sobre la producción de xilitol, etanol, la actividad de la enzima XR y la regeneración de NADH, surgió el interés de evaluar si el rojo neutro estaba ejerciendo algún efecto tóxico en la levadura. Dado al bajo consumo de xilosa al utilizar un sistema de fermentación electrostática, seleccionamos este sistema por fines prácticos con selección de 20 y 30 V debido a la mayor producción de xilitol y etanol, además de donde no se aplicó voltaje. Por lo tanto en la Figura 15 se puede observar el consumo de xilosa (A y B), el cual siguió la misma tendencia independientemente de la aplicación o no de voltaje durante las 72 h de fermentación. No fue posible cuantificar la producción de xilitol sin embargo se determinó la cantidad de etanol donde nuevamente se observa la mayor producción al aplicar voltaje a comparación de la fermentación tradicional (sin aplicación de voltaje).

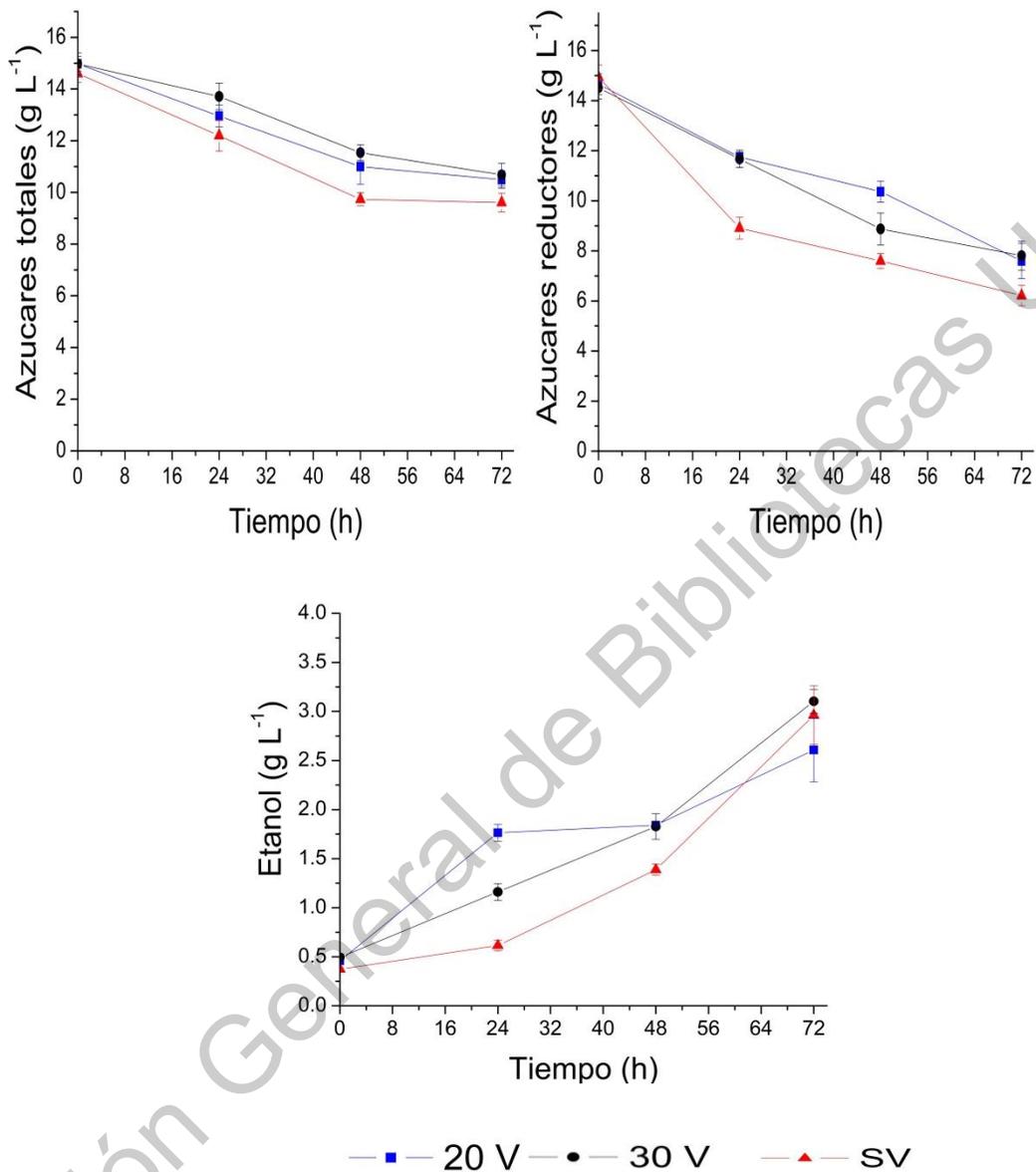


Figura 15. Efecto del voltaje (electrostática: SV=sin voltaje, 20 y 30 V) en la fermentación de xilosa sin RN por *Kluyveromyces marxianus*, Consumo de A) azúcares totales, B) azúcares reductores y C) producción de etanol.

En el Cuadro 18 se muestra el efecto de añadir o no rojo neutro como mediador de electrones al medio de cultivo a los diferentes tiempos de fermentación sobre el consumo de xilosa. Sin embargo, no se observan diferencias significativas en ninguno de los tiempos con o sin la inclusión de este mediador.

Cuadro 18. Efecto del rojo neutro como mediador de electrones en el consumo de xilosa por *K. marxianus* a los diferentes tiempos de fermentación y diferentes voltajes evaluados.

Tratamiento		Consumo de xilosa g L ⁻¹								
		24 h			48 h			72 h		
<i>K. marxianus</i> sin RN	30 V EE	12.95	± 0.41	A	10.99	± 0.68	A	10.49	± 0.34	A
	20 V EE	13.71	± 0.51	A	11.53	± 0.30	A	10.68	± 0.44	A
	SV EE	12.19	± 0.60	A	9.73	± 0.25	A	9.60	± 0.35	A
<i>K. marxianus</i> con RN	30 V EE	11.54	± 0.06	A	10.44	± 0.24	A	9.20	± 0.39	A
	20 V EE	11.32	± 0.47	A	10.83	± 0.73	A	9.93	± 0.60	A
	SV EE	12.57	± 0.43	A	11.96	± 0.82	A	10.57	± 0.35	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0.05$)

En el Cuadro 19 se muestra el efecto del rojo neutro en el rendimiento de etanol, no obstante en la producción de dicho metabolito se observa que se obtiene mayor rendimiento cuando no se utiliza rojo neutro en el medio de cultivo. Demostrándose con esto que el rojo neutro afecta el nivel de metabolización de xilosa para la producción de etanol, caso contrario a lo reportado por (Girbal *et al.*, 1995). El ORP extracelular corresponde a la actividad de los electrones presentes en el electrolito e influye en la relación NAD⁺/NADH dentro de las células. La relación NAD⁺/NADH representa ORP intracelular debido a la homeostasis redox intracelular, que controla la expresión génica y la síntesis de enzimas para la actividad metabólica general. Por lo tanto, es razonable suponer que al regular el potencial redox en el reactor, se pueden influir las vías de fermentación y el espectro del producto. El potencial de óxido reducción puede ser controlado por adición de oxidantes químicos tales como ferrocianuro de potasio y reductantes tales como

dithiotreitol al medio de cultivo. También como acarreadores de electrones tales como metil viologeno y rojo neutro los cuales modifican el potencial de óxido-reducción intracelular al desviar el flujo de electrones de la producción de hidrógeno a NADH. Debido a que el ORP intracelular se puede modificar por suministro de un flujo de electrones, se requiere un portador de electrones artificial para la transferencia de electrones entre el electrodo y la membrana celular. Rabaey y Rozendal. (2010) mencionan que el rojo neutro puede usarse como un verdadero impulsor de las conversiones microbianas y la generación de fuerza motriz de protones. Se utilizó rojo neutro debido a que se ha reportado para otros microorganismos que no ejercen efecto tóxico caso contrario a lo obtenido en esta investigación para la levadura *K. marxianus*. La estructura del rojo neutro difiere bajo diferentes pH y potenciales redox, estas estructuras incluyen rojo neutro (NRH^+), rojo neutro reducido (NRH_2) y rojo neutro leuco (NR). Cuando se disuelve en agua a pH 7.0, la sal de cloruro de NRH^+ hace una solución de color rojo. La reducción electroquímica en agua produce una solución amarilla con una fluorescencia verde. La reducción de NRH^+ y RN se produce a través de la transferencia de dos electrones a un potencial estándar (-525 mV Ag/AgCl para $\text{NRH}_2/\text{NRH}^+$) que está cerca del potencial estándar del portador redox biológico nicotinamida adenina hidruro de dinucleótido (-515 mV Ag/AgCl para NAD^+/NADH) (Park y Zeikus, 1999). No obstante se logró observar dicha reducción a -0.7 V. Por otra parte se realizó voltametría cíclica para medir electroquímicamente el potencial de oxidación-reducción del RN.

Cuadro 19. Efecto del rojo neutro como mediador de electrones en el rendimiento de etanol de *K. marxianus* a los diferentes tiempos de fermentación y diferentes voltajes evaluados.

Tratamiento	Y g etanol (g xilosa) ⁻¹									
	24 h			48 h			72 h			
<i>K. marxianus</i> con RN	30 V EE	0.46 ± 0.02	CD	0.50 ± 0.02	C	0.54 ± 0.02	B	20 V EE	0.44 ± 0.00	D
	SV EE	0.38 ± 0.03	D	0.40 ± 0.02	C	0.47 ± 0.03	B			
<i>K. marxianus</i> sin RN	30 V EE	1.16 ± 0.08	A	1.83 ± 0.13	A	3.10 ± 0.12	A	20 V EE	1.76 ± 0.08	A
	SV EE	0.61 ± 0.05	C	1.39 ± 0.05	B	2.96 ± 0.30	A			

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \geq 0.05$)

La Figura 16 muestra los voltamogramas cíclicos del RN. Debido a que el rojo neutro sufre múltiples reacciones redox, la voltametría cíclica se realizó con un gran intervalo de potencial (-1 a +1 mV Ag/AgCl). Mientras se realizaban las exploraciones en una solución roja neutra tamponada con fosfato, se observaron dos picos catódicos con los picos de ánodo correspondientes. Se logra ver el pico de oxidación y reducción a -0.7 V. La menaquinona normalmente se reduce a menaquinol (MKH₂) a través de una deshidrogenasa de NADH que bombea protones (es decir, nuo o complejo I de la cadena respiratoria de *K. marxianus*). Lo que resulta en la translocación de protones a través de la membrana interna y la regeneración de menaquinona después de la oxidación por un receptor terminal de electrones. Cuando la menaquinona se reduce por el rojo neutro, no se produce una translocación de protones y, por lo tanto, no se genera una fuerza motriz de protones. Al reducir la menaquinona, el rojo neutro tomó el lugar de la reducción de la menaquinona generadora de protones por NADH, lo que resulta en menores rendimientos de ATP y menor generación de biomasa frente a la fermentación de control con el mismo aceptor. En efecto, el rojo neutro "robó" la cadena de energía de transporte de electrones que podría haberse utilizado para generar ATP (Harrington *et al.*, 2015), esto explica porque se obtuvo valores bajos de consumo de xilosa y producción de etanol.

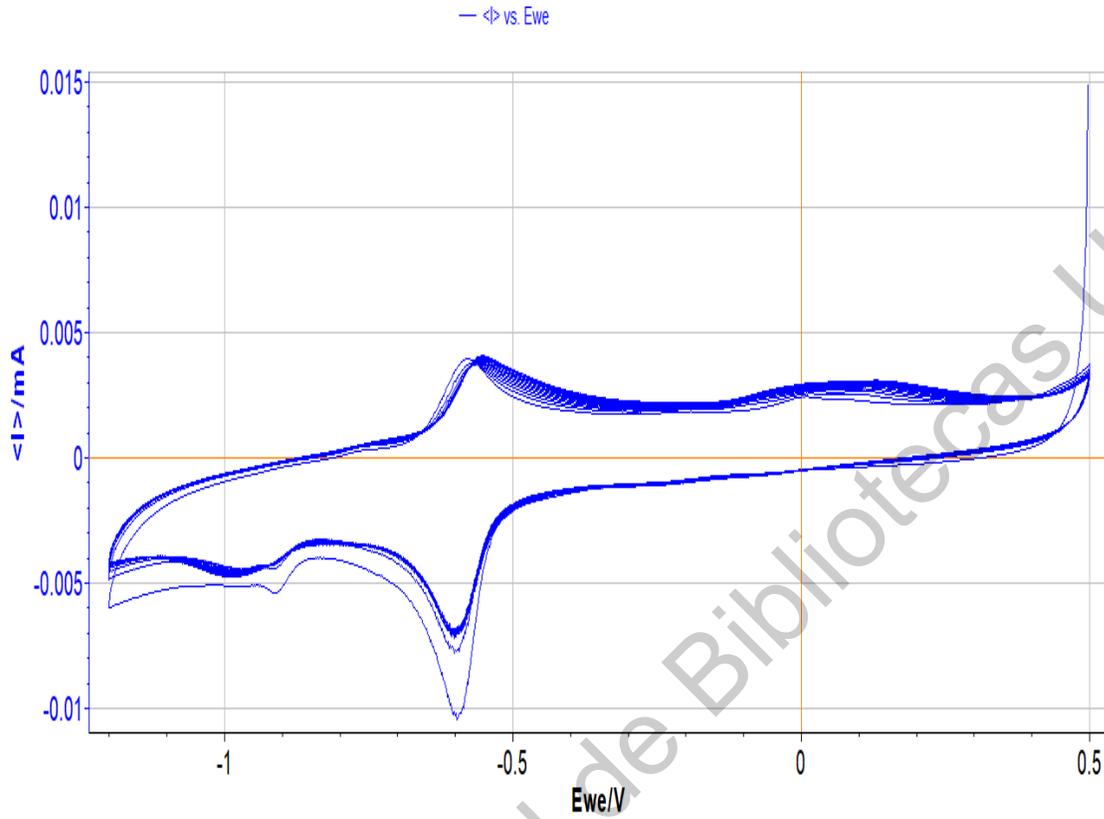


Figura 16. Voltametría cíclica del rojo neutro a -0.7 V.

6. CONCLUSIONES

Se diseñó y construyó un reactor para la fermentación electrostática y electrofermentación a niveles de laboratorios, los cuales permitieron evaluar el efecto del voltaje sobre la producción de xilitol.

El uso del extracto enzimático de *K. marxianus* permitió el mayor rendimiento de xilitol.

La aplicación de -0.7 V en la electrofermentación no permitió aumentar la producción de xilitol, pero si el de etanol permitiendo una productividad de 0.007 g $L^{-1} h^{-1}$ a comparación de donde no se aplicó voltaje.

En la fermentación electrostática al aplicar 30 V aumentó 0.5 veces mas el rendimiento de xilitol a comparación de donde no se aplicó voltaje.

La fermentación electrostática con el uso de 30 V a las 72 h permitió una producción de xilitol similar a cuando se utilizó el reactor tipo H (-0.7 V), por lo que el reactor de una celda podría ser una opción para poder obtener dicho metabolito.

Los mayores valores de la actividad enzimática de xilosa reductasa y la regeneración de NADH en el sistema de electrofermentación se obtuvieron al utilizar extracto enzimático pero sin la aplicación de voltaje.

En la fermentación electrostática la mayor actividad y regeneración de NADH se obtuvieron al utilizar 10 V durante las primeras 48 h. Sin embargo, es necesario mencionar que cuando se utilizó este voltaje se obtuvo 0.51 ± 0.05 g xilitol $(g \text{ xilosa})^{-1}$ siendo 0.6 veces menor al obtenido al utilizar 30 V (0.84 ± 0.04 g xilitol $(g \text{ xilosa})^{-1}$)

El rojo neutro no ejerce efecto sobre el crecimiento de *K. marxianus* pero si en la producción de etanol.

7. REFERENCIAS

- Agbogbo, F. K., y Coward-Kelly, G. (2008). Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnology Letters*, 30(9), 1515–1524. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9728-z>
- Agbogbo, F. K., y Wenger, K. S. (2006). Effect of pretreatment chemicals on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Biotechnology Letters*, 28(24), 2065–2069. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9192-6>
- Albuquerque, T. L. De, Da Silva, I. J., De MacEdo, G. R., y Rocha, M. V. P. (2014). Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes A review. *Process Biochemistry*, 49(11), 1779–1789. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.07.010>
- Ashoor, S., Comitini, F., y Ciani, M. (2015). Cell-recycle batch process of *Scheffersomyces stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae* co-culture for second generation bioethanol production. *Biotechnology Letters*, 37(11), 2213–2218. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1919-9>
- Azarpazhooh, A., Lawrence, H. P., y Shah, P. S. (2016). Xylitol for preventing acute otitis media in children up to 12 years of age. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016(8). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007095.pub3>
- Baptista, S. L., Cunha, J. T., Romani, A., y Domingues, L. (2018). Xylitol production from lignocellulosic whole slurry corn cob by engineered industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. *Bioresource Technology*, 267(May), 481–491. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.068>
- Berrios-Rivera, S. J., Bennett, G. N., y San, K. Y. (2002). The effect of increasing NADH availability on the redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli* chemostat cultures. *Metabolic Engineering*, 4(3), 230–237. <https://doi.org/10.1006/mben.2002.0228>
- Casey, E., Sedlak, M., Ho, N. W. Y., y Mosier, N. S. (2010). Effect of acetic acid and pH on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 10(4), 385–393. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00623.x>
- Caspeta, L., Shoaie, S., Agren, R., Nookaew, I., y Nielsen, J. (2012). Genome-scale metabolic reconstructions of *Pichia stipitis* and *Pichia pastoris* and in-silico

- evaluation of their potentials. *BMC Systems Biology*, 6(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-6-24>
- Choi, O., y Sang, B. I. (2016). Extracellular electron transfer from cathode to microbes: Application for biofuel production. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0426-0>
- Civelek Yoruklu, H., Oguz Koroglu, E., Demir, A., y Ozkaya, B. (2019). The Electromotive-Induced Regulation of Anaerobic Fermentation. In *Microbial Electrochemical Technology*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64052-9.00030-3>
- Dasgupta, D., Ghosh, D., Bandhu, S., y Adhikari, D. K. (2017). Lignocellulosic sugar management for xylitol and ethanol fermentation with multiple cell recycling by *Kluyveromyces marxianus* IPE453. *Microbiological Research*, 200, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.002>
- de Albuquerque, T. L., Gomes, S. D. L., Marques, J. E., Silva, I. J. da, y Rocha, M. V. P. (2015). Xylitol production from cashew apple bagasse by *Kluyveromyces marxianus* CCA510. *Catalysis Today*, 255, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2014.10.054>
- Delgado Arcaño, Y., Valmaña García, O. D., Mandelli, D., Carvalho, W. A., y Magalhães Pontes, L. A. (2018). Xylitol: A review on the progress and challenges of its production by chemical route. *Catalysis Today*. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2018.07.060>
- Engel, M., Holtmann, D., Ulber, R., y Tippkötter, N. (2019). Increased Biobutanol Production by Mediator-Less Electro-Fermentation. *Biotechnology Journal*, 14(4), 1–10. <https://doi.org/10.1002/biot.201800514>
- Farias, D., De Andrade, R. R., y Maugeri-Filho, F. (2014). Kinetic modeling of ethanol production by *Scheffersomyces stipitis* from xylose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(1), 361–379. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0546-y>
- Furlan, S. A., Bouilloud, P., y de Castro, H. F. (1994). Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. *Process Biochemistry*, 29(8), 657–662. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)80043-X](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)80043-X)
- Ghaffar, A., Yameen, M., Aslam, N., Jalal, F., Noreen, R., Munir, B., Latif, F. (2017).

- Acidic and enzymatic saccharification of waste agricultural biomass for biotechnological production of xylitol. *Chemistry Central Journal*, 11(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0331-z>
- Girbal, L., Vasconcelos, I., Saint-Amans, S., y Soucaille, P. (1995). How neutral red modified carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH. *FEMS Microbiology Reviews*, 16(2–3), 151–162. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1995.tb00163.x>
- Harrington, T. D., Mohamed, A., Tran, V. N., Biria, S., Gargouri, M., Park, J. J., ... Beyenal, H. (2015). Neutral red-mediated microbial electrosynthesis by *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Zymomonas mobilis*. *Bioresource Technology*, 195, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.005>
- Jiang, Y., May, H. D., Lu, L., Liang, P., Huang, X., y Ren, Z. J. (2019). Carbon dioxide and organic waste valorization by microbial electrosynthesis and electro-fermentation. *Water Research*, 149, 42–55. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.092>
- Jo, J. H., Oh, S. Y., Lee, H. S., Park, Y. C., y Seo, J. H. (2017). Dual utilization of NADPH and NADH cofactors enhances xylitol production in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Food, Pharmaceutical and Bioengineering Division 2017 - Core Programming Area at the 2017 AIChE Annual Meeting*, 1, 425–433. <https://doi.org/10.1002/biot.201500068>
- Joshi, J., Dhungana, P., Prajapati, B., Maharjan, R., Poudyal, P., Yadav, M., Sreerama, L. (2019). Enhancement of Ethanol Production in Electrochemical Cell by *Saccharomyces cerevisiae* (CDBT2) and *Wickerhamomyces anomalus* (CDBT7). *Frontiers in Energy Research*, 7(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2019.00070>
- Kiransree, N., Sridhar, M., y Rao, L. V. (2000). *Characterisation of thermotolerant , ethanol tolerant fermentative Saccharomyces cerevisiae for ethanol production*. 22, 0–3.
- Kresnowati, M. T. A. P., Regina, D., Bella, C., Wardani, A. K., y Wenten, I. G. (2019). Combined ultrafiltration and electrodeionization techniques for microbial xylitol purification. *Food and Bioproducts Processing*, 114, 245–252.

<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.01.005>

Kricka, W., Fitzpatrick, J., y Bond, U. (2015). Chapter Three Challenges for the Production of Bioethanol from Biomass Using Recombinant Yeasts. In S. S. and G. M. Gadd (Ed.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 92, pp. 89–125). Academic Press.

Kuepper, J., Zobel, S., Wierckx, N., y Blank, L. M. (2016). A rapid method to estimate NADH regeneration rates in living cells. *Journal of Microbiological Methods*, 130, 92–94. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.09.001>

Kundiyana, D. K., Wilkins, M. R., Huhnke, R. L., y Banat, I. M. (2009). Effect of furfural addition on xylose utilization by *Kluyveromyces marxianus* IMB4 under anaerobic and microaerobic conditions. *Biological Engineering*, 2(1), 3–15.

Kuyper, M., Winkler, A. A., Van Dijken, J. P., y Pronk, J. T. (2004). Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: A proof of principle. *FEMS Yeast Research*, 4(6), 655–664. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.01.003>

Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., y Nilvebrant, N. O. (1999). The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(3–4), 151–159. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00101-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00101-X)

Leandro, M. J., Gonçalves, P., y Spencer-Martins, I. (2006). Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: First molecular characterization of a yeast xylose-H⁺ symporter. *Biochemical Journal*, 395(3), 543–549. <https://doi.org/10.1042/BJ20051465>

Li, Hanzi, Worley, K. E., y Calabrese Barton, S. (2012). Quantitative analysis of bioactive NAD⁺ regenerated by NADH electro-oxidation. *ACS Catalysis*, 2(12), 2572–2576. <https://doi.org/10.1021/cs3004598>

Li, Huahua, Mei, X., Liu, B., Li, Z., Wang, B., Ren, N., y Xing, D. (2019). Insights on acetate-ethanol fermentation by hydrogen-producing *Ethanoligenens* under acetic acid accumulation based on quantitative proteomics. *Environment International*, 129(73), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.013>

Liang, M., Damiani, A., He, Q. P., y Wang, J. (2014). Elucidating xylose metabolism

- of *Scheffersomyces stipitis* for lignocellulosic ethanol production. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2(1), 38–48. <https://doi.org/10.1021/sc400265g>
- Liu, T., Zou, W., Liu, L., y Chen, J. (2012). A constraint-based model of *Scheffersomyces stipitis* for improved ethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, 5, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-72>
- López-Linares, J. C., Romero, I., Cara, C., Castro, E., y Mussatto, S. I. (2018a). Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* from rapeseed straw hemicellulosic hydrolysate. *Bioresource Technology*, 247, 736–743. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.139>
- Mathew, A. S., Wang, J., Luo, J., y Yau, S. T. (2015). Enhanced ethanol production via electrostatically accelerated fermentation of glucose using *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific Reports*, 5(11), 866–878. <https://doi.org/10.1038/srep15713>
- Mohamad, N. L., Mustapa Kamal, S. M., y Mokhtar, M. N. (2015a). Xylitol Biological Production: A Review of Recent Studies. *Food Reviews International*, 31(1), 74–89. <https://doi.org/10.1080/87559129.2014.961077>
- Mohamad, N. L., Mustapa Kamal, S. M., y Mokhtar, M. N. (2015b). Xylitol Biological Production: A Review of Recent Studies. *Food Reviews International*, 31(1), 74–89. <https://doi.org/10.1080/87559129.2014.961077>
- Morais Junior, W. G., Pacheco, T. F., Trichez, D., Almeida, J. R. M., y Gonçalves, S. B. (2019). Xylitol production on sugarcane biomass hydrolysate by newly identified *Candida tropicalis* JA2 strain. In *Yeast* (Vol. 36). <https://doi.org/10.1002/yea.3394>
- Moscoviz, R., Toledo-Alarcón, J., Trably, E., y Bernet, N. (2016). Electro-Fermentation: How To Drive Fermentation Using Electrochemical Systems. *Trends in Biotechnology*, 34(11), 856–865. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.009>
- Mueller, M., Wilkins, M. R., y M. Banat, I. (2011). Production of Xylitol by the Thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB Strains. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 01(02), 1–5. [68](https://doi.org/10.4172/2155-</p></div><div data-bbox=)

9821.1000102e

- Nidetzky, B., Neuhauser, W., Haltrich, D., y Kulbe, K. D. (1996). Continuous enzymatic production of xylitol with simultaneous coenzyme regeneration in a charged membrane reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 52(3), 387–396. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19961105\)52:3<387::AID-BIT4>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19961105)52:3<387::AID-BIT4>3.0.CO;2-G)
- Nitiyon, S., Keo-oudone, C., Murata, M., Lertwattanasakul, N., Limtong, S., Kosaka, T., y Yamada, M. (2016). Efficient conversion of xylose to ethanol by stress-tolerant *Kluyveromyces marxianus* BUNL-21. *SpringerPlus*, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-1881-6>
- Oh, E. J., Ha, S. J., Rin Kim, S., Lee, W. H., Galazka, J. M., Cate, J. H. D., y Jin, Y. S. (2013). Enhanced xylitol production through simultaneous co-utilization of cellobiose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 15(1), 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.09.003>
- Papini, M., Nookaew, I., Uhlén, M., y Nielsen, J. (2012). Scheffersomyces stipitis: A comparative systems biology study with the Crabtree positive yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 11, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-136>
- Park, D. H., y Zeikus, J. G. (1999). Utilization of electrically reduced neutral red by *Actinobacillus succinogenes*: Physiological function of neutral red in membrane-driven fumarate reduction and energy conservation. *Journal of Bacteriology*, 181(8), 2403–2410.
- Pérez-Bibbins, B., Torrado-Agrasar, A., Salgado, J. M., Mussatto, S. I., y Domínguez, J. M. (2016). Xylitol production in immobilized cultures: a recent review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(4), 691–704. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1004660>
- Prakash, G., Varma, A. J., Prabhune, A., Shouche, Y., & Rao, M. (2011). Microbial production of xylitol from d-xylose and sugarcane bagasse hemicellulose using newly isolated thermotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Bioresource Technology*, 102(3), 3304–3308. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.074>
- Rabaey, K., y Rozendal, R. A. (2010). Microbial electrosynthesis - Revisiting the

- electrical route for microbial production. *Nature Reviews Microbiology*, 8(10), 706–716. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2422>
- Rafeek, R., Carrington, C. V. F., Gomez, A., Harkins, D., Torralba, M., Kuelbs, C., Nelson, K. E. (2019). Xylitol and sorbitol effects on the microbiome of saliva and plaque. *Journal of Oral Microbiology*, 11(1). <https://doi.org/10.1080/20002297.2018.1536181>
- Rafiqul, I. S. M., y Sakinah, A. M. M. (2013). Processes for the Production of Xylitol- A Review. *Food Reviews International*, 29(2), 127–156. <https://doi.org/10.1080/87559129.2012.714434>
- Reddy, C. A., y Gherna, R. L. (2007). Culture Preservation. In G. A. Marzluf, C. A. Reddy, T. J. Beveridge, T. M. Schmidt, L. R. Snyder, & J. A. Breznak (Eds.), *Methods for General and Molecular Microbiology, Third Edition* (pp. 1019–1034). American Society of Microbiology.
- Riyanto, R. (2005). Production Of Acetic Acid From Ethanol By Electrolysis (Electrosynthesis). *Teknoin*, 10(3), 181–190. <https://doi.org/10.20885/teknoin.vol10.iss3.art1>
- Rodicio, R. and Heinisch, J. J. (2009). Sugar metabolism by *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeast. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, 113–134.
- Rodrigues, R. C. L. B., Kenealy, W. R., y Jeffries, T. W. (2011). Xylitol production from DEO hydrolysate of corn stover by *Pichia stipitis* YS-30. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(10), 1649–1655. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-0953-4>
- Sahin, A. W., Axel, C., Zannini, E., y Arendt, E. K. (2018). Xylitol, mannitol and maltitol as potential sucrose replacers in burger buns. *Food and Function*, 9(4), 2201–2212. <https://doi.org/10.1039/c8fo00066b>
- Sánchez Nogué, V., y Karhumaa, K. (2015). Xylose fermentation as a challenge for commercialization of lignocellulosic fuels and chemicals. *Biotechnology Letters*, 37(4), 761–772. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1756-2>
- Santos, S C, Dionísio, S. R., Andrade, A. L. D. De, Roque, L. R., Costa, A. C. Da, y Ienczak, J. L. (2015). Fermentation of Xylose and Glucose Mixture in Intensified

- Reactors by *Scheffersomyces stipitis* to Produce Ethanol. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 9(5), 482–487. <https://doi.org/1999.1/10001459>
- Santos, Samantha Christine, de Sousa, A. S., Dionísio, S. R., Tramontina, R., Ruller, R., Squina, F. M., Ienczak, J. L. (2016). Bioethanol production by recycled *Scheffersomyces stipitis* in sequential batch fermentations with high cell density using xylose and glucose mixture. *Bioresource Technology*, 219, 319–329. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.102>
- Schievano, A., Pepé Sciarria, T., Vanbroekhoven, K., De Wever, H., Puig, S., Andersen, S. J., Pant, D. (2016). Electro-Fermentation – Merging Electrochemistry with Fermentation in Industrial Applications. *Trends in Biotechnology*, Vol. 34, pp. 866–878. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.007>
- Sharma, N. K., Behera, S., Arora, R., Kumar, S., y Sani, R. K. (2018). Xylose transport in yeast for lignocellulosic ethanol production: Current status. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.10.006>
- Shin, H., Zeikus, J., y Jain, M. (2002). Electrically enhanced ethanol fermentation by *Clostridium thermocellum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(4), 476–481. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0923-2>
- Silva, J. P. A., Mussatto, S. I., Roberto, I. C., y Teixeira, J. A. (2011). Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(1), 151–156. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322011000100016>
- Sonderegger, M., y Sauer, U. (2003). Evolutionary Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Anaerobic Growth on Xylose. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 1990–1998. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.1990>
- Song, Y., Wang, J., y Yau, S. T. (2014). Controlled glucose consumption in yeast using a transistor-like device. *Scientific Reports*, 4, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep05429>
- Sun, M. P., Byung, I. S., Dae, W. P., & Doo, H. P. (2005). Electrochemical reduction

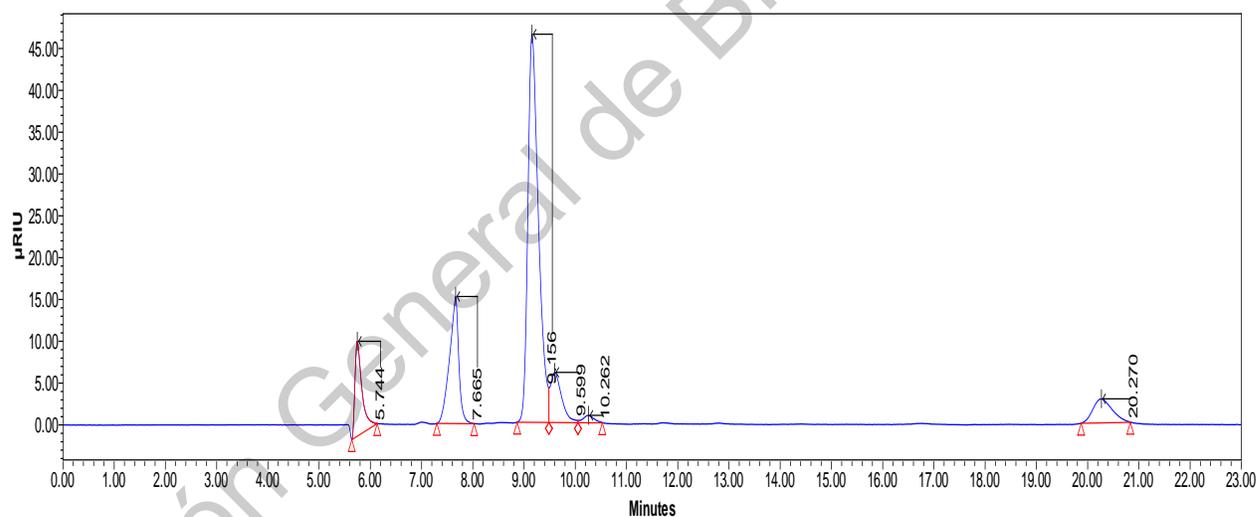
- of xylose to xylitol by whole cells or crude enzyme of *Candida peltata*. *Journal of Microbiology*, 43(5), 451–455.
- Ur-Rehman, S., Mushtaq, Z., Zahoor, T., Jamil, A., y Murtaza, M. A. (2015). Xylitol: A Review on Bioproduction, Application, Health Benefits, and Related Safety Issues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(11), 1514–1528. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.702288>
- Venkateswar Rao, L., Goli, J. K., Gentela, J., y Koti, S. (2015). Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. *Bioresource Technology*, 213, 299–310. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.092>
- Wood, I. P., Elliston, A., Ryden, P., Bancroft, I., Roberts, I. N., y Waldron, K. W. (2012). Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay. *Biomass and Bioenergy*, 44(0), 117–121. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.05.003>
- Xafenias, N., Kmezik, C., y Mapelli, V. (2016). Cathodes enhance *Corynebacterium glutamicum* growth with nitrate and promote acetate and formate production. *Bioresource Technology*, 216, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.051>
- Xu, Y., Chi, P., Bilal, M., y Cheng, H. (2019). Biosynthetic strategies to produce xylitol: an economical venture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(13), 5143–5160. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09881-1>
- Zhang, H., Yun, J., Zayed, H., Yang, M., Zhang, G., Qi, Y., Qi, X. (2018). Production of xylitol by expressing xylitol dehydrogenase and alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter thailandicus* and co-biotransformation of whole cells. *Bioresource Technology*, 257(February), 223–228. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.095>

8. ANEXOS

Anexo 1. Ecuación para el calculo del rendimiento producto xilitol/sustrato $Y_{P/S}$ (Ecuación 1), dónde P_f y P_i son la concentración final e inicial de xilitol, respectivamente, S_f y S_i son la concentración de azúcares final e inicial consumidos para la producción máxima de xilitol.

$$Y_{P/S} \text{ (g xilitol g}^{-1} \text{ de azúcares consumidos)} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (1)$$

Anexo 2. Cromatograma de los compuestos obtenidos en la fermentación electrostática y electrofermentación. Fase móvil (H_2SO_4), 280 nm.



Anexo 3. Tiempos de retención de los diferentes compuestos obtenidos en la fermentación electrostática y electrofermentación de xilosa

Tiempo de retención en minutos a 280 nm	
Ácido acético	14.4
Xilosa	9.2
Xilitol	10.2
Etanol	20.1