



Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

**Producción de exopolisacárido pululano por *Aureobasidium pullulans*
utilizando como fuente de carbono el hidrolizado de residuos de quinua
obtenidos posterior a un proceso de extracción de saponina**

Tesis presentada por:

Florez Martinez, Eduardo

ORCID: 0009-0002-0744-5793

Para optar el Título Profesional de Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:

Dr. Terán Hilares, Ruly

ORCID: 0000-0003-0769-4175

Arequipa – Perú

2026

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 20 de Julio del 2026

Dictamen: 018703-C-EPIB-2026

Visto el borrador del expediente 018703, presentado por:

2015250091 - FLOREZ MARTINEZ EDUARDO

Titulado:

**PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDO PULULANO POR AUREROBASIDIUM PULLULANS
UTILIZANDO COMO FUENTE DE CARBONO EL HIDROLIZADO DE RESIDUOS DE QUINUA
OBTENIDOS POSTERIOR A UN PROCESO DE EXTRACCIÓN DE SAPONINA**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

INGENIERO BIOTECNOLOGO

**43085216 - MEDINA CABRERA EDILBERTO VICENTE
DICTAMINADOR**



**47604629 - TEJADA MEZA KEVIN
DICTAMINADOR**



**71093620 - JOHNSON CORRALES FABRIZIO
DICTAMINADOR**



PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDO PULULANO POR AUREOBASIDIUM PULLULANS UTILIZANDO COMO FUENTE DE CARBONO EL HIDROLIZADO DE RESIDUOS DE QUINUA OBTENIDOS POSTERIOR A UN PROCESO DE EXTRACCIÓN DE SAPONINA

INFORME DE ORIGINALIDAD

2%	4%	3%	1%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

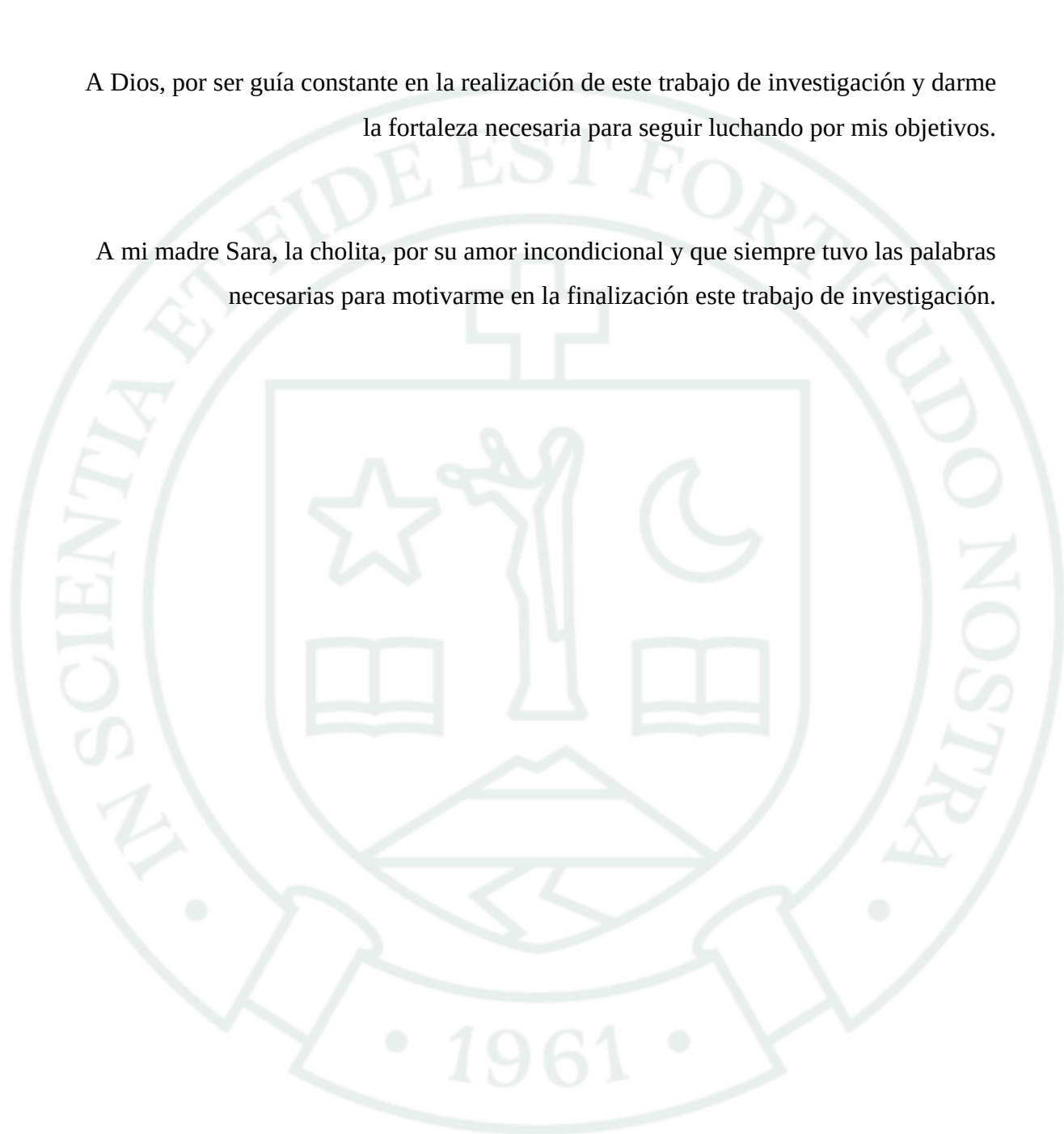
1	"Biorefineries in Circular Bioeconomy", Springer Science and Business Media LLC, 2025	1%
	Publicación	
2	Submitted to Universidad Católica de Santa María	1%
	Trabajo del estudiante	
3	Jiaen Zhang, Jingle Liu, Juan Wang, Shengqi Di, Jingyi Zhong, Yuanxin Qiu, Lichao Zhao, Yong Cao, Qun Wang. "Advances in Camellia oleifera seed meal Saponins: Extraction, analysis, bioactivity, and application", Food Chemistry, 2025	1%
	Publicación	
4	repositorio.ucsm.edu.pe	1%
	Fuente de Internet	

Excluir citas	Apagado	Excluir coincidencias	< 1%
Excluir bibliografía	Apagado		

DEDICATORIA

A Dios, por ser guía constante en la realización de este trabajo de investigación y darme la fortaleza necesaria para seguir luchando por mis objetivos.

A mi madre Sara, la cholita, por su amor incondicional y que siempre tuvo las palabras necesarias para motivarme en la finalización este trabajo de investigación.



AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la fortaleza y resiliencia para continuar cada día.

A mi madre Sara, que siempre estuvo apoyándome incondicionalmente

Al Dr. Ruly Terán Hilaes, por su constante apoyo, motivación y guía a lo largo de todo este proyecto.

Al Dr. Gilberto Colina Andrade, quien siempre estuvo dispuesto a ayudarme en el transcurso este proyecto.

A los tesisistas y técnicos de los laboratorios de Bioprocesos y Ciencias de los Materiales, por las alegrías compartidas y apoyo en los momentos más difíciles.

RESUMEN

Los residuos o polvillo generados en el proceso de escarificado de los granos de quinua (*Chenopodium quinoa*) a la actualidad no tienen un valor económico y su valorización es fundamental para fortalecer la cadena de valor de este importante cultivo. Este residuo sometido a un proceso de extracción de saponina por cavitación hidrodinámica contiene un elevado contenido de carbohidratos que puede ser utilizado como sustrato para la producción de bioproductos por fermentación. En este estudio, se evaluó el proceso de hidrólisis hidrotérmico de la fracción carbohidrato seguido de un proceso de detoxificación (furfural, HMF y compuestos fenólicos) del hidrolizado con resinas macroporosas comerciales (ADS-7, AB-8 y HPD-100) para su posterior uso como medio de fermentación para producción del exopolisacárido pululano por *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023. Se obtuvo 57.78 g/L de azúcares totales reductores (ART) utilizando un proceso hidrotérmico (180 °C, 120 RPM, 150 mg/g de ácido cítrico como catalizador y 5 minutos de proceso). Respecto a la remoción de inhibidores, se realizó por dos etapas de adsorción, ambas con la resina AB-8 obtuvo los mejores valores, con una concentración final de fenólicos de 5.38 g/L (56.19% de remoción) y de saponinas de 1.78 g/L (71.21% de remoción) después de la fermentación con *A. pullulans*. AB-8 también removió los inhibidores furfural y HMF, con un porcentaje de remoción de 97.98 y 83.81% respectivamente. La fermentación con *A. pullulans* se realizó por 96 horas en el biorreactor de tanque agitado Bio-Tec-Pro-II y se obtuvo una biomasa final de 22.79 g y 17.7 g/L de exopolisacárido (EPS). Con el ensayo FTIR, se determinó el espectro infrarrojo del EPS del medio detoxificado junto con un medio de control, concluyendo que ambos EPS eran pululano. Por lo tanto, estos residuos, posterior a una detoxificación, pueden ser fuentes alternativas para la producción de biopolímeros.

Palabras Claves: *A. pullulans*, EPS, hidrólisis, resinas macroporosas.

ABSTRACT

The residues or fine powder generated during the scarification of quinoa grains (*Chenopodium quinoa*) currently hold no economic value, and their valorization is essential to strengthen the value chain of this important crop. This residue, subjected to a saponin extraction process by hydrodynamic cavitation, contains a high carbohydrate content that can be utilized as a substrate for the production of bioproducts through fermentation. In this study, a hydrothermal hydrolysis process followed by a detoxification step, targeting furfural, HMF, and phenolic compounds, of the hydrolysate using commercial macroporous resins (ADS-7, AB-8, and HPD-100) was evaluated for its subsequent use as a fermentation medium for pullulan production by *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023. A yield of 57.98 g/L of total reducing sugars (TRS) was obtained using 150 mg/g of citric acid as catalyst, with a process time of 5 minutes. Regarding inhibitor removal, two-stage adsorption with resin AB-8 yielded the best results, achieving final concentrations of 5.38 g/L phenolics (56.19% removal efficiency) and 1.78 g/L saponins (71.21% removal efficiency) after fermentation with *A. pullulans*. AB-8 also removed the inhibitors furfural and HMF, with removal efficiencies of 97.98% and 83.81%, respectively. Fermentation with *A. pullulans* was conducted over 96 hours in the Bio-Tec-Pro-II stirred-tank bioreactor, yielding a final biomass of 22.79 g and an exopolysaccharide (EPS) concentration of 12.7 g/L. FTIR analysis was used to determine the infrared spectrum of the EPS from the detoxified medium alongside a control medium, confirming that both EPS corresponded to pullulan. Therefore, these residues, following a detoxification process, may represent alternative feedstocks for biopolymer production.

Key words: *A. pullulans*, EPS, hydrolysis, macroporous resins.

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

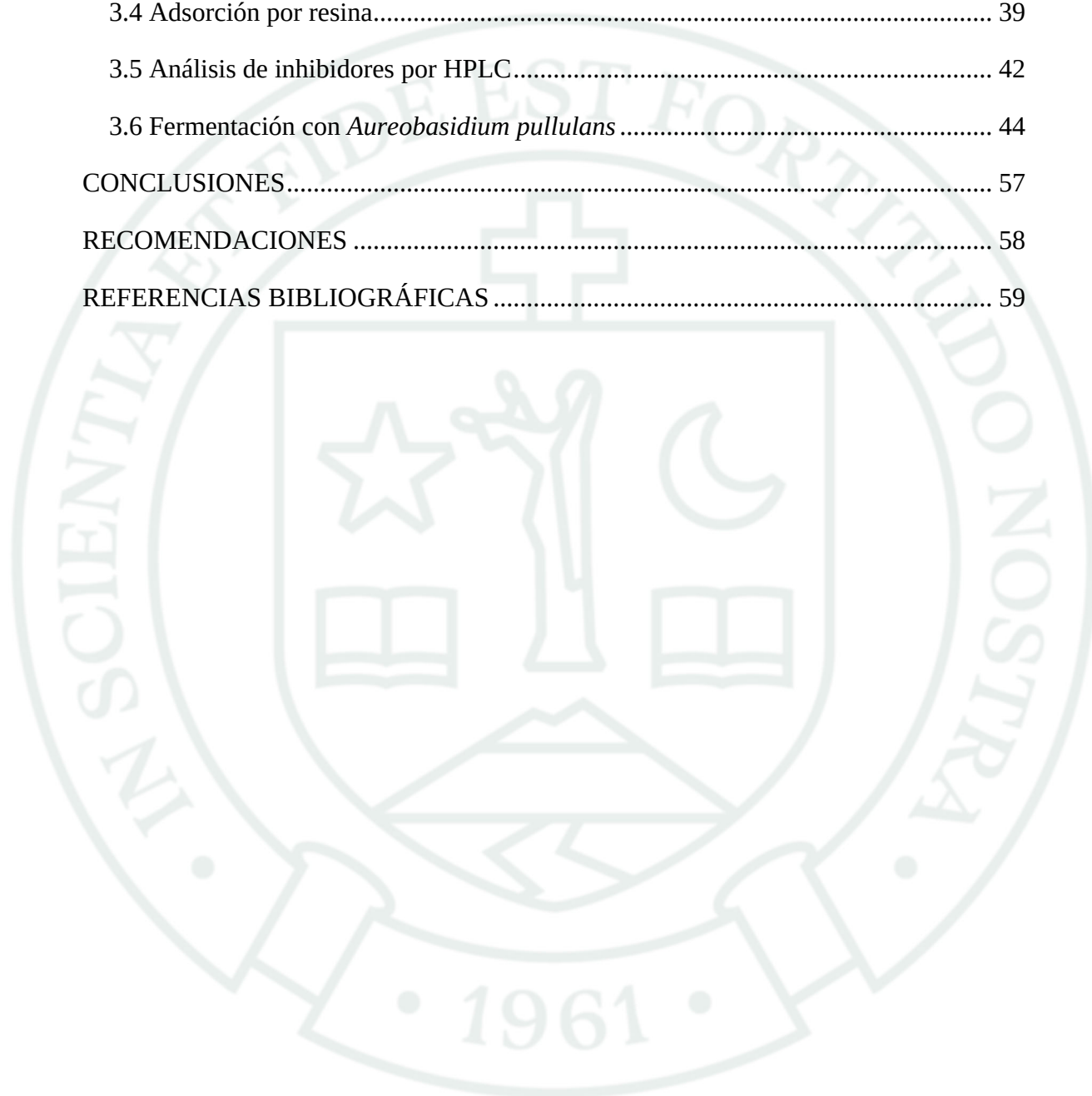
RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVOS.....	4
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	5
1.1 Quinua	5
1.1.1 Mercado y producción	6
1.1.2 Generación de residuos.....	6
1.2 Saponina	7
1.2.1 Propiedades de la saponina.....	8
1.2.2 Extracción de la saponina	9
1.3 Cavitación hidrodinámica como método de extracción de saponina	9
1.4 Fenólicos en residuos de quinua.....	10
1.5 Hidrólisis de la fracción carbohidrato en residuos de quinua.....	11
1.5.1 Hidrólisis ácida	11
1.5.2 Hidrólisis alcalina	11
1.5.3 Hidrólisis enzimática	11
1.5.4 Hidrólisis térmica	12
1.6 Inhibidores generados en procesos hidrotérmicos.....	13
1.7 Remoción de inhibidores	13
1.7.1 Resina macroporosa.....	13
1.8 Fermentación de carbohidratos presentes en hidrolizados	14
1.8.1 Sistemas de cultivo	15

1.8.2 Estado del sustrato	15
1.9 <i>Aureobasidium pullulans</i>	15
1.9.1 Pululano	17
1.9.2 Producción del pululano	17
1.9.3 Aplicaciones del pululano	18
1.10 Métodos de caracterización	18
1.10.1 FTIR	18
1.10.2 DSC	19
1.10.3 TGA	19
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.1 Lugar de ejecución	20
2.2 Materiales	20
2.2.1 Material biológico	20
2.2.2 Reactivos químicos	20
2.2.3 Materiales de laboratorio	20
2.2.4 Aparatos y equipos	21
2.3 Métodos	21
2.3.1 Polvillo o residuos de quinua	21
2.3.2 Extracción de saponina de residuos de quinua	22
2.3.3 Hidrólisis térmica del residuo	23
2.3.4 Remoción de compuestos inhibidores por adsorción	24
2.3.5 Análisis por HPLC	25
2.3.6 Producción de pululano por <i>Aureobasidium pullulans</i>	27
2.3.7 Fermentación en hidrolizado	27
2.4 Caracterización de pululano por FTIR	28
2.5 Análisis estadístico	29
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30

3.1 Determinación de las condiciones óptimas de hidrólisis en un reactor Parr	30
3.2 Optimización del proceso hidrotérmico para la obtención de azúcares fermentables	34
3.3 Superficie de respuesta para la optimización del proceso hidrotérmico	38
3.4 Adsorción por resina.....	39
3.5 Análisis de inhibidores por HPLC.....	42
3.6 Fermentación con <i>Aureobasidium pullulans</i>	44
CONCLUSIONES.....	57
RECOMENDACIONES	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la quinua.....	5
Tabla 2. Saponinas presentes en diferentes especies vegetales	8
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>A. pullulans</i>	16
Tabla 4. Comparación de las propiedades fisicoquímicas de las resinas macroporosas ADS-7, AB-8 y HPD-100.....	25
Tabla 5. Concentración de ART y saponinas totales (g/L) en comparación con la temperatura de hidrólisis (°C).	30
Tabla 6. Concentración de ART (g/L) respecto al tiempo de hidrólisis (minutos), una vez alcanzado los 180 °C en el reactor hidrotérmico.....	32
Tabla 7. Concentraciones de ART (g/L) como efecto de la adición de ácido cítrico (mg/g) como catalizador.....	33
Tabla 8. Efecto de las variables concentración de ácido cítrico y tiempo sobre la producción de ART.	35
Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático para la concentración de azúcares.	36
Tabla 10. Región de los principales umbrales de FTIR del pululano.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de las áreas de producción de quinua a nivel mundial.....	6
Figura 2. Estructura química de la saponina.	7
Figura 3. Representación gráfica de un cavitador hidrodinámico.....	10
Figura 4. Resina macroporosa.....	14
Figura 5. <i>A. pullulans</i>	16
Figura 6. Estructura del pululano.	17
Figura 7. Polvillo inicial de residuos de quinua	22
Figura 8. Polvo residual antes de la cavitación hidrodinámica (a), cavitador hidrodinámico (b) y residuo posterior a la extracción de saponina.....	23
Figura 9. Reactor Parr.	24
Figura 10. Resinas macroporosas ADS-7 (a), AB-8 (b) y HPD-100 (c).....	25
Figura 11. Equipo de HPLC.	26
Figura 12. Inóculo de <i>A. pullulans</i>	27
Figura 13. Fermentación en matraces.....	28
Figura 14. Biorreactor de tanque agitado Bio-Tec-Pro II.....	28
Figura 15. Equipo FTIR.	29
Figura 16. Concentración de ART (g/L) y saponinas (g/L) a diferentes temperaturas de hidrólisis. El inicial corresponde a la fracción líquida de la mezcla sin proceso térmico. Misma letras en la barra de saponinas o ART indican que no hay diferencias significativas conforme la prueba de Tukey a un nivel de significancia del 95%.	31
Figura 17. Concentración de ART (g/L) en diferentes tiempos de hidrólisis.	32
Figura 18. Concentración de ART (g/L) con diferentes concentraciones de ácido cítrico (mg/g).	34
Figura 19. Representación gráfica de las variables respecto a la concentración de azúcar. A) Gráfico de normalidad de los residuales, B) Gráfico de residuales frente a valores predichos, C) Gráfico de residuales frente al orden de experimento y D) Gráfico de Valor.	37
Figura 20. Superficie de respuesta de la interacción entre la concentración de ácido cítrico y tiempo para la obtención de ART.....	38
Figura 21. Fotografía del hidrolizado de polvillo de quinua posterior al proceso hidrotérmico.	39

Figura 22. Concentración de ART, fenólicos y saponinas antes y después de la adsorción con diferentes resinas macroporosas.	40
Figura 23. Adsorción con resinas ADS-7 (izquierda), AB-8 (centro) y HPD-100 (derecha).	41
Figura 24. Concentraciones de ART, fenólicos y saponinas después de segunda adsorción con AB-8 en ADS-7 (a), AB-8 (b) y HPD-100 (c)	42
Figura 25. Porcentaje de remoción de furfural, HMF y ART utilizando diferentes resinas macroporosas.	44
Figura 26. Cinética de la concentración de ART (a), fenólicos (b) y saponinas (c) durante el proceso de fermentación.	46
Figura 27. Decoloración del hidrolizado mediante la adsorción con resinas macroporosas. a) Hidrolizado inicial, b) después de la primera adsorción con resina AB-8 y c) posterior a una segunda adsorción con resina AB-8.	47
Figura 28. Cinética de adsorción de ART (a), fenólicos (b) y saponinas (c) en hidrolizados después de segunda adsorción.	49
Figura 29. Biomasa (a) y EPS de <i>A. pullulans</i> (b).	50
Figura 30. Fermentación de <i>A. pullulans</i> en biorreactor de tanque agitado.	51
Figura 31. Cinética de crecimiento de <i>A. pullulans</i> en medio tradicional. Consumo de ART, incremento de biomasa y síntesis de EPS.....	51
Figura 32. Cinética de crecimiento de <i>A. pullulans</i> en medio detoxificado con resinas macroporosas. Consumo de ART, incremento de biomasa y síntesis de EPS.	52
Figura 33. Espectros infrarrojos del pululano obtenido.	55

INTRODUCCIÓN

La producción de quinua ha aumentado en los últimos años debido a sus propiedades nutricionales y funcionales, como su alto contenido de proteínas, fibras y vitaminas, además de su alta resistencia a condiciones ambientales extremas (zonas altoandinas). El Perú se convirtió en el primer exportador de grano de quinua a nivel mundial en el 2024, conforme al Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI), alcanzando una producción de 104 mil toneladas y generando ingresos entre 130 y 140 millones de dólares (1). Para su exportación, es necesario remover la capa externa del grano ya que le confiere un sabor amargo debido a la alta concentración de saponinas principalmente en quinua amargas cultivadas en zonas altoandinas y dicho polvillo representa entre el 8 y 15% total del peso de grano dependiendo de la variedad del grano, con un aproximado del 20% en contenido de saponinas (2). Este polvillo es considerado como un residuo agroindustrial por lo que es desechado sin darle un valor agregado debido a su amargor. Con técnicas de extracción como la cavitación hidrodinámica, que reduce el tiempo del proceso y utiliza menos solventes tóxicos, se puede recuperar la saponina y con otras técnicas de purificación pueden ser usada en diferentes industrias como la farmacéutica, agricultura, entre otros (3). Sin embargo, el proceso de cavitación genera dos productos: uno líquido donde se encuentra la mayor concentración de saponinas y uno sólido que es descartado compuesto principalmente por carbohidratos. Este residuo sólido puede ser tratado con procesos hidrotérmicos y acelerados mediante el uso de un catalizador como el ácido cítrico, generando azúcares fermentables que pueden ser utilizados como fuente de carbono (4). No obstante, el proceso de hidrólisis genera inhibidores producto de la degradación de los azúcares, transformándose en furfural y 5-hidroximetilfurfural (HMF), aunque también pueden aumentar la concentración de otros compuestos como fenólicos, por lo que es importante remover estos compuestos. La utilización de resinas macroporosas ADS-7, AB-8 y HPD-100, puede ayudar a detoxificar el medio de fermentación y presenta ciertas ventajas frente al carbón activado que no solo llega a remover compuestos fenólicos, saponinas e inhibidores al igual que las resinas, sino que también reducen la concentración de azúcares (5). El medio parcialmente purificado puede usarse para obtener ciertos productos de interés comercial, como el pululano producido en un proceso fermentativo por *A. pullulans*, el mismo que puede ser utilizado como polímero en industrias alimentarias, farmacéuticas y cosméticas (6). La obtención de azúcares fermentables a partir de residuos puede contribuir a la reducción en la utilización de azúcares

comerciales y convertirse en un sustrato alternativo de bajo costo y altamente disponible, así como también el aprovechamiento de residuos para darles un valor agregado.



HIPÓTESIS

Dado que los residuos generados en la escarificación de la quinua contienen un alto contenido de carbohidratos (celulosa, hemicelulosa, almidón), estos residuos posteriores a un proceso de extracción de saponina incrementan aún más el contenido de carbohidratos que puede ser hidrolizados mediante hidrólisis térmica (proceso hidrotérmico) y posteriormente detoxificados con resinas macroporosas. Por lo tanto, este hidrolizado con bajo contenido de inhibidores tóxicos como furfural, hidroximetilfurfural y compuestos fenólicos pueden ser utilizados como fuente de carbono para la producción de exopolisacáridos por *Aureobasidium pullulans*, permitiendo la obtención de pululano, un biopolímero con aplicaciones industriales, así como promover la valorización de residuos agroindustriales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción del exopolisacárido pululano mediante el cultivo de *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023, utilizando como fuente de carbono el hidrolizado de residuos de quinua obtenidos por un proceso hidrotérmico y destoxificados mediante procesos de adsorción con resinas, valorizando el residuo generado posterior a la extracción de saponina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimizar el proceso de hidrólisis de la fracción carbohidrato residual a un proceso de extracción de saponina, mediante un proceso hidrotérmico en un reactor Parr para su posterior detoxificación y uso como fuente de carbono en la producción de pululano.
- Remover compuestos inhibidores de crecimiento microbiano (furfural, HMF, fenólicos) y saponinas del hidrolizado obtenido mediante un proceso hidrotérmico optimizado, empleando métodos de adsorción utilizando resinas macroporosas ADS-7, AB-8 y HPD-100.
- Evaluar la fermentabilidad del hidrolizado para la producción de pululano por *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023 en frascos Erlenmeyer (50 mL) y en un biorreactor de tanque agitado de 2.5 L.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1 Quinua

La quinua (*Chenopodium quinoa*) es un pseudo cereal perteneciente al reino plantae, familia *Chenopodiaceae*, que crece principalmente en la región andina de Sudamérica (**Tabla 1**). Es considerado como grano superior debido a su alto valor nutricional en comparación con otros productos, como el maíz, trigo y arroz ya que posee gran cantidad de vitaminas (B, C y E), aminoácidos como lisina y triptófano y algunos minerales como hierro, calcio y magnesio (7). Además, presenta una alta resistencia a diferentes estreses abióticos extremos, como baja temperatura, alta salinidad y sequía, lo que le permite crecer casi cualquier tierra de cultivo (8), por lo que la Organización de Alimentación y Agricultura de las Naciones Unidas (por sus siglas en inglés: FAO) declaró el año 2013 como el año de la quinua con el objetivo de estimular el desarrollo de los cultivos a nivel mundial reconocer las prácticas de los pequeños agricultores como los principales productores (9).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la quinua (10).

Nivel Taxonómico	Clasificación
Dominio	Eukaryota
Reino	Plantae
Filo	Spermatophyta
Clase	Dicotyledonae
Orden	<i>Caryophyllales</i>
Familia	<i>Chenopodiaceae</i>
Género	<i>Chenopodium</i>
Especie	<i>Chenopodium quinoa</i>

El grano de la quinua puede tener diferentes colores que están asociados con sus propiedades nutricionales y funcionales y pueden ser desde el negro hasta el blanco, aunque el color amarillo es el más abundante y posee un alto contenido de proteínas y carbohidratos, pero en menor porcentaje que el grano negro o blanco (11)

1.1.1 Mercado y producción

El mercado de la quinua ha ido incrementando a nivel mundial en los últimos años. Perú, Bolivia y Ecuador son los principales países que poseen las mayores áreas de cultivo de quinua (12) aunque también hay cultivos de quinua en África, Europa y Asia, en países como China e India (13). En el año 2014, se produjeron cerca de 192.5 toneladas donde el Perú fue el mayor productor con 114.3 toneladas, seguido Bolivia con 77.4 toneladas y Ecuador con 0.8 toneladas (14). En el año 2020 la producción mundial disminuyó a 175.1 toneladas debido a la pandemia del COVID-19, donde el Perú exportó 110.1 toneladas, Bolivia 70.1 toneladas y Ecuador 0.4 toneladas (9). Sin embargo, en el año 2024, Perú se convirtió en el primer exportador del grano de quinua a nivel mundial, con un aumento significativo en comparación del 2023, generando ingresos entre los 130 y 140 millones de dólares (1).

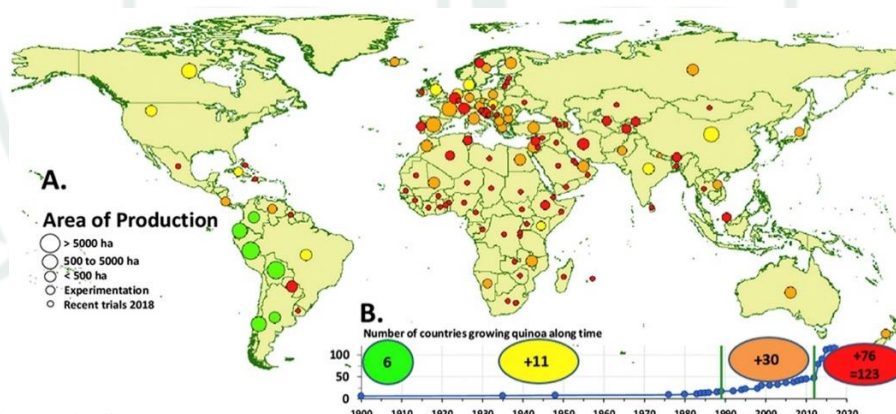


Figura 1. Distribución de las áreas de producción de quinua a nivel mundial (12).

1.1.2 Generación de residuos

Con el incremento de la actividad agrícola, también hay un incremento de los residuos agroindustriales ya que el consumo de productos de origen natural como frutas y vegetales produce una gran cantidad de residuos orgánicos que afectan a suelos, agua y aire y son responsables de aproximadamente el 21% de la emisión de gases invernaderos (15,16).

La mayoría de estos residuos no son valorizados y son desechados o quemados sin ningún tratamiento (17). Esta combustión genera gases que pueden afectar la salud humana, como es el caso de dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrógeno y azufre, además de material particulado ($\text{PM}_{2.5}$ y PM_{10}) (18–20). En el caso de la quinua, el grano representa el 30% del volumen total de la planta y el 70% son otras estructuras vegetativas, como tallos, raíces y hojas que no tienen un valor comercial (21). El grano de quinua tiene que pasar por un proceso de escarificación para remover la cáscara externa, responsables del sabor amargo de la quinua, lo que afecta el valor comercial y además que tiene propiedades anti nutricionales, por lo que pueden ser tóxicos para la población si es consumida en grandes concentraciones (22). Esta capa externa es removida lavándola con agua alcalina, lo que produciría la contaminación de zonas acuíferas cercanas, o mediante abrasión que es considera menos contaminante y, por lo tanto, utilizada mayormente, pero esto genera residuos agroindustriales, ya que este polvillo representa el 10% del peso total del grano, por lo que puede ser utilizado para la obtención de productos de interés comercial por sus propiedades biológicas, como la saponina (2,23).

1.2 Saponina

Las saponinas son metabolitos secundarios caracterizados por ser anfipáticos, es decir, que en su composición poseen una parte hidrofílica y otra lipofílica. La parte hidrofílica está compuesta de azúcares, como glucosa, arabinosa, xilosa, entre otras, mientras que la parte lipofílica compuesto de agliconas o sapogeninas que, dependiendo de su estructura química, pueden ser triterpenoides (30 carbonos) o esteroides (27 carbonos) (24).

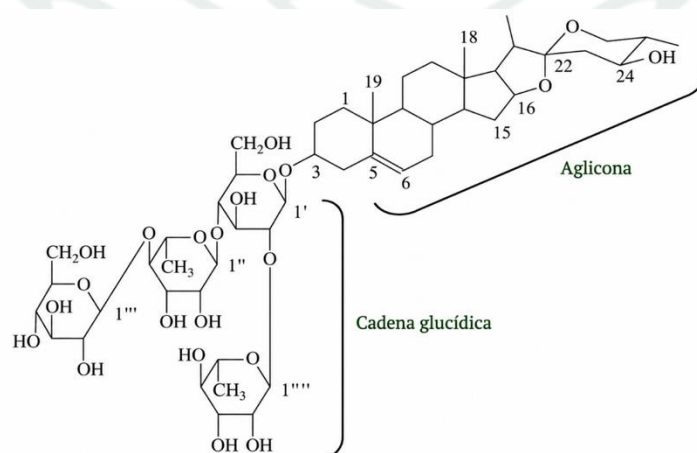


Figura 2. Estructura química de la saponina (25).

Las saponinas se encuentran distribuidas en una amplia variedad de plantas y cultivos como se puede apreciar en la **Tabla 2** y su función principal es de defensa a la planta frente plagas, herbívoros y algunas enfermedades y, por lo tanto, se encuentra en flores, raíces y hojas (26).

Tabla 2. Saponinas presentes en diferentes especies vegetales (27).

Fuentes vegetales	Contenido de saponinas (g/kg peso seco)
Arveja partida amarilla (<i>Pisum sativum</i>)	1.1
Arveja verde (<i>Pisum sativum</i>)	1.8
Avena (<i>Avena sativa</i>)	1.3
Berenjena (<i>Solanum melongena</i>)	58
Espinaca (<i>Spinacia oleracea</i>)	15
Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	4.1
Frijol escarlata (<i>Phaseolus coccineus</i>)	2.4
Frijol mungo (<i>Vigna radiata</i>)	0.5
Frijol rojo (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	3.5
Garbanzos (<i>Cicer arietinum</i>)	2.3
Hojas de remolacha (<i>Beta vulgaris</i>)	58
Lentejas (<i>Lens culinaris</i> Medik.)	15
Maní (<i>Arachis hypogaea</i>)	16
Raíces de espárrago (<i>Asparagus officinalis</i>)	15
Soya (<i>Glycine max</i> L.)	6.5
Tomatillo espinoso (<i>Solanum torvum</i>)	8.6
Yuca (<i>Yucca schidigera</i>)	80

1.2.1 Propiedades de la saponina

La saponina presenta muchas propiedades biológicas debido a su naturaleza anfipática que puede ayudar a la salud, como por ejemplo su actividad antioxidante, su actividad antitumoral, antiinflamatoria, regulación del peso corporal mediante actividades hipoglucémicas e hipocolesterolémica, y en el caso de plantas, tiene propiedades

antimicrobianas, antifúngicas y antiparasitarias como sistema de protección a diferentes plagas (28–30).

1.2.2 Extracción de la saponina

1.2.2.1 Metodologías clásicas

Son los métodos más estudiados, como la extracción por Soxhlet que consiste en varios lavados de una muestra con un solvente mediante su ebullición y condensación (31) y la maceración donde la muestra se deposita en un solvente, ya sea polar o apolar, a temperatura ambiente hasta que este se sature con el biocompuesto deseado (32). A pesar de que son técnicas con las que se pueden obtener una mayor concentración de saponina, presentan desventajas importantes, por ejemplo, son técnicas lentas, llegando a durar varias horas y el uso de una gran cantidad de solventes orgánicos que pueden poner en riesgo la salud del usuario, además de la posible descomposición de la muestra por la temperatura a la que se expone en el caso de la técnica de Soxhlet (33).

1.2.2.2 Metodologías emergentes

Son métodos más ecoamigables ya que no requieren gran cantidad de solvente y se requiere un menor tiempo de extracción. Por ejemplo, la extracción asistida con ultrasonido (UAE), donde las ondas de alta frecuencia crean burbujas que produce un efecto mecánico y térmico en las células vegetales, aumentando la permeabilidad de la membrana y liberando los metabolitos de interés, como saponinas o polifenoles (34). Otro método es la extracción asistida por microondas (MAE) que consiste en la utilización de radiación electromagnética con ondas entre los 300 MHz y 300 GHz con lo que aumenta la temperatura y energía molecular, lo que mejora el proceso de extracción y es usado generalmente para extractos naturales (35). Aunque estas metodologías son de gran utilidad, presentan ciertos inconvenientes para la extracción de saponinas, más que todo al momento de escalarlo a nivel industrial. La falta de uniformidad de ultrasonido en todo el solvente en UAE hace limitado su escalabilidad, llegando a un máximo de 50 L en plantas piloto, mientras que MAE requiere un alto consumo energético, además de su difícil control térmico a gran escala (36).

1.3 Cavitación hidrodinámica como método de extracción de saponina

La cavitación hidrodinámica es el proceso de formación y colapso de burbujas que se producen en un intervalo pequeño de tiempo cuando un líquido fluye a través de una

constricción, variando la presión del líquido y liberando así grandes cantidades de energía cinética. Este cambio de presión se produce con una bomba que dirige el agua hacia la constricción, haciendo que la presión disminuya, el líquido se evapore y se formen las burbujas que crecen hasta alcanzar su tamaño crítico y colapsan cuando el líquido sale de la zona de constricción y se recupera la presión inicial (37,38). El colapso de estas burbujas genera condiciones extremas de temperatura, alcanzando los 5000 K, presiones de 1000 bar y generación de radicales hidroxilos y esto puede fragmentar moléculas complejas y mejorar reacciones químicas, útil para la extracción de compuestos bioactivos (39). Entre las aplicaciones más destacadas de la cavitación hidrodinámica se reporta el tratamiento de aguas residuales para remover fármacos, colorantes, pesticidas, entre otros (40), en la industria alimentaria para reducir la carga microbiana en jugos o leche, mejorando su procesamiento (41) y en la biorrefinería para la obtención de productos de interés, como la laminarina, alginato de sodio y manitol de algas, destacando su bajo consumo energético y facilidad de escalar para procesos industriales (42).

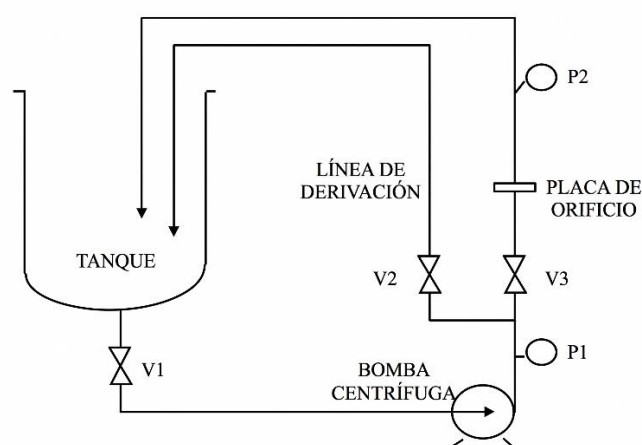


Figura 3. Representación gráfica de un cavitador hidrodinámico (43).

1.4 Fenólicos en residuos de quinua

Los fenólicos son compuestos que se encuentran en la mayoría de las plantas como metabolitos secundarios en diferente concentración, cuya estructura química se caracteriza por uno o más grupos hidróxilos unidos a un anillo aromáticos (44). Representan el segundo compuesto orgánico más abundante del reino vegetal y tienen diferentes propiedades que ayudan a la planta la protección de la radiación UV, patógenos, estrés abiótico entre otros (45). Los principales grupos de los fenoles incluyen los ácidos

fenólicos, estilbenos, lignanos, taninas y flavonoides y dependiendo de su estructura, tienen diferentes propiedades como anticancerígena, antiviral, antimicrobiano, antiinflamatorio y efectos hipoglucémicos e hipolipemiantes (46,47).

1.5 Hidrólisis de la fracción carbohidrato en residuos de quinua

La hidrólisis es una reacción química en la que una molécula de agua puede convertir compuestos complejos y generalmente sin utilidad, polisacáridos como celulosa y hemicelulosa, en compuestos más sencillos y útiles, como azúcares sencillos fermentables. Esta reacción puede ser catalizada por ácidos, bases o enzimas, donde también una elevada presión y temperatura pueden modificar las propiedades fisicoquímicas del agua y así, promover la ruptura de los enlaces químicos de los compuestos complejos (48).

1.5.1 Hidrólisis ácida

Involucra la utilización de ácidos, comúnmente ácido clorhídrico y sulfúrico, concentrado o diluido para catalizar la ruptura de los enlaces en compuestos orgánicos. Generalmente es usado en el tratamiento de residuos lignocelulósicos y sintetizarlos en azúcares simples; por ejemplos, hemicelulosa en pentosas y la celulosa en hexosas (49)

1.5.2 Hidrólisis alcalina

Es un proceso químico donde un compuesto orgánico se descompone en un medio básico, como hidróxido de sodio o potasio, lo que facilita la ruptura de enlaces químicos, por ejemplo, los enlaces ésteres y enlaces de la lignina presente en residuos agroindustriales (50), así como también puede ser utilizada para el tratamiento de residuos de polietileno tereftalato (PET), convirtiéndolo en ácido tereftálico, usado como materia prima para la elaboración de nuevos polímeros (51).

1.5.3 Hidrólisis enzimática

En este tipo de hidrólisis, se utilizan diferentes enzimas, generalmente celulasas, hemicelulasas o amilasas, para la ruptura de enlaces químicos. Al utilizar enzimas, presenta más ventajas que los otros tipos de hidrólisis como una mayor selectividad, al romper enlaces específicos y, por ende, una menor formación de inhibidores, como también un menor impacto ambiental, al disminuir el uso de reactivos químicos (52). Puede ser usado en la generación de bioetanol a partir de residuos agroindustriales, lo que reduciría la emisión de gases como dióxido de carbono u óxido de nitrógeno, contribuyendo con la mitigación del calentamiento global (53). Los residuos alimentarios, como cáscaras de diferentes vegetales, pueden ser usados como fuente de azúcares

reductores utilizando diferentes enzimas como α -amilasas y glucoamilasas obteniéndose entre 60 y 200 g/L de azúcares reductores, compuestos principalmente por glucosa (54,55).

1.5.4 Hidrólisis térmica

También llamado hidrotermólisis, es un tratamiento eficiente debido a que no es necesario de productos químicos corrosivos, evitando así procesos complejos como la separación y recuperación del solvente, lo que la hace un método ecoamigable ya que reduce los efectos corrosivos y la manipulación de la operación (6,56). Para esta metodología, es necesario un reactor que pueda soportar temperaturas y presiones elevadas (entre 150-300 °C y 0-60 bar aproximadamente) lo que aumentaría el gasto energético, pero la duración del proceso puede variar entre 2 y 40 minutos, compensando el uso energético (57). Cuando la temperatura del agua incrementa también lo hace su constante de ionización a 10^{-11} , debilitando sus enlaces puentes de hidrógeno, rompiendo los enlaces covalentes y aumentando la cantidad de los iones hidronios (H_3O^+) y de los iones hidróxido (OH^-), teniendo así la función de autocatálisis ácido-base (58). Dependiendo del estado del agua, se puede clasificar a la hidrotermólisis en dos: la explosión de vapor y el tratamiento con agua líquida caliente o auto hidrólisis. En la explosión de vapor, la biomasa es sometida a vapor a altas temperaturas (160-280 °C), a alta presión (7-48 bar), en un tiempo entre 10 y 30 minutos para luego liberar la presión de manera abrupta. Estos parámetros son considerados claves en la explosión de vapor (59). La auto hidrólisis es un procedimiento donde se altera la estructura química debido a la ionización del agua, que actúa como único reactivo, a alta temperatura donde se liberan los iones hidrógeno y presentan ventajas, por ejemplo, sus reacciones son más uniformes, fáciles de controlar y de escalar a nivel industrial (60,61).

La utilización de ácidos inorgánicos, como ácido clorhídrico o sulfúrico, en conjunto con la hidrólisis térmica puede ayudar a aumentar la ruptura de enlaces y liberar los azúcares para poder ser utilizados como fuente de carbono en fermentaciones. Sin embargo, estos podrían generar inhibidores, además de incrementar el costo de producción, por lo que el uso de ácidos orgánicos débiles ha demostrado tener un alto rendimiento en la producción de azúcares fermentables (62). El ácido cítrico es un ácido orgánico débil más producidos a nivel mundial, con una toxicidad baja por lo que es utilizado en varias aplicaciones en industrias alimentarias, farmacéuticas y químicas (63). Al ser un ácido débil, puede usarse en la hidrólisis térmica para generar tanto monosacáridos como oligosacáridos debido a

que tiene la capacidad de romper enlaces glucosídicos, éster y otros enlaces complejos, además de que también es un intermediario que se forma en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, por lo que no inhibiría el metabolismo de los microorganismos usados para la fermentación (64). Algunos residuos agroindustriales, como la mazorca del maíz, pueden ser la fuente de azúcares fermentables obtenidos a partir de procesos hidrotérmicos, obteniéndose principalmente xilosa y arabinosa a una concentración de 103.49 y 26.75 mg/g respectivamente (65). A partir de residuos agroindustriales, como bagazos, se obtienen azúcares fermentables, principalmente glucosa, xilosa, arabinosa y celubiosa, considerando el tiempo y la temperatura como los principales parámetros (66).

1.6 Inhibidores generados en procesos hidrotérmicos

Dependiendo del pretratamiento y la biomasa utilizada, se pueden generar compuestos inhibidores que pueden impedir el crecimiento de microorganismos o funciones enzimáticas en procesos anaeróbicos y aeróbicos (67). Comparado con otros pretratamientos, la hidrólisis térmica es una técnica ecoamigable al solo utilizar como solvente agua a alta temperatura; sin embargo, puede generar o liberar compuestos inhibitorios como ácido acético, HMF y fenólicos y degradación parcial del azúcar, generando subproductos como furfural y oligosacáridos (68). Furfural y HMF se pueden sintetizar a partir de pentosa o hexosas respectivamente, las cuales son obtenidas de la hemicelulosa y celulosa de residuos agroindustriales como el bagazo de la caña de azúcar, cáscaras de arroz, paja de trigo, entre otros (69,70). Estos inhibidores pueden atravesar la membrana celular, lo que provoca un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), daño en el ADN, fragmentación de mitocondrias e inhibición de enzimas responsables de la vía glucolítica (71). Algunos microorganismos del género *Clostridium* son inhibidos cuando la concentración de furfural supera la concentración de 1 g/L y en el caso de levaduras, como *Pichia stipitis*, el furfural inhibe más el crecimiento en comparación con ácido acético y HMF, reduciendo el rendimiento en un 59% de xilitol en concentraciones de 500 mg/L y concentraciones mayores a 850 mg/L inhibe completamente el crecimiento de la levadura (72,73).

1.7 Remoción de inhibidores

1.7.1 Resina macroporosa

Se define como resina a la unión de unidades monoméricas que forman estructuras complejas conectadas internamente por un monómero con característica bifuncional, lo que les confiere una forma esférica capaz de unirse a diferentes compuestos presentes en

soluciones mediante fuerzas de van der Waals o interacciones π - π (74). Las resinas son ampliamente utilizadas para la purificación de diferentes compuestos bioactivos como isoflavonas, polifenoles, antocianinas, saponinas, entre otros, debido a que son económicas, tienen una gran eficiencia y puede reutilizarse una vez terminado el proceso (75,76). La resina adsorbe el compuesto bioactivo y se desorbe con diferentes diluyentes, generalmente etanol, a diferentes concentraciones hasta recuperar el compuesto bioactivo separado y purificado (77). El furfural puede ser removido por resinas (PC-4) con una capacidad de adsorción de 40.22 mg/g y puede desorberse obteniéndose una tasa promedio de 97.86% (78). Otra resina, la XAD-761 puede remover 53.4 mg de HMF por g de resina, mientras que remueve solo 3.2 mg de glucosa, demostrando que las resinas macroporosas pueden remover inhibidores sin disminuir la concentración de azúcares fermentables (79).



Figura 4. Resina macroporosa.

1.8 Fermentación de carbohidratos presentes en hidrolizados

La fermentación es un proceso bioquímico que puede darse en condiciones tanto anaeróbicas como aeróbicas en el cual los compuestos orgánicos de una solución son degradados por rutas metabólicas de diferentes microorganismos, modificando químicamente el sustrato para la formación u obtención de un producto final (80). Este proceso es de alta utilidad para la generación de productos de alto valor comercial en industrias, destacando importantes sectores como alimentario y farmacéutico, por ejemplo, la producción de goma gellan a partir de *Sphingomonas paucimobilis*, usado como agente gelificante o estabilizante de alimentos (81), ácido glucónico a partir de *Aspergillus niger* para industrias textiles y médicas (82), polisacáridos a partir de *Ganoderma lucidum* que

tienen propiedades medicas destacables, como la actuar como prebiótico para proteger y fortalecer el microbiota intestinal o modular respuestas inmunológicas, entre otros (83). En el caso de *Aureobasidium pullulans*, los hidrolizado de residuos lignocelulósicos, como cascarilla de arroz, paja, bagazo de yuca, residuos de papa y de maíz pueden ser utilizados como fuentes de azúcares fermentables al liberar oligosacáridos y obtener glucosa, xilosa o arabinosa (84).

1.8.1 Sistemas de cultivo

Según el sistema de cultivo que se utilice, se puede clasificar en tres tipos de fermentación: fermentación por lotes (Batch), en el cual el microorganismo se inocula en un medio de cultivo y se cierra el sistema, lo que favorece la mayor recuperación del producto por lo que es considerada la más común; fermentación por lote alimentado (Fed-Batch), que consiste en añadir medio de cultivo y mantener los microorganismos en su fase exponencial y fermentación continua en el cual se aumenta y se retira el medio de cultivo de manera constante, contribuyendo con la producción y estabilidad del microorganismo utilizado (85).

1.8.2 Estado del sustrato

Existen dos tipos de fermentación según el sustrato: La fermentación líquida sumergida (SLF) y la fermentación en estado sólido (SSF). La SLF consiste en utilizar medio de cultivo líquido preparado específicamente con los nutrientes necesarios (carbón, nitrógeno, sales), y parámetros (pH, temperatura, presión) para el desarrollo de los microorganismos, fácilmente escalables, útiles en industrias como farmacéuticas y bebidas alcohólicas (86) mientras que la SSF es el crecimiento de biomasa en un sustrato sólido, generalmente residuos agroindustriales (salvado de trigo, bagazo de caña de azúcar, tallos de quinua, entre otros) que presentan baja concentración de líquidos y humedad, donde la biomasa solo utiliza estos residuos como fuente de alimento para su crecimiento, utilizada ampliamente en procesos relacionadas a biorremediación (87).

1.9 *Aureobasidium pullulans*

Aureobasidium es un hongo con compartimiento de levadura cuyo género incluye más de 50 taxones, entre especies y variedades, donde los más estudiados son *A. pullulans*, *A. melanogenum*, *A. iranimum*, entre otros, que se distribuyen ampliamente en diferentes ambientes, como suelos forestales, agua tanto dulce como salina y en la superficie de frutos u hojas (88). Respecto a sus principales aplicaciones, puede ser utilizado en la agricultura

como un biocontrolador de frutas y hortalizas; en el ámbito industrial, se puede usar sus polímeros en la elaboración de productos farmacéuticos, como el desarrollo de cosméticos, además de la síntesis de diferentes enzimas como amilasas o lipasas, útiles en industrias relacionadas al sector textil o alimentario; y también como antimicrobiano debido a metabolitos secundarios como el poli β -L-málico (PMA) usado como agentes anticancerígenos y biosurfactante (89). En el caso de *A. pullulans*, al inicio sus colonias varían entre colores claros como amarillo o rosado, pero conforme va creciendo, empieza a sintetizar melanina, tornando sus colonias a un color oscuro como mecanismo de defensa, cuya intensidad se puede ver afectada por estrés, limitación de nutrientes, cambios de pH, entre otros (90).



Figura 5. *A. pullulans*.

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *A. pullulans* (91).

Nivel Taxonómico	Clasificación
Dominio	Eukaryota
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Dothideomycetes
Orden	<i>Dothideales</i>
Familia	<i>Sacrotheciaceae</i>
Género	<i>Aureobasidium</i>
Especie	<i>Aureobasidium pullulans</i>

1.9.1 Pululano

El pululano es el principal exopolisacárido producido por *A. pullulans*. Fue descubierto por R. Bauer en 1938 y se define como un polímero soluble en agua parecido a la goma xantana o glucano formado por la polimerización de unidades de maltotriosa (tres moléculas de glucosa unidas) por medio de enlaces glucosídicos α -1.4 y α -1.6 (92). Su fórmula molecular es $(C_6H_{10}O_5)_n$, su peso molecular es aproximadamente de 4.5×10^5 Dalton y es insoluble en solventes orgánicos como dimetilsulfóxido, formamida y etanol (93).

1.9.2 Producción del pululano

La síntesis de pululano empieza con la formación de uridina disfosfato glucosa (UDP-glucosa), un precursor del pululano, obtenido por la enzima uridina 5 difosfato glucosa pirofosforilasa (UDPG-pirofosforilasa) a partir de glucosa 1 fosfato. El proceso sigue con la síntesis de estructuras ligadas a lípidos mediante residuos de D-glucosa que reaccionarán con grupos isomaltosilo, produciendo monómeros de piranosilo o isopanosilo que se polimerizan para sintetizar cadenas de pululano (94). La producción de pululano se realiza por medio de la fermentación microbiana donde parámetros como la composición del medio de cultivo, pH, temperatura y disponibilidad del oxígeno son claves para la fermentación (95). Algunos residuos lignocelulósicos que se pueden utilizar para la producción de pululano pueden ser hidrolizado de paja y la mazorca de maíz, obteniéndose rendimientos de 0.33 g/L y 0.32 g/L respectivamente y una producción de 19.45 g/L (96) y el orujo de la uva obtenido como residuo en la elaboración de vino, obteniéndose 22.3 g/L de pululano (97).

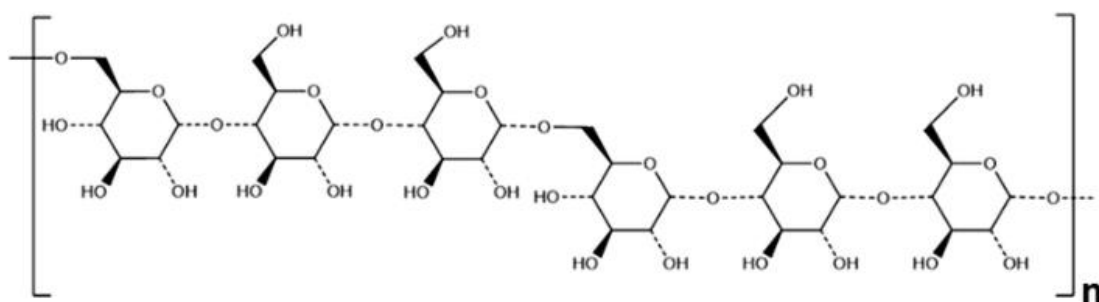


Figura 6. Estructura del pululano (89).

1.9.3 Aplicaciones del pululano

El pululano puede ser usado en diferentes industrias como la alimentaria, donde puede ser usado como aditivo para empaques biodegradables o como películas de recubrimiento que previenen la oxidación de frutas, mantienen la calidad y prolongan la conservación de los alimentos, además de ser utilizado con compuestos antimicrobianos o nanopartículas que brinda protección al deterioro ambiental y microbiológico (98); en la industria biofarmacéutica, como componente en la fabricación de cápsulas para los sistemas de liberación controlada de fármacos, mejorando la biodisponibilidad y eficacia terapéutica de los principios activos (99). Asimismo, las biopelículas elaboradas a partir de pululano presentan estabilidad térmica y resistencia, facilitando su manipulación y almacenamiento, además de enmascarar sabores desagradables de medicamentos, mejorando su aceptación y uso en pacientes (100). En la industria cosmética es utilizado para la formulación de cremas debido a su estabilidad mecánica, contribuyendo con la retención de humedad y mejorando la apariencia de la piel, además del desarrollo de hidrogeles y nanocompuestos que junto con otros compuestos activos como antioxidantes, previenen el envejecimiento (95). En el tratamiento de agua para procesos de filtración y adsorción debido a su capacidad de formación de redes estables y que puede servir como alternativa para polímeros derivados de petróleo o metales como el Cu^{+2} , Ni^{+2} y Co^{+2} de agua residuales industriales (101) y en el ambiente agrícola, nanopolímeros a partir de pululano pueden emplearse como sistema de liberación controlado de insumos agrícolas, como fertilizantes o biopesticidas. Asimismo, la obtención del pululano a partir de residuos agroindustriales como fuente de carbono para la fermentación de *A. pullulans* como suero de queso, cascarilla de arroz, melazas de la caña de azúcar, entre otros, contribuye con el desarrollo de estrategias agrícolas para la economía circular (102).

1.10 Métodos de caracterización

1.10.1 FTIR

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica analítica que estudia la interacción entre una muestra y radiación electromagnética, midiendo las absorbancias de enlaces químicos dando como resultado un espectro donde cada enlace tiene una huella espectral única, lo que permite medir cambios espectrales que ocurren simultáneamente, cuantificando diferentes compuestos como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, identificando grupos funcionales y cambios estructurales (103,104). FTIR también

puede aplicarse para la cuantificación de compuestos primarios de polisacáridos, incluyendo xilosa, sulfatos y ácido glucurónico (105).

1.10.2 DSC

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica analítica utilizada para caracterizar las propiedades térmicas de diferentes compuestos como la variación de la entalpía, temperatura de transición y comportamiento de cristalización (106) La temperatura a la cual el compuesto cambia de un estado vítreo rígido a un estado más blando se denomina temperatura de transición vítrea (T_g), importante en la caracterización de biopolímeros debido a que esta transición afecta su estabilidad y sus propiedades mecánicas (107,108).

1.10.3 TGA

El análisis termogravimétrico (TGA) es una técnica que estudia el comportamiento térmico de un material, aplicando varios análisis como termodegradación, ignición, combustión, así como también análisis de procesos termoquímicos, pirólisis y gasificación (109). Estos cambios se estudian de acuerdo a la pérdida de peso con respecto al tiempo y a la temperatura y se ha estudiado con diferentes biomásas, como semillas de durazno o cáscara de plátano y en biopolímeros usados en el empaquetamiento de alimentos y relacionados a la salud, como sistemas de liberación de fármacos o biomateriales (110,111).

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Bioprocesos F-405 y el Laboratorio de Ciencias de los Materiales F-406 de la Universidad Católica de Santa María (UCSM) ubicada en Arequipa, Perú.

2.2 Materiales

2.2.1 Material biológico

La cepa de *A. pullulans* ATCC 42023 disponible en el Laboratorio de Bioprocesos de la UCSM fue utilizada en este estudio.

2.2.2 Reactivos químicos

- Ácido cítrico.
- Ácido clorhídrico.
- Cloruro de sodio.
- DNS (ácido-3,5-dinitrosalicílico).
- Etanol 96%.
- Extracto de levadura.
- Fosfato dipotásico.
- Glucosa.
- Hidróxido de Sodio.
- PDA (Potato dextrose agar).
- Sulfato de amonio.
- Sulfato de magnesio.

2.2.3 Materiales de laboratorio

- Bagueta.
- Beakers.
- Celdas de cuarzo.
- Crisoles.
- Espátula.
- Jeringa de 1, 5, 10 mL.
- Matraces de 100 y 250 mL.
- Pastilla magnética.

- Piceta.
- Pinzas.
- Tubos de ensayo.

2.2.4 Aparatos y equipos

- Agitador magnético Faithful 25 L.
- Biorreactor de mesa Bio-Tec-Pro-II (Sao Paulo, Brasil).
- Balanza analítica Ohaus Adventurer.
- Espectrofotómetro infrarrojo por transformada de Fourier Nicolet Summit.
- Espectrofotómetro UV-Visible Thermo Scientific Genesys 150.
- Estufa Binder Bin 12880.
- pH metro Horiba Laqua PH1500.
- Reactor Parr con agitación de 2 L.
- Sistema de purificación de agua Milli-Q Sq 2 series.
- UHPLC Thermo Scientific Vanquish.

Software

- Design Expert.
- Rstudio.

2.3 Métodos

2.3.1 Polvillo o residuos de quinua

El polvillo o residuos generados en la escarificación de la quinua fueron donados por una empresa procesadora de quinua ubicada en el departamento de Arequipa, Perú. El material presentó un contenido de humedad de 5%, carbohidratos de 47% (NTP 205.002, 1979), 7% de proteínas, 1.7% de grasas (NTP 205.006, 2018) y 10% de cenizas (NTP 205.004, 2017).



Figura 7. Polvillo inicial de residuos de quinua

2.3.2 Extracción de saponina de residuos de quinua

Se utilizó el sistema de cavitación conforme Florez et al (2026) que consta de una placa con orificio entre 1 y 2 mm utilizado como Venturi, bomba de una potencia de 4 HP, 2 tanques de circulación de 20 L y dispositivos adicionales para el control de presión y temperatura. Al inicio se empleó un tamiz de 40 μm para la eliminación de otros residuos, como tallos o piedras. El polvillo obtenido se disolvió en 20 L de etanol al 80% hasta obtener una concentración final de 66 g/L y después se depositaron en uno de los tanques de circulación para iniciar el proceso de cavitación, teniendo como parámetros la presión (9 bar) y el tiempo (25 minutos) a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se recuperó la muestra la fracción sólida, que fue secado en una estufa a 50 °C por 24 horas y almacenado a temperatura ambiente hasta su uso posterior. La fracción líquida fue destinada para otros fines.

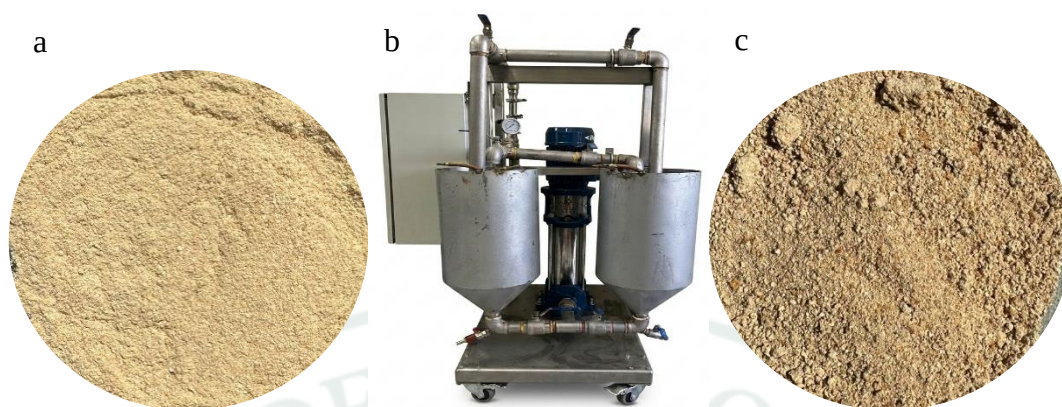


Figura 8. Polvo residual antes de la cavitación hidrodinámica (a), cavitador hidrodinámico (b) y residuo posterior a la extracción de saponina.

2.3.3 Hidrólisis térmica del residuo

Para la hidrólisis hidrotérmica del polvillo residual del proceso de extracción de saponina, se utilizó el reactor Parr de 2 L de acero inoxidable con sistema de agitación y presurizado (**Figura 9**). Inicialmente, se evaluó el efecto de la temperatura (140, 160, 180 y 200 °C), tiempo del proceso (5, 10 y 15 minutos) y la concentración de ácido cítrico (50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 y 250 mg/g). Todos los experimentos fueron realizados en triplicado con un volumen de trabajo de 500 mL. Posterior al proceso hidrotérmico, se determinó la concentración de azúcares reductores por el método DNS descrito por Miller (2002). Para el análisis, 1 mL de muestra (hidrolizado) se le agregó 1 mL del reactivo DNS, se llevó a 100 °C por 10 minutos, se agregó 3.5 mL de agua ultrapura y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro de UV visible Thermo Scientific Genesys 150 a 540 nm (112).

Con los resultados obtenidos, se estableció las variables con mayor influencia y los niveles con mejor desempeño. En una segunda etapa, para fines de optimización, se empleó un diseño central compuesto (CCD) con 11 corridas experimentales, evaluando variables como la concentración de ácido cítrico (mg/g) y el tiempo de proceso (minutos), considerando como variable de respuesta la concentración de azúcar reductores totales (ART). Posterior al tratamiento, el hidrolizado se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos y se filtró para recuperar el sobrenadante para su posterior análisis y almacenamiento en refrigeración hasta su uso.



Figura 9. Reactor Parr.

2.3.4 Remoción de compuestos inhibidores por adsorción

Se evaluó el desempeño de 9 resinas macroporosas con el fin de determinar su afinidad por la saponina. Se realizó pruebas exploratorias con saponina de pureza conocida. Previamente, las resinas comerciales adquiridos de Solarbio, China (NK-9, HDP-100, ADS-7, D-101, S-8, D-301, HDP-600, DM-130 y AB-8) se acondicionaron siguiendo la metodología descrita por Chen et al (2023). Brevemente, la resina se sumergió en etanol absoluto por 24 horas para después lavarla con agua destilada hasta eliminar el exceso de alcohol. La resina húmeda fue tratada con una solución de HCl 4% (p/p) y NaOH 4% (p/p) por 4 horas, después se lavó con agua y se secó a 60 °C por 6 horas (113). Una vez activadas las resinas, se pesó 10 gramos en diferentes matraces, se agregó 200 ml de una solución de saponina a 50 g/L y se agitó a 180 rpm por 24 horas. Transcurrido este tiempo, se descartó el líquido y se lavó la resina con etanol a diferentes concentraciones (20, 40, 60 y 80%) por 24 horas para cada concentración. Se secó por atomización y se calculó su pureza.

Para la concentración de saponinas, se utilizó el método descrito por Hiai et al (1975) que consistió en mezclar 0.5 mL de la muestra con 0.5 mL de vainillina al 8% y 1.5 mL de una solución etanol sulfúrico al 70%. Posteriormente, se incubó por 10 minutos en baño maría a 60 °C. Finalizado el tiempo, se retiró los tubos de ensayos y se enfriaron para después medir su absorbancia a 531 nm (114).

Para la determinación de polifenoles, se utilizó el método adaptado de Folin-Ciocalteu (1927) donde 0.5 mL de muestra se mezcló con 0.25 mL del reactivo Folin-Ciocalteu 1N y 1.250 mL de carbonato de sodio 10.75% y se incubó por 30 minutos en oscuridad para leer su absorbancia a 760 nm (115).

Con la pureza calculada, se determinó la resina con mejor desempeño en adsorción de saponina y compuestos fenólicos, donde las resinas ADS-7, AB-8 y HPD-100 fueron seleccionadas. En la siguiente etapa, se agregó 200 mL de hidrolizado a un matraz junto con la resina y se dejó en agitación por 24 horas. Posteriormente, se filtró para recuperar el hidrolizado y analizar la concentración de azúcares, saponinas y fenólicos.

Tabla 4. Comparación de las propiedades fisicoquímicas de las resinas macroporosas ADS-7, AB-8 y HPD-100

Resina	Polaridad	Área Superficial (m ² /g)	Tamaño de poro (nm)	Tamaño de partícula (mm)
ADS-7	Baja – moderada	650 - 700	8.5 - 9.0	0.3 - 1.2
AB-8	Débilmente polar	480 - 520	13 - 14	0.3 – 1.25
HPD-100	Fuertemente polar	≥ 100	25 - 30	0.3 – 1.25



Figura 10 Resinas macroporosas ADS-7 (a), AB-8 (b) y HPD-100 (c).

2.3.5 Análisis por HPLC

2.3.5.1 Determinación de la concentración de inhibidores

La concentración de inhibidores, furfural e HMF de las muestras obtenidas del tratamiento hidrotérmico, fueron removidas mediante una primera y segunda etapa de adsorción, muestras en las cuales las concentraciones de inhibidores fueron determinados

por HPLC mediante el uso de una columna de fase reversa C18 Sigma-Aldrich, de 250 mm x 2.1 mm de diámetro interno, 2.7 μm de tamaño de partícula y un detector de arreglo de diodos con fuente de luz ultravioleta (DAD). Las muestras fueron filtradas utilizando filtros de jeringa de tamaño de poro 0.22 μm para eliminar partículas en suspensión y se almacenaron en viales de 2.5 mL. La temperatura del horno fue 40 °C, la fase móvil fue una solución de metanol/agua 1:9 v/v a un caudal de 1 mL/min y presión de 600 psi. La cuantificación fue a una longitud de onda de 280 nm y el tiempo de corrida fue 20 minutos por muestra. Se preparó soluciones estándar de furfural (CAS 98-01-1) en concentraciones de 0.5 a 50.0 $\mu\text{g/mL}$ y de HMF (CAS 67-47-0) en concentraciones de 0.01 a 1.0 g/L.

2.3.5.2 Determinación de la concentración de azúcares

Los azúcares obtenidos en el proceso hidrotérmico fueron determinados usando la columna HyperRez XP Carbohydrate H⁺ Thermo Fisher de 300 mm x 7.7 mm de diámetro interno, 8 μm de tamaño de partícula. La fase móvil fue agua ultrapura tipo I desgasificada. Las muestras analizadas fueron filtradas utilizando filtros de jeringas de tamaño de poro de 0.22 μm y se almacenaron en viales de 2.5 mL. Los parámetros fueron 75 °C de temperatura del horno, caudal de 0.6 mL/min, presión de 200 psi, tiempo de corrida de 20 minutos y el detector de índice de refracción (RID) a 40 °C. Se preparó soluciones estándar de glucosa, xilosa, arabinosa y celobiosa en concentraciones de 0.5 a 5 g/L.



Figura 11. Equipo de HPLC.

2.3.6 Producción de pululano por *Aureobasidium pullulans*

2.3.6.1 Preparación del inóculo

La cepa utilizada fue *A. pullulans* ATCC 42023 disponible en el laboratorio de Bioprocesos - UCSM. Esta cepa fue cultivada en placas de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar) a 25 °C hasta alcanzar un crecimiento óptimo, donde las colonias se encuentren totalmente desarrolladas, abundante biomasa y sin signos de contaminación. Con estas colonias se inoculó en 50 mL de un medio de cultivo líquido compuesto de glucosa (20 g/L), sulfato de amonio (0.6 g/L), extracto de levadura (2.5 g/L), fosfato dipotásico (2 g/L), cloruro de sodio (1 g/L) y sulfato de magnesio (0.1 g/L) en matraces y se dejó en agitación por 48 horas a 28 °C.

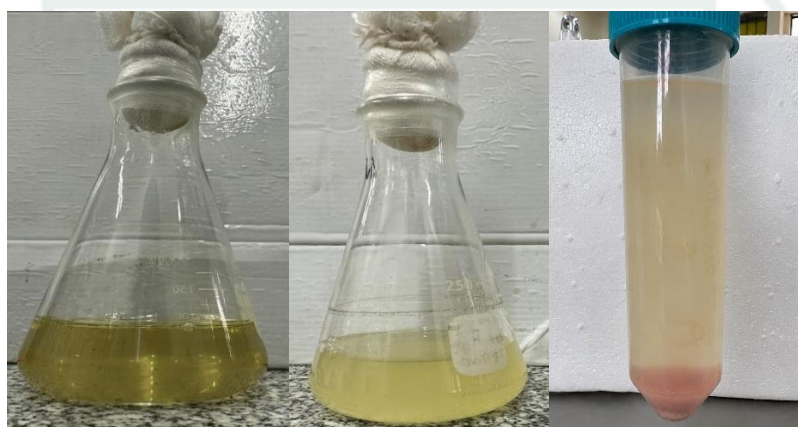


Figura 12. Inóculo de *A. pullulans*.

2.3.7 Fermentación en hidrolizado

Transcurridas las 48 horas, se recolectó el hongo por centrifugación para después lavar con agua destilada estéril, resuspenderlo y volver a centrifugar y así eliminar el excedente del medio de cultivo. Se utilizó el inóculo a una concentración inicial de 1 g/L en función del volumen total del medio de fermentación. El hidrolizado purificado y suplementado con sales anteriormente mencionadas fue utilizado como medio de fermentación. Se realizó las primeras pruebas en matraces de 100 mL con un volumen final de 50 mL, siempre con un medio convencional de fermentación como control (**Figura 13**). La fermentación final con las mejores condiciones se realizó en el biorreactor de tanque agitado Bio-Tec-Pro II (Tecnal, Brasil) Las condiciones de fermentación se establecieron en base de antecedentes bibliográficos, tomando en consideración la composición del medio de fermentación, pH,

temperatura, agitación y aireación (6,116) (**Figura 14**). Después de 96 horas de fermentación, se centrifugó para separar la biomasa y recuperar el sobrenadante al cual se le adicionó etanol frío en una proporción 1:3 v/v para precipitar el polímero que se recuperó y se secó en estufa a 40 °C por 48 horas para su análisis.



Figura 13. Fermentación en matraces.



Figura 14. Biorreactor de tanque agitado Bio-Tec-Pro II

2.4 Caracterización de pululano por FTIR

El polímero recuperado fue analizado por FTIR y los espectros fueron comparados con un pululano comercial de grado alimentario adquirido de la empresa Hayashibara Co. Ltd (Japón). Para el análisis, se utilizó bromuro de potasio (KBr) como soporte de la muestra debido a su estructura cristalina y es transparente a la luz infrarroja, lo que no interfiere al

momento de leer la absorbancia de la muestra (104). Se pesó 0.5 mg del polímero y se mezcló con 50 mg de KBr en un mortero de ágata, pulverizando ambos compuestos. La mezcla se transfirió a una prensa hidráulica donde se comprimió con una fuerza de 1.8 toneladas por 60 segundos para la obtención de una pastilla que fue analizada mediante FTIR para la obtención del espectro infrarrojo.



Figura 15. Equipo FTIR.

2.5 Análisis estadístico

Todos los ensayos de los cultivos se realizaron por triplicado. El diseño experimental se realizó en el software Design-Expert 12.0 en donde se utilizó la superficie de respuesta (Response Surface Methodology, RSM), usando un diseño central compuesto (CCD), con un valor axial de 1.414, obteniéndose 11 experimentos: 4 puntos factoriales, 4 puntos axiales y 3 puntos centrales. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple Tukey, con un valor $p < 0.05$. Las diferencias significativas entre cada tratamiento se indican mediante letras sobre cada valor determinado.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación de las condiciones óptimas de hidrólisis en un reactor Parr

Se evaluó el efecto de la temperatura de hidrólisis en un reactor Parr a fin de determinar la condición más idónea y obtener la mayor concentración de azúcares reductores totales (ART) y saponinas, expresado en g/L, comparando con un inicial que fue el polvillo cavitado sin tratamiento hidrotérmico, que tuvo una concentración inicial de 9.65 ± 0.71 g/L de saponinas y 2.30 ± 0.77 g/L de ART. Como se observa en la **Tabla 5**, a $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ la concentración de ART fue de 8.92 ± 0.46 g/L y la concentración de saponinas fue de 11.58 ± 0.63 g/L. La temperatura de $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ es una temperatura óptima para la liberación de azúcares reductores como lo reportó Sganzerla et al (2022) (117), en aquel estudio se utilizó un reactor simple a $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la obtención de azucares reductores a partir de bagazo de cerveza, consiguiendo un total 69.95 ± 8.24 mg/mL, en comparación con 80 y $130\text{ }^{\circ}\text{C}$, donde se obtuvo 4.76 ± 0.45 y 23.47 ± 5.24 mg/mL respectivamente. Por lo tanto, temperaturas de $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ permiten la hidrólisis del almidón en dextrinas y glucosa, además, fracciones de hemicelulosa pueden ser hidrolizados debido al rompimiento de enlaces β -1,4 liberando xilooligosacáridos (XOS), xilosa y arabinosa.

Tabla 5. Concentración de ART y saponinas totales (g/L) como efecto de la temperatura de hidrólisis ($^{\circ}\text{C}$).

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	[Saponinas] (g/L)	[ART] (g/L)
Inicial sin tratamiento	9.65 ± 0.71	2.30 ± 0.77
140	9.88 ± 0.47	6.77 ± 0.19
160	9.67 ± 0.29	7.51 ± 0.11
180	11.58 ± 0.63	8.92 ± 0.46
200	5.49 ± 0.2	5.63 ± 0.12

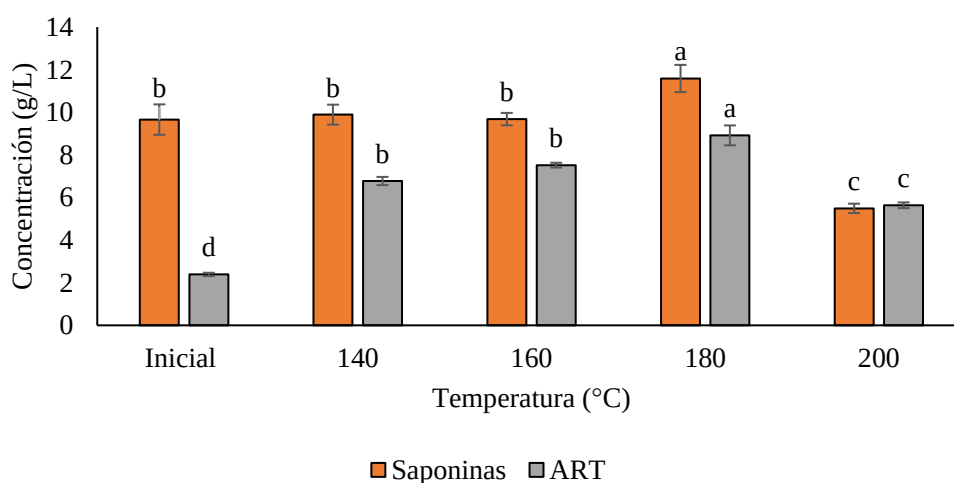


Figura 16. Concentración de ART (g/L) y saponinas (g/L) a diferentes temperaturas de hidrólisis. El inicial corresponde a la fracción líquida de la mezcla sin proceso térmico. Misma letras en la barra de saponinas o ART indican que no hay diferencias significativas conforme la prueba de Tukey a un nivel de significancia del 95%.

Al evaluar el tiempo, se observó que a los 10 minutos se obtiene la mayor concentración de ART, obteniendo 8.61 ± 0.52 g/L mientras que, con 5 y 15 minutos, se obtuvo 7.61 ± 0.43 g/L y 8.06 ± 0.33 g/L respectivamente. La temperatura (180 °C) y el tiempo (10 min) son parámetros fundamentales en la obtención de azúcares fermentables a partir de residuos agroindustriales, como bagazo de diferentes cultivos, llegando a obtener más del 85% de azúcares celulósicos por gramo de peso seco (118). En el estudio de Miranda et al (2025) se utilizó tallos de quinoa para la obtención de azúcares fermentables donde las condiciones óptimas de hidrólisis térmica catalizada con una solución de ácido cítrico fue 200 °C por 5 minutos, seguida de un proceso enzimático, obteniéndose entre 64 y 66 g/L de glucosa; sin embargo, la utilización de altas temperaturas puede contribuir a la formación de compuestos inhibidores, como HMF y furfural, además de utilizar un residuos agroindustrial del mismo cultivo pero de diferente composición biológica (119).

Tabla 6. Concentración de ART (g/L) respecto al tiempo de hidrólisis (minutos), una vez alcanzado los 180 °C en el reactor hidrotérmico.

Tiempo (minutos)	[ART] (g/L)
5	7.62 ± 0.43
10	8.61 ± 0.52
15	8.06 ± 0.33

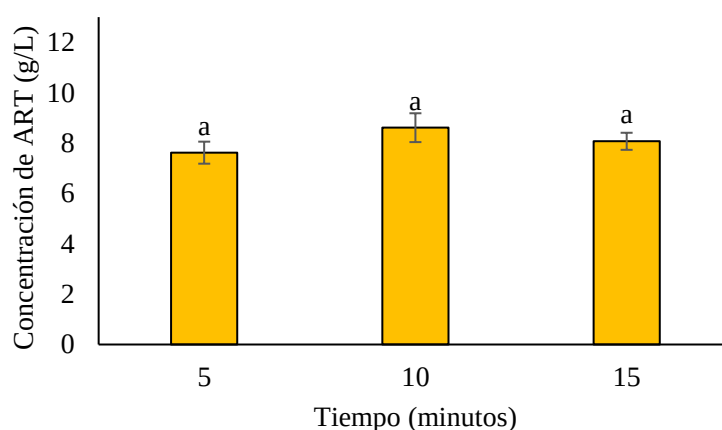


Figura 17. Concentración de ART (g/L) en diferentes tiempos de hidrólisis.

Se evaluó la adición de diferentes concentraciones de ácido cítrico junto al proceso hidrotérmico y de esta forma incrementar la concentración de ART. Aunque el agua a 180 °C ya genera un medio ligeramente ácido por la autoionización del agua y la liberación de ácido acético desde la hemicelulosa, la adición de ácido cítrico reduce aún más el pH y cataliza la hidrólisis ácida de los polisacáridos afectando principalmente el almidón en periodos cortos de proceso (120). Se utilizó concentración de ácido cítrico desde 50 hasta 250 mg/g. Como se observa en la **Figura 18**, a una concentración de 125 mg/g de ácido cítrico, la concentración de ART aumentó hasta 54.67 ± 0.47 g/L y a 175 mg/g disminuyó a 50.12 ± 0.41 g/L. Estos parámetros indican que el ácido cítrico puede ayudar con la recuperación de azúcares fermentables a partir de residuos agroindustriales de la quinua, como el tallo de la quinua o el polvillo obtenido por el proceso de escarificación (4). La adición de ácidos inorgánicos, como el ácido clorhídrico y ácido sulfúrico pueden aumentar la concentración de azúcar, pero, al ser ácidos fuertes, generaran inhibidores, como

furfurales o compuestos fenólicos, que pueden inhibir el crecimiento de microorganismos. La utilización de ácidos orgánicos, como el ácido maleico, ácido oxálico, ácido cítrico, entre otros, presentan un alto rendimiento para la obtención de azúcares fermentables y disminuyen la síntesis de inhibidores (121). En el estudio de Carrasco et al (2021) se utilizó tallos de quinua para evaluar la eficacia del pretratamiento de hidrólisis térmica con ácido sulfúrico como catalizador, demostrando que la utilización de este ácido a altas temperaturas (200-215 °C) degrada los azúcares junto con una mayor formación de compuestos inhibidores, con rendimientos de 3.3 g/100 g de furfural, 0.8 g/100 g de HMF y 3.9/100 g de ácido acético por lo que la selección de catalizador y temperatura son factores importantes para mitigar la concentración de inhibidores que pueden afectar el crecimiento de *A. pullulans* (122).

Tabla 7. Concentraciones de ART (g/L) como efecto de la adición de ácido cítrico (mg/g) como catalizador en un proceso hidrotérmico a 180 °C por 10 minutos.

Ácido cítrico (mg/g)	[ART] (g/L)
50	46.77 ± 1.11
75	48.32 ± 0.15
100	53.45 ± 0.39
125	54.67 ± 0.47
150	54.05 ± 1.01
175	50.12 ± 0.41
200	49.79 ± 0.77
250	47.25 ± 1.24

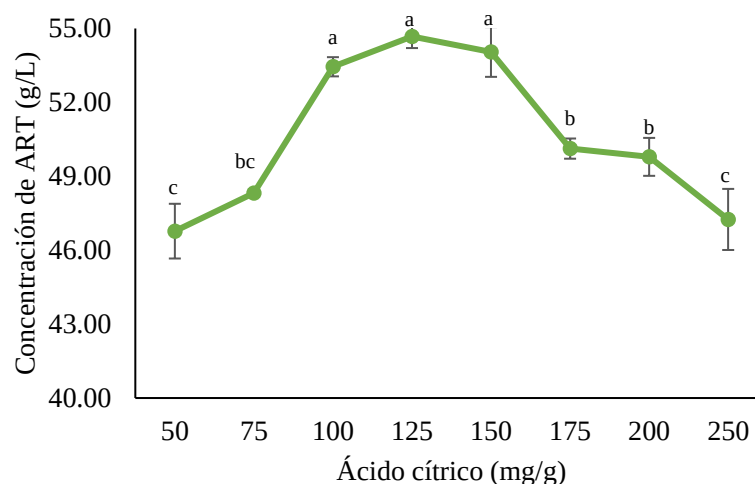


Figura 18. Concentración de ART (g/L) con diferentes concentraciones de ácido cítrico (mg/g).

3.2 Optimización del proceso hidrotérmico para la obtención de azúcares fermentables

Con los ensayos exploratorios, se obtuvieron parámetros importantes para el diseño experimental. Se realizaron 11 experimentos propuestos por el software Design Expert 12.0 para evaluar el efecto del tiempo de proceso hidrotérmico y la concentración de ácido cítrico, variables que más influyeron en la producción de azúcares fermentables, teniendo como variable de respuesta la concentración de ART. Con los valores obtenidos, se realizó el análisis estadístico ANOVA (**Tabla 8**) y se determinó la superficie de respuesta (**Figura 20**). Los valores promedio de concentración de ART varían entre 49 y 60 g/L y los mejores parámetros del proceso hidrotérmico fueron 150 mg/g de ácido cítrico y 5 minutos de tiempo de proceso, obteniéndose 59.91 g/L de ART.

Tabla 8. Efecto de las variables concentración de ácido cítrico y tiempo sobre la producción de ART.

N° de experimento	Ácido cítrico [mg/g]	Tiempo min	ART [g/L]
1	125	10	55.6
2	100	15	49.87
3	150	5	59.91
4	125	2.93	55.99
5	160.35	10	58.67
6	89.64	10	50.81
7	150	15	52.05
8	125	10	55.83
9	100	5	51.17
10	125	10	55.98
11	125	17.07	49.64

El modelo sugerido fue cuadrático, siendo confirmado por el análisis de varianza (ANOVA) al tener un valor p altamente significativo ($p < 0.001$). La prueba de falta de ajuste no fue significativa ($p = 0.1744$), validando la idoneidad del ajuste del modelo. El coeficiente de R^2 ajustado fue de 0.99 y el valor de R^2 predicho fue de 0.97 lo que indica una gran capacidad predictiva del diseño. El f -value fue de 201.7, validando que el modelo es significativo (**Tabla 9**) Por último, el coeficiente de variación fue 0.657%, mostrando una dispersión mínima de los datos experimentales respecto a la media.

Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) del modelo cuadrático para la concentración de azúcares.

Fuente	Suma de cuadrados	df	Promedio de cuadrados	Valor F	Valor P	
Modelo	127.74	5	25.55	201.7	< 0.0001	Significativo
A-Ácido Cítrico	60.66	1	60.66	478.91	< 0.0001	
B-Tiempo	41.13	1	41.13	324.68	< 0.0001	
AB	10.76	1	10.76	84.93	0.0003	
A²	2.5	1	2.5	19.75	0.0067	
B²	14.98	1	14.98	118.26	0.0001	
Residual	0.6333	5	0.1267			
Falta de ajuste	0.5574	3	0.1858	4.89	0.1744	No significativo
Error puro	0.076	2	0.038			
Total	128.38	10				

La ecuación del modelo responde a un modelo cuadrático y describe el impacto de las variables evaluadas en la producción de ART, donde A representa la concentración de ácido cítrico y B el tiempo del proceso.

$$[\text{Azúcar}] = 7.02033 + 0.507556A + 2.48947B - 0.013120AB - 0.001065A^2 - 0.065149B^2$$

La validez del modelo se confirma con los gráficos más significativos observados en la **Figura 19**. En la **Figura 19a**, se observa la probabilidad normal donde se ve una tendencia lineal, con algunos outliers pero cercanos al punto central, validando el supuesto de normalidad. En la **Figura 19b**, se observa el gráfico de residuales vs predichos donde se muestra una dispersión de los puntos sin un patrón en específico, indicando la existencia

de homogeneidad de varianzas (también llamado homocedasticidad). Esta homogeneidad o independencia de datos se valida con el gráfico residuales vs corrida (**Figura 19c**) donde se demuestra la ausencia de errores sistemáticos al momento de realizar los experimentos, aunque se pueden ver algunos puntos lejos de la línea central, no afectan la independencia de manera significativa. Por último, en el gráfico de valores predichos vs reales o experimentos realizados (**Figura 19d**) presenta una alineación de los valores en la tendencia central, concluyendo la precisión y alta capacidad predictora del modelo cuadrático.

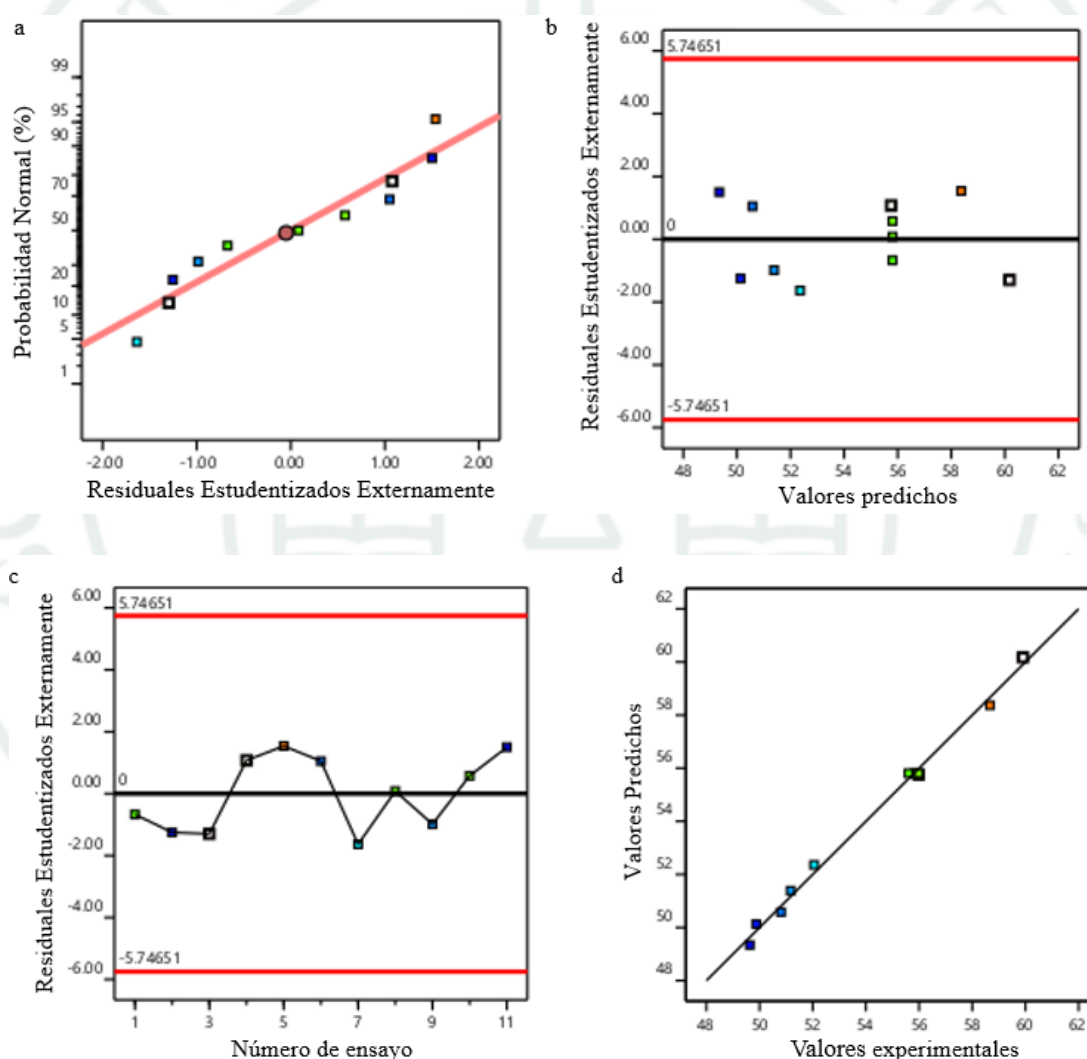


Figura 19. Representación gráfica de las variables respecto a la concentración de azúcar. A) Gráfico de normalidad de los residuales, B) Gráfico de residuales frente a valores predichos, C) Gráfico de residuales frente al orden de experimento y D) Gráfico de Valor.

3.3 Superficie de respuesta para la optimización del proceso hidrotérmico

En la **Figura 20** se observa la superficie de respuesta, de curvatura convexa pronunciada y la existencia de una región de máxima eficiencia para la obtención la mayor concentración de ART, donde es directamente proporcional al aumento de la concentración de ácido cítrico, con valores máximos iguales o superiores a 150 mg/g. Sin embargo, el tiempo tiene un efecto inverso, donde pasado los 10 minutos de hidrólisis, se ve una caída en la respuesta, lo que resulta favorable debido a que tiempos prolongados de hidrólisis no está directamente relacionado con una mejora en el rendimiento de la reacción, sino que incrementa la conversión y degradación de ART obtenidos, lo que conlleva a la formación de compuestos inhibidores, como furfural y HMF, y compuestos fenólicos que afectan a la fermentación, disminuyendo el rendimiento del microorganismo y siendo necesario procesos de detoxificación (123).

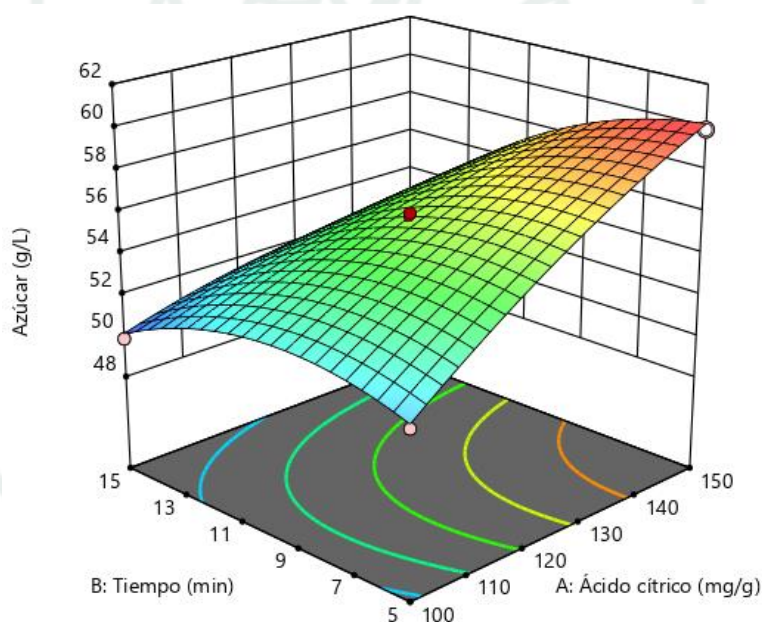


Figura 20. Superficie de respuesta de la interacción entre la concentración de ácido cítrico y tiempo para la obtención de ART.

La optimización numérica permitió identificar las mejores condiciones para maximizar la concentración de ART. El modelo predijo que la mayor concentración de ART fue de 59.91 g/L, con una concentración de ácido cítrico de 150 mg/g y 5 minutos de tiempo de proceso. Estas condiciones fueron validadas experimentalmente, obteniéndose un valor promedio

de 57.78 g/L de ART, confirmándose la validez del modelo. En la **Figura 21** se muestra una fotografía del hidrolizado obtenido en la condición optimizada, mostrándose un aspecto oscuro característico del proceso hidrotérmico.

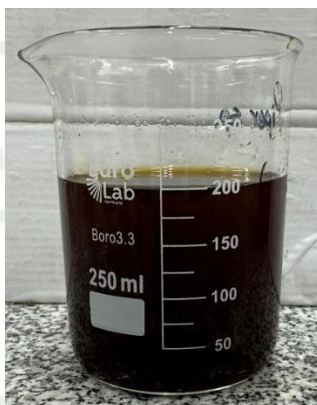


Figura 21. Fotografía del hidrolizado de polvillo de quinua posterior al proceso hidrotérmico.

3.4 Adsorción por resina

En la **Figura 22** se detalló la concentración de ART, fenólicos y saponinas del hidrolizado inicial y tratado con las resinas anteriormente mencionadas. Se evidenció una ligera disminución en la concentración de ART, donde la concentración del hidrolizado fue de 40.67 g/L y tras la adsorción se redujo a 36.34, 36.87 y 35.52 g/L con las resinas ADS-7, AB-8 y HPD-100, respectivamente. Respecto a los fenólicos, la concentración inicial fue de 12.60 g/L y después de la adsorción la concentración disminuyó a 9.35 g/L con ADS-7, 7.46 g/L con AB-8 y 8.29 con HPD-100. A su vez, la concentración de saponina se mantuvo constante, con una concentración inicial del hidrolizado de 4.97 g/L y después de la adsorción se obtuvieron los valores de 4.82, 4.52 y 4.61 g/L con las resinas ADS-7, AB-8 y HPD-100 respectivamente.

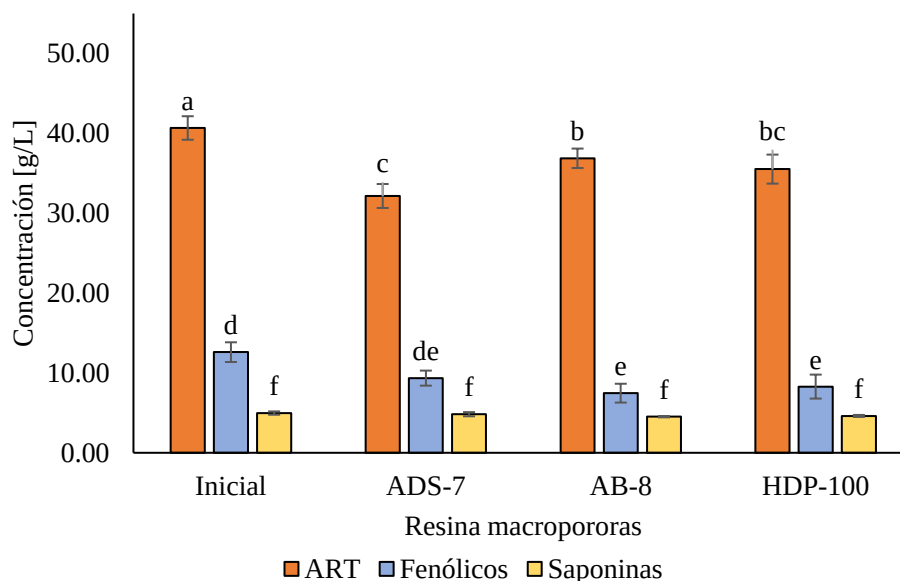


Figura 22. Concentración de ART, fenólicos y saponinas antes y después de la adsorción con diferentes resinas macroporosas.

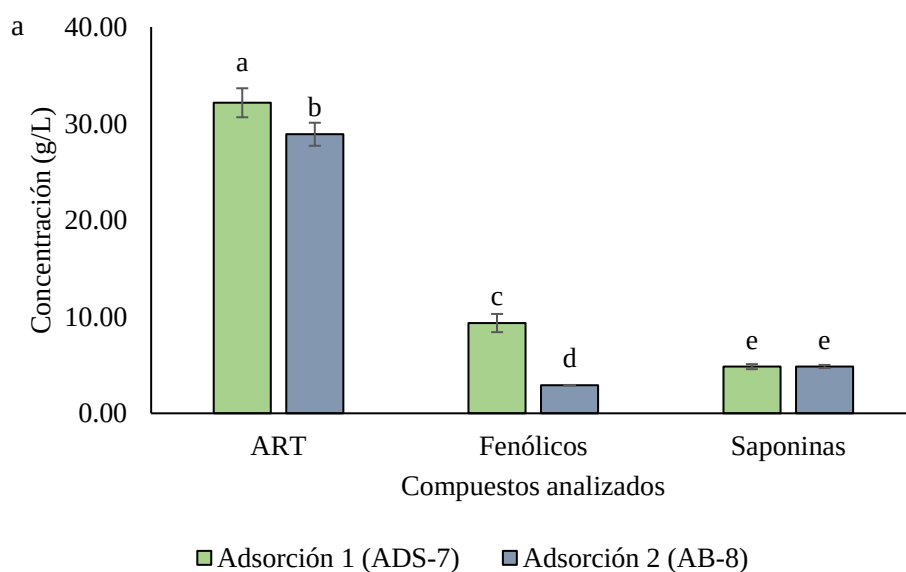
Los compuestos fenólicos pueden afectar el crecimiento y procesos de fermentación de algunos microorganismos. Fernández et al (2024) reportaron que los compuestos fenólicos pueden disminuir la productividad y afectar los procesos fermentativos de microorganismos, como *Saccharomyces cerevisiae*, donde se da una alteración en sus membranas celulares, inhibición del consumo de azúcares fermentables del medio e incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS), generando un ambiente intracelular que daña componentes del microorganismo (124). Del mismo modo, las saponinas pueden inhibir o ralentizar el crecimiento de microorganismos fermentadores. En el estudio de Chipkar et al (2022) se describió que las saponinas reducen el rendimiento de bioetanol de *S. cerevisiae* debido a la inhibición completa de su crecimiento, demostrando que removiendo los residuos de saponinas se restaura la eficiencia de la fermentación, llegando a alcanzar rendimientos entre el 80 y 90% (125). Para disminuir la concentración de compuestos fenólicos y saponinas, se realizó una segunda adsorción con la resina AB-8 debido a su afinidad por compuestos fenólicos y saponinas (3).



Figura 23. Adsorción con resinas ADS-7 (izquierda), AB-8 (centro) y HPD-100 (derecha).

3.4.1.1 Segunda adsorción con resina AB-8

En la **Figura 24** se muestra las concentraciones de ART, fenólicos y saponinas (g/L) después de la segunda adsorción con AB-8. La adsorción que mostró mayor eficacia para la remoción de fenólicos y saponinas fue utilizando AB-8/AB-8. La concentración de fenólicos disminuyó hasta 3.05 g/L, además, la concentración de saponinas disminuyó a 2.78 g/L (**Figura 24a**). En el caso de la adsorción ADS-7/AB-8 también se observó una disminución en la concentración de fenólicos, alcanzando una concentración final de 2.91 g/L. Sin embargo, la concentración de saponinas no disminuyó, con una concentración final de 4.85 g/L (**Figura 24b**). Al igual que las adsorciones anteriormente mencionadas, la adsorción HPD-100/AB-8 disminuyó la concentración de fenólicos a 2.86 g/L mientras que la concentración final de saponinas fue de 3.94 g/L (**Figura 24c**).



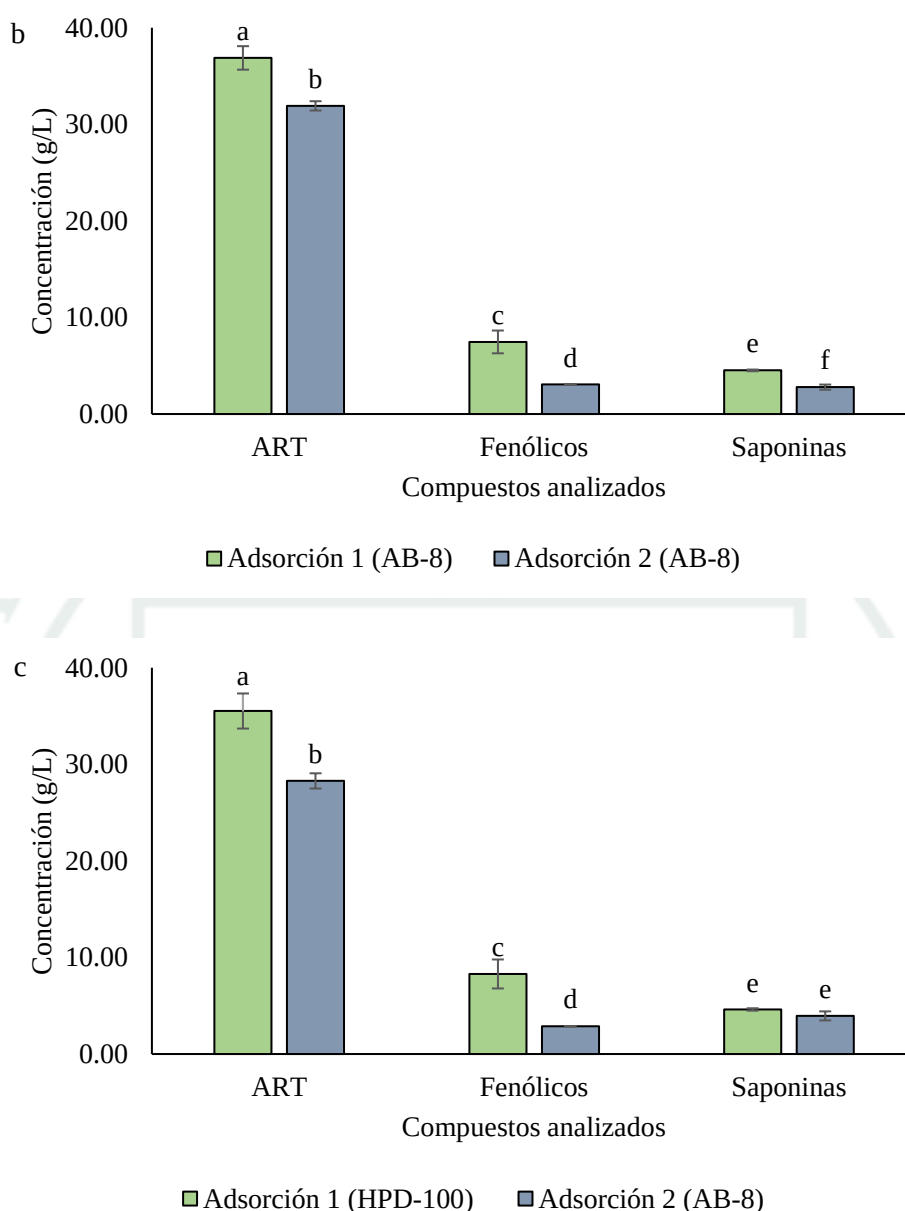
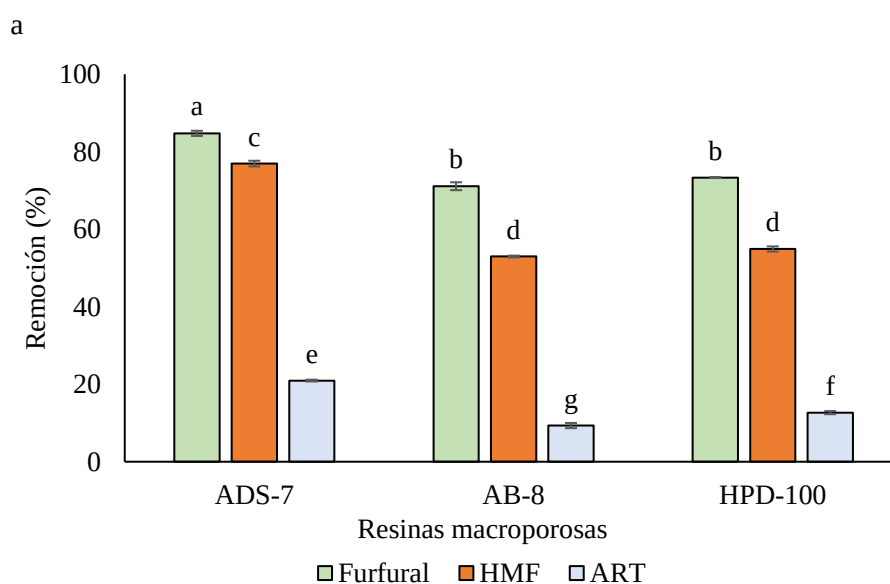


Figura 24. Concentraciones de ART, fenólicos y saponinas después de segunda adsorción con AB-8 en ADS-7 (a), AB-8 (b) y HPD-100 (c)

3.5 Análisis de inhibidores por HPLC

La concentración de furfural y HMF disminuyó en cada etapa de adsorción. La concentración inicial de furfural y HMF en el hidrolizado fue 0.91 y 1.46 mg/mL respectivamente. Cuando finalizó la primera adsorción, la concentración de ambos inhibidores disminuyó hasta 0.14 mg/mL de furfural y 0.34 mg/L de HMF con la resina ADS-7, 0.26 mg/mL de furfural y 0.69 mg/mL de HMF con AB-8 y 0.24 mg/mL de furfural

y 0.66 mg/mL de HMF con HPD-100. En el caso de la segunda adsorción, la concentración final de furfural y HMF cuando se utilizó las resinas ADS-7/AB-8 fue 0.04 y 0.31 mg/mL, con AB-8/AB-8 fue 0.01 y 0.24 mg/mL y con HPD-100/AB-8 fue 0.03 y 0.29 respectivamente. Sin embargo, como las resinas también adsorben ART, es un factor crítico en la selección del sistema de resinas para la fermentación. En la **Figura 25** se observa el rendimiento de remoción de furfural, HMF y ART. En la primera adsorción (**Figura 25a**) el mejor desempeño para la remoción de inhibidores fue con la resina ADS-7, con un porcentaje de remoción de 84.73% de furfural y 76.94% de HMF. No obstante, también adsorbió ART, con un porcentaje de remoción de 20.93%. Con la resina AB-8, el porcentaje de remoción de furfural, HMF y ART fue 71.10, 52.96 y 9.33%, mientras que con HPD-100 fue 73.33, 54.90 y 12.67% respectivamente. En la segunda adsorción (**Figura 25b**) el porcentaje de remoción de furfural, HMF y ART fue de 70.67, 6.68 y 10.14% en caso de ADS-7/AB-8; 93.01, 65.58 y 13.46% en AB-8/AB-8 y con HPD-100/AB-8 fue 88.82, 55.88 y 20.38% respecto a la primera adsorción, lo que da un porcentaje de remoción final de 95.02% de furfural, 78.47% de HMF y 28.95% de ART con ADS-7/AB-8; con AB-8/AB-8, 97.98, 83.81 y 21.54% de furfural, HMF y ART y 97.02% de furfural, 80.10% de HMF y 30.47% de ART (**Figura 25c**), por lo que se determinó que el mejor rendimiento de remoción de inhibidores y menor remoción de ART se obtuvo con las resinas AB-8/AB-8.



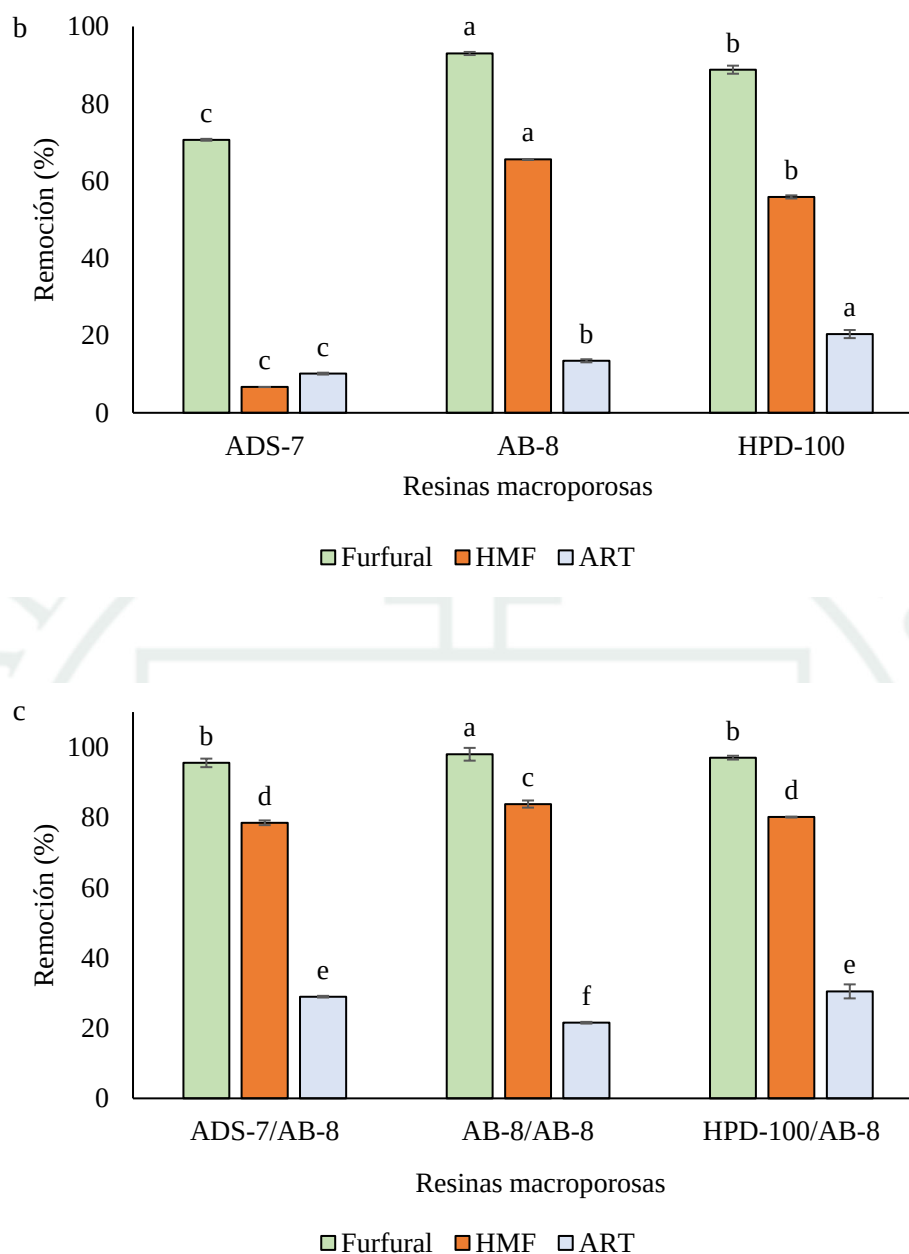


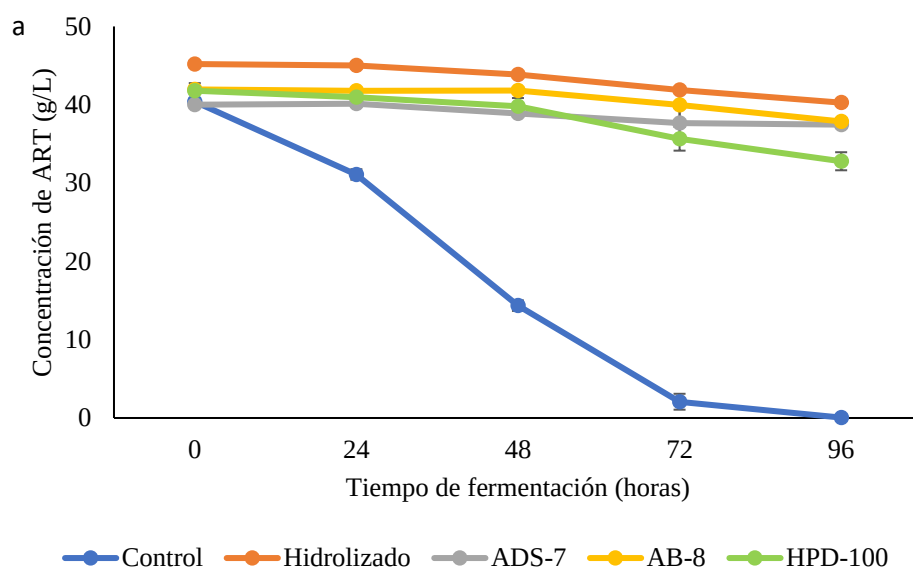
Figura 25. Porcentaje de remoción de furfural, HMF y ART utilizando diferentes resinas macroporosas.

3.6 Fermentación con *Aureobasidium pullulans*

3.6.1.1 Fermentación con el medio obtenido de la primera etapa de filtración

Se utilizó el hidrolizado obtenido del reactor PARR y el detoxificado por las resinas ADS-7, AB-8 y HPD-100 como medio de fermentación. Mediante análisis gravimétrico, se determinó una biomasa inicial de *A. pullulans* de 51.9 mg. En la **Figura 26** se resume la concentración de ART, fenólicos y saponinas del control, hidrolizado y las resinas ADS-7,

AB-8 y HPD-100 en relación al tiempo de fermentación. En el caso del control, la concentración inicial de los compuestos analizados fue de 40.39 g/L en el caso de ART, 1.18 g/L de fenólicos y 1.50 g/L de saponinas. Transcurridas las 96 horas, la concentración de ART disminuyó llegando próximo a cero, mientras que fenólicos y saponinas se mantuvieron estables (1.33 y 1.38 g/L respectivamente) y la biomasa final fue 249.1 mg. Sin embargo, en el caso del hidrolizado y las resinas, la biomasa se mantuvo constante, con un valor final de 53.1 mg en el hidrolizado y de 49.2, 52.5 y 56.1 mg con las resinas ADS-7, AB-8 y HPD-100 respectivamente. En ADS-7, las concentraciones iniciales de ART, fenólicos y saponinas fue 40.02, 7.19 y 4.98 g/L respectivamente, y las concentraciones finales fue de 37.46, 8.49 y 6.39 g/L. En AB-8 se repite este comportamiento, iniciando con 41.96 g/L de ART, 6.61 g/L de fenólicos y 5.37 g/L de saponinas, terminando con 37.87, 6.94 y 4.94 g/L. De la misma manera, con HPD-100, la concentración inicial fue de 41.79 g/L de ART, 7.89 g/L de fenólicos y 5.35 g/L de saponinas, mientras que al finalizar la fermentación se obtuvieron 32.78, 6.47 y 4.48 g/L respectivamente.



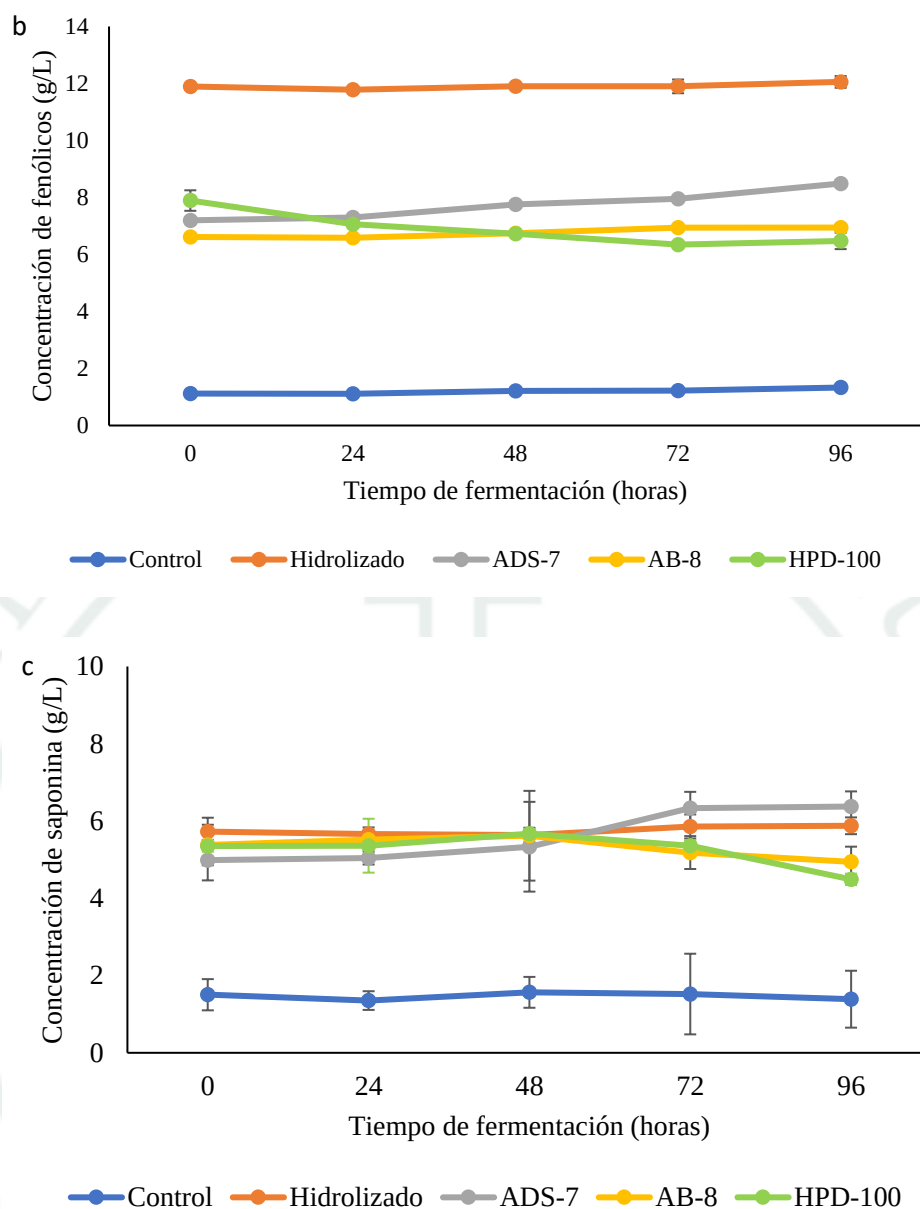


Figura 26. Cinética de la concentración de ART (a), fenólicos (b) y saponinas (c) durante el proceso de fermentación.

Las concentraciones elevadas de fenólicos y saponinas inhibieron el crecimiento de *A. pullulans*, además del bajo consumo de azúcares. Sin embargo, la biomasa se mantuvo constante. Canan et al (2018) evaluaron el impacto de diferentes compuestos fenólicos, como tirosol, hidrotirosol, luteolina y apigenina, en el rendimiento y crecimiento de *A. pullulans*, que mediante espectroscopía de infrarrojo medio (MID-IR), reportaron alteraciones en la región $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$, las cuales asociaron con daños en la estructura de los carbohidratos de la pared celular. Esta modificación afectó el recuento de unidades

formadoras de colonias, lo que explica la inhibición de su cinética de crecimiento en entornos con altas concentraciones de fenólicos (126). Del mismo modo, Kimani et al (2021) reportaron que el ácido cinámico, vainillina, quercetina, resveratrol y el ácido ferúlico, que poseen estructuras moleculares anfipáticas, inhiben el crecimiento de levaduras como *S. cerevisiae* y *P. anomala*, con valores de concentración inhibitoria mínima (CMI) entre 500 µg/mL y 2 mg/mL. Estas levaduras poseen una envoltura celular parecida a *A. pullulans*, constituida por una matriz de polisacáridos como β-glucanos y quitina que se ve alterada por los compuestos fenólicos, aumentando la fluidez de la membrana, comprometiendo así su homeostasis quimiosmótica (127).

Dependiendo del proceso de detoxificación con las resinas, el color del hidrolizado fue tornándose más claro. Las resinas macroporosas suelen ser usadas para la decolorización de hidrolizados debido a que puede remover compuestos fenólicos derivados de la estructura lignocelulósica, removiendo subproductos como furfural, HMF, ácido láctico, ácido acético y otros compuestos fenólicos con una tasa de remoción de 70.9% y 92.0% respectivamente (128). En la **Figura 27** se muestra la decolorización del hidrolizado inicial, después de la primera adsorción y después de la segunda adsorción.

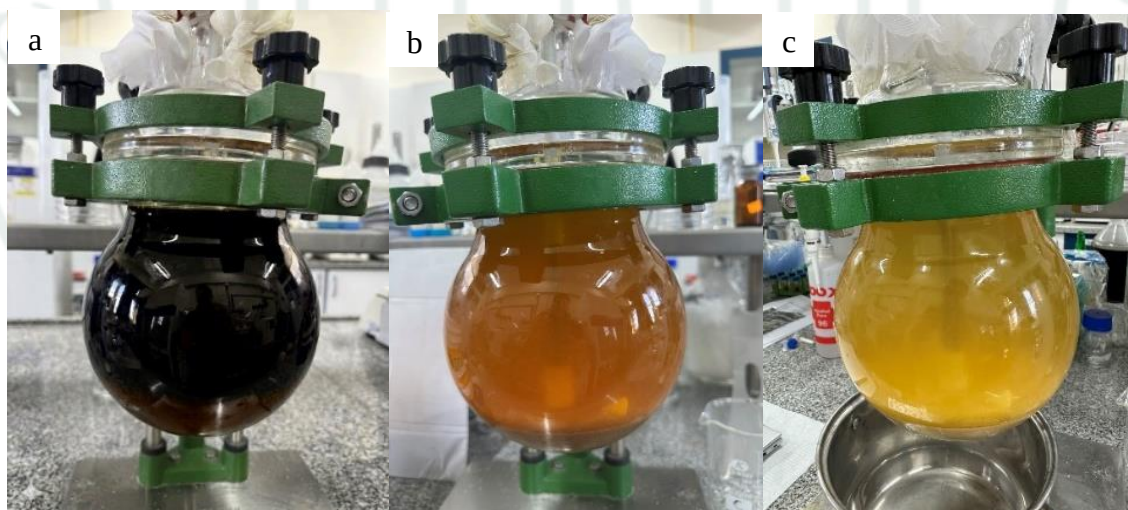


Figura 27. Decoloración del hidrolizado mediante la adsorción con resinas macroporosas. a) Hidrolizado inicial, b) después de la primera adsorción con resina AB-8 y c) posterior a una segunda adsorción con resina AB-8.

3.6.1.2 Fermentación con el medio de cultivo obtenido después de la segunda adsorción

En la **Figura 28** se observa las concentraciones de ART, fenólicos, y saponinas de los medios de fermentación obtenidos a partir de la segunda adsorción con la resina AB-8 en función del tiempo de fermentación. La biomasa inicial de *A. pullulans* fue 49.7 mg y el volumen de trabajo fue 50 mL. La concentración de ART inicial en el control fue 34.19 g/L y en ADS-7/AB-8 (medio 1), AB-8/AB-8 (medio 2) y HPD-100/AB-8 (medio 3) fue 36.34; 36.87 y 35.51 g/L respectivamente. Al finalizar 96 horas, la concentración disminuyó significativamente en todos los medios evaluados, obteniéndose una concentración final de 1.07, 4.51, 1.62 y 2.25 g/L en el control, medio 1, medio 2 y medio 3 respectivamente (**Figura 28a**). Respecto a la concentración de fenólicos (**Figura 28b**), el control tuvo una concentración inicial de 1.08 g/L mientras que en el medio 1 fue 4.21 g/L; el medio 2, 3.81 g/L y el medio 3 fue 4.19 g/L. Al finalizar la fermentación, los valores se mantuvieron constantes, con una concentración final de 1.06 g/L en el control, 4.04 g/L en el medio 1, 3.67 g/L en el medio 2 y 3.88 g/L en el medio 3. En el caso de la concentración de saponinas, el control tuvo una concentración inicial de 1.14 g/L y en los medios 1, 2 y 3 fue 2.00, 1.79 y 1.49 g/L respectivamente. Tras 96 horas de fermentación, las concentraciones finales fueron de 1.28 g/L en el control, 3.15 g/L en el medio 1, 2.69 g/L en el medio 2 y 4.15 g/L en el medio 3 (**Figura 28c**). El aumento de la concentración de saponina puede deberse a que el ácido sulfúrico altera la composición química de la glucosa remanente en el medio de fermentación, sintetizándola en derivados de furfural que pueden reaccionar con vainillina y ser detectados en el rango de longitud de onda donde se mide la absorbancia de la saponina, según el estudio de Zhu et al (2023) (129). Por otra parte, *A. pullulans* sintetiza β -glucosidasas que pueden hidrolizar los enlaces glucosídicos de los conjugados de saponinas y azúcares que no fueron removidas por la adsorción de resinas, por lo que se pudo liberar las sapogeninas restantes al medio de cultivo, incrementando así la concentración de saponinas (130).

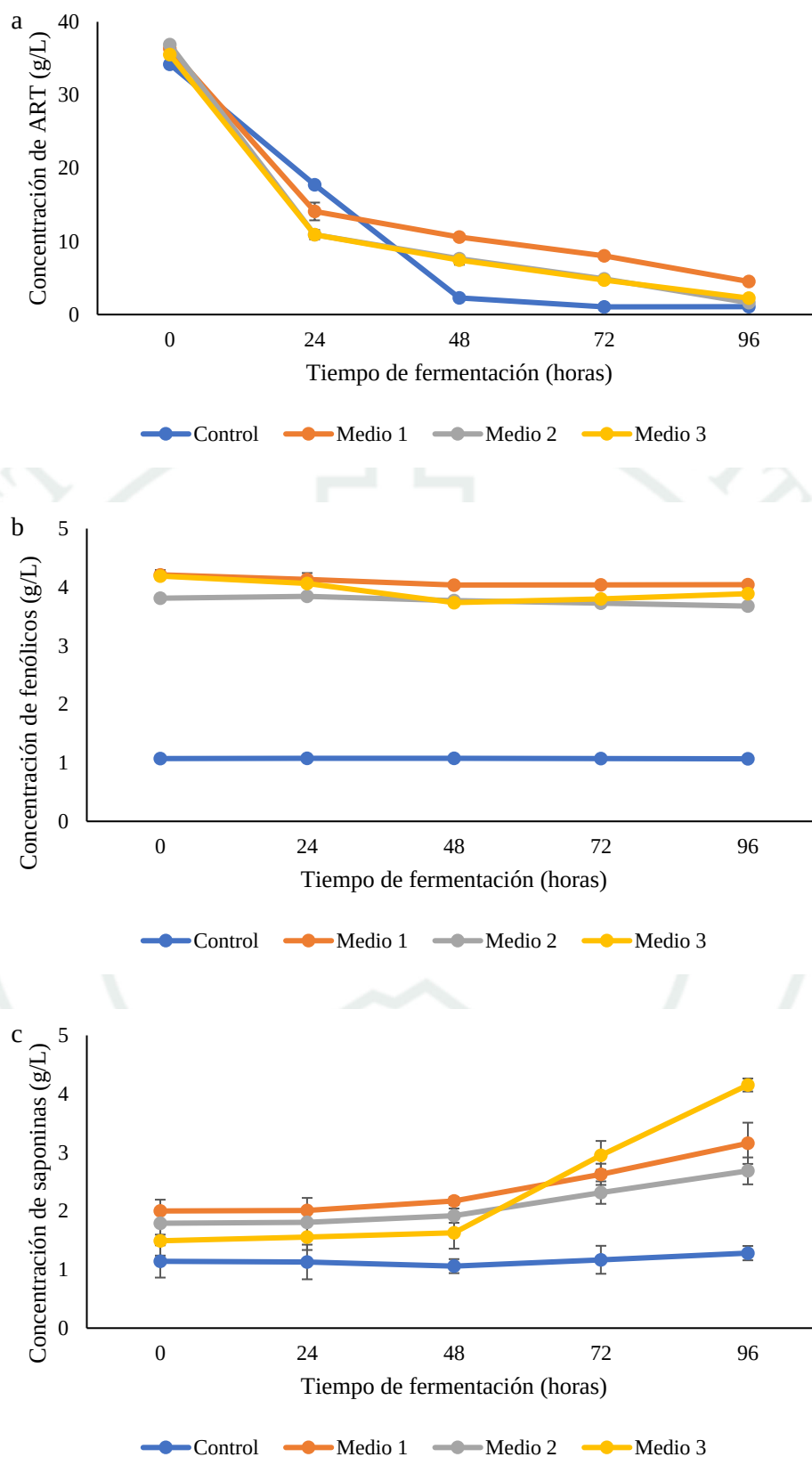


Figura 28. Cinética de adsorción de ART (a), fenólicos (b) y saponinas (c) en hidrolizados después de segunda adsorción.

Respecto a la biomasa, en todos los medios se observó un aumento, llegando a un peso final de 254.71 mg en el control, 289.54 mg en el medio 1; 331.77 mg en el medio 2 y 303.89 mg en el medio 3 al finalizar las 96 horas. En cuanto a la síntesis de EPS, el peso total después de 96 horas de fermentación fue de 159.00 mg en el control y 220.53, 229.11 y 180.82 mg en el medio 1, medio 2 y medio 3 respectivamente. Con los datos obtenidos, se definió el medio 2 como mejor alternativa debido a su menor concentración de compuestos fenólicos y saponinas, así como la mayor producción de biomasa y EPS en comparación con los otros métodos.

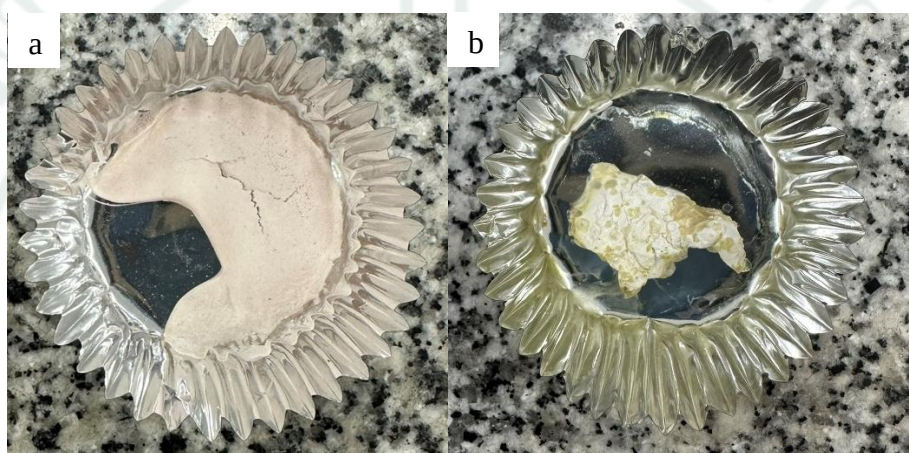


Figura 29. Biomasa (a) y EPS de *A. pullulans* (b).

3.6.1.3 Fermentación en Biorreactor

El volumen total del medio de cultivo fue de 2 L. En el caso del control, la concentración inicial de ART, fenólicos y saponinas fue 62.53, 1.44 y 1.33 g/L respectivamente, mientras que en medio detoxificado fue 66.32 g/L de ART, 5.55 g/L de fenólicos y 2.72 g/L de saponinas. Se evaluó el consumo de ART frente al crecimiento de biomasa y síntesis de EPS por un tiempo de 96 horas. En el control, la concentración final de ART fue 0.17 g/L, fenólicos 1.17 g/L y saponinas fue 2.48 g/L. La biomasa inicial fue de 50.3 mg y al finalizar la fermentación, alcanzó un peso seco de 11.75 g. En este mismo tiempo, la síntesis de EPS tuvo un valor final de 14.12 g/L (**Figura 31**). Respecto al medio detoxificado, la concentración final de ART, fenólicos y saponinas al finalizar las 96 horas de fermentación fue de 1.95, 5.38 y 1.78 g/L respectivamente. El peso inicial de la biomasa fue de 51.8 mg

y aumentó hasta 22.79 g de peso seco, mientras que se obtuvo un peso final del EPS de 17.7 g/L (Figura 32).



Figura 30. Fermentación de *A. pullulans* en biorreactor de tanque agitado.

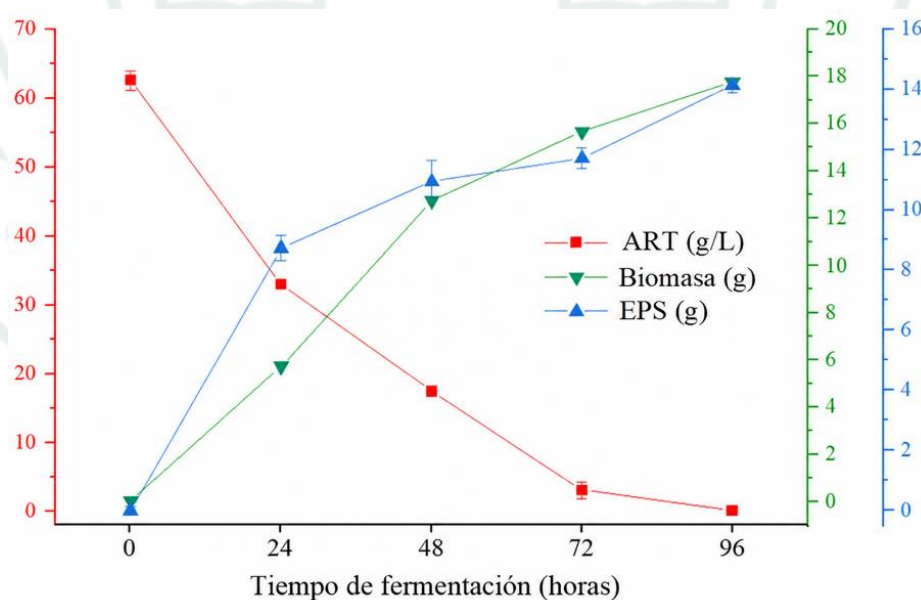


Figura 31. Cinética de crecimiento de *A. pullulans* en medio tradicional. Consumo de ART, incremento de biomasa y síntesis de EPS.

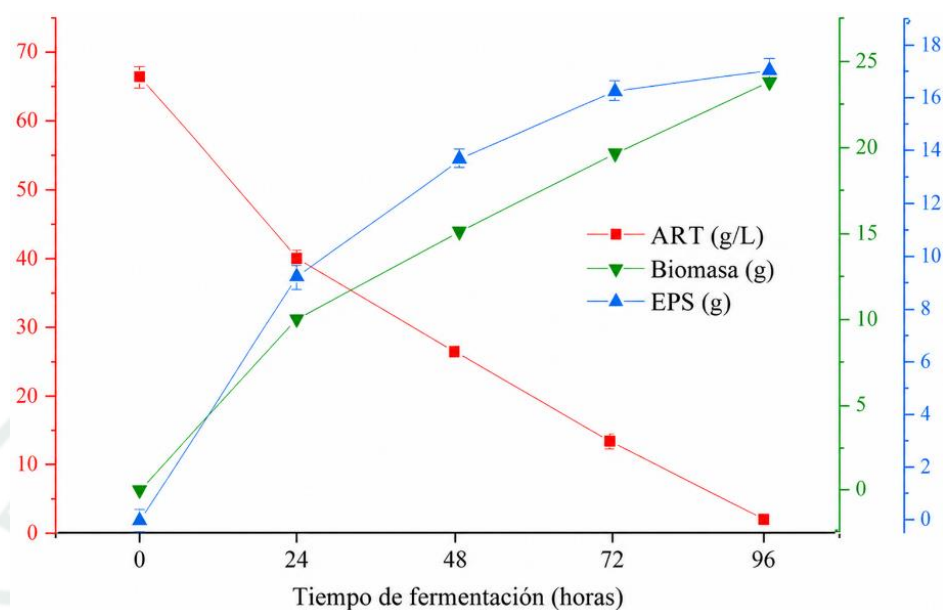


Figura 32. Cinética de crecimiento de *A. pullulans* en medio detoxificado con resinas macroporosas. Consumo de ART, incremento de biomasa y síntesis de EPS.

El medio control presentó un consumo de ART del 99.73% con un rendimiento de biomasa respecto a ART ($Y_{x/s}$) de 0.094 y un rendimiento de EPS respecto a ART ($Y_{p/s}$) de 0.226 g/g y un rendimiento de EPS respecto a la biomasa ($Y_{p/x}$) de 2.40 g/g. En cuanto al medio detoxificado con el sistema de resina AB-8/AB-8 mostró un consumo de 97.06% de ART, pero mayores $Y_{x/s}$ y $Y_{p/s}$ de 0.177 y 0.275 g/g respectivamente. Sin embargo, el $Y_{p/x}$ disminuyó a 1.56 g/g, lo que puede indicar que los ART fueron utilizados más para el crecimiento de biomasa que para la síntesis de EPS.

La composición del medio de cultivo para la producción de pululano se basó en la composición descrita por Vilca et al (2026), así como también las condiciones de fermentación como la temperatura (25 °C), agitación (250 rpm), pH (5.5) y caudal de aire de 2.5 LPM, logrando obtener 19.23 g/L de pululano (116). El estudio de Xia et al (2023) reportaron que la producción de ácido polimaleico (PMA), un bioproducto producido por *A. pullulans* junto con pululano y enzimas extracelulares puede ser inhibida por la concentración de furanos, ácidos y compuestos fenólicos. La utilización de hidrolizados de residuos agroindustriales, como la paja de maíz, pueden ser usados como medio de fermentación; sin embargo, es necesario la remoción de compuesto fenólicos, como la vanilina, siringaldehído y 4-hidroxibenzaldehído, que inhiben el crecimiento de *A.*

pullulans y por consiguiente, la producción de PMA, obteniéndose 2.55 mg/L mientras que con el medio detoxificado con CaCO_3 y resinas, se obtuvo 26.27 mg/L en una fermentación por batch, donde la resina macroporosa tuvo la mayor eficiencia, removiendo aproximadamente el 70% de compuestos fenólicos (131). El bagazo de caña de azúcar, otro residuo agroindustrial, también puede ser utilizado como medio de fermentación. Tagne et al (2024) hidrolizaron residuos de caña de azúcar con ácido sulfúrico 1% para obtener medio de fermentación para la obtención de pululano a partir de *A. pullulans* ATCC 42023. La utilización de ácido sulfúrico genera inhibidores que fueron removidos cambiando el pH hasta 7 y filtrando la solución con carbón activado, para obtener una concentración final de 33.17 g/L de pululano (132). A pesar de que el carbón activado puede remover los inhibidores, tienen desventajas como que no es tan selectivo como las resinas macroporosas, ya que también remueve azúcares, además de no ser reutilizado y, por consiguiente, genera una mayor cantidad de residuos (5). El análisis por UHPLC permitió identificar los tipos de azúcares y sus concentraciones iniciales del hidrolizado detoxificado antes de la fermentación, revelando la presencia de glucosa (34.74 g/L), xilosa (5.5 g/L), arabinosa (7.32 g/L) y celobiosa (9.55 g/L). La elevada concentración de glucosa podría deberse a la hidrólisis de almidón residual presente en el residuo de la cavitación del polvillo de la quinua mientras que la presencia de xilosa es principalmente por la degradación de la hemicelulosa durante el pretratamiento (proceso hidrotérmico), demostrando que el proceso hidrotermal favoreció la liberación de azúcares fermentables (133).

3.6.1.4 Determinación del pululano.

En la **Tabla 10** se muestra los principales picos observados en el espectro FTIR del pululano y los tipos de enlace característicos de estos picos mientras que en la **Figura 33** se muestran los diferentes espectros infrarrojos del polímero obtenido a partir de un medio tradicional y el medio de fermentación obtenido por hidrólisis térmica detoxificado con resinas macroporosas, además de pululano comercial para comparar los espectros y determinar si hay similitud. La técnica de FTIR puede ser utilizada para la determinación de grupos funcionales de polisacáridos, así como también poder evaluar modificaciones estructurales (134).

Tabla 10. Región de los principales umbrales de FTIR del pululano (135).

Enlace	Posición (cm⁻¹)
Estiramiento de O-H	3200-3400
Estiramiento C-H	2800-2930
Estiramiento O-C-O	1640-1660
Flexión O-H	1360-1380
Estiramiento C-O-C	1150-1160
Estiramiento C-O	1000-1100
α-1.6	900-1000
α-1.4	700-800

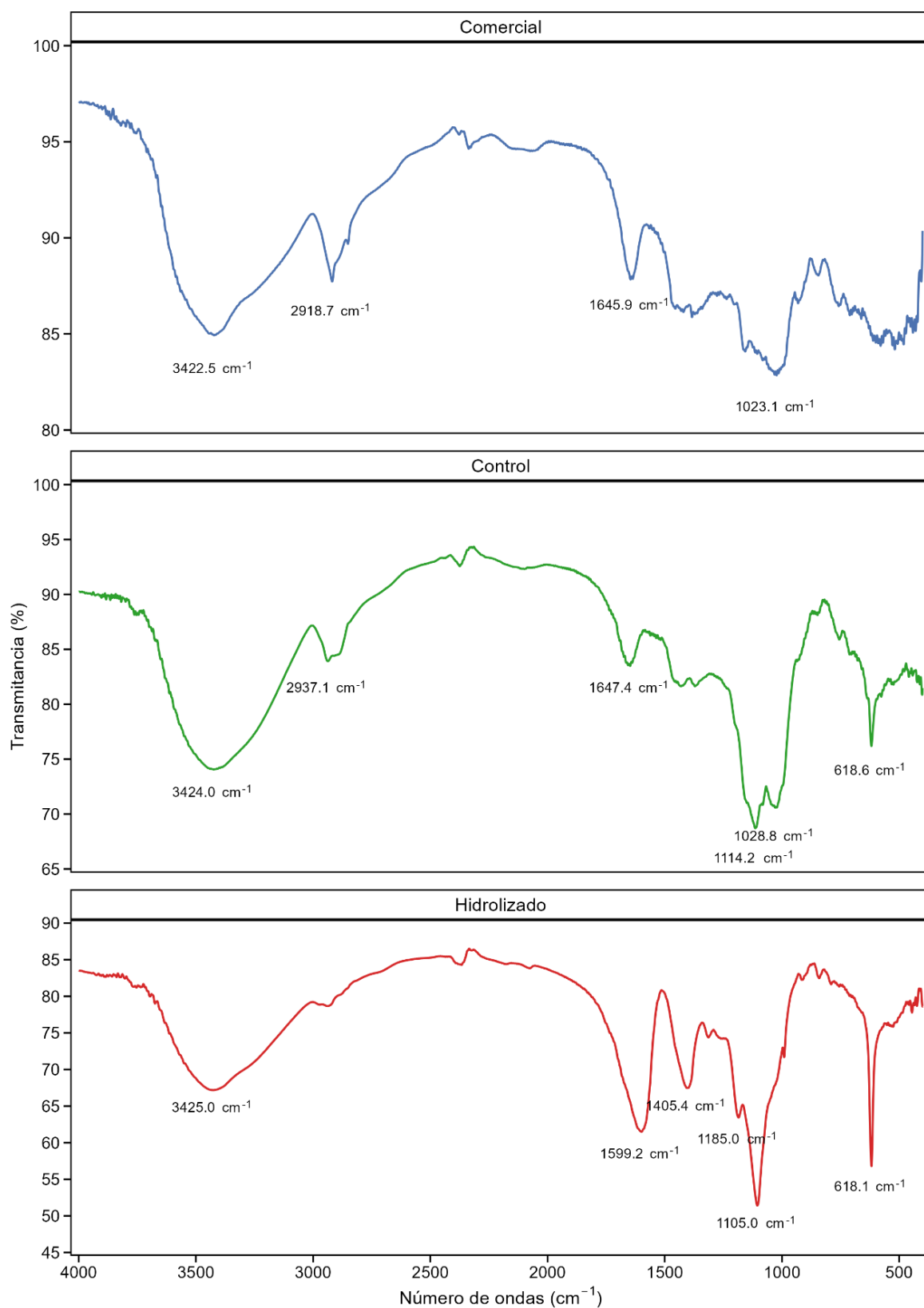


Figura 33. Espectros infrarrojos del pululano obtenido.

La región entre 3420-3430 cm^{-1} que se ve en los tres espectros corresponden a vibraciones de estiramiento O-H, característico de los grupos hidroxilo que se encuentran en la cadena principal del polisacárido de origen microbiano y que también se encuentran en pululano producido por *A. pullulans*. La intensidad fue mayor en el pululano comercial (84.9%) en comparación con el control (74.1%) y el hidrolizado (67.2%) que pueden deberse a cambios conformacionales en la cadena polimérica debido al proceso de hidrólisis térmica que puede generar nuevos extremos reductores (135). Esto se puede confirmar con los picos 2918.1 y 2937.1 cm^{-1} del comercial y control respectivamente que representan los enlaces C-H estirados presentes en los anillos de piranosa de la cadena principal del polímero, específicamente de las unidades de maltotriosa, y la ausencia de este pico en el hidrolizado puede deberse a la compactación de la cadena del pululano ya que la composición del medio de fermentación presenta otros compuestos, como fenólicos y saponinas (136). El pululano obtenido a partir del medio de fermentación hidrolizado tiene los picos 1599.2 y 1405.2 cm^{-1} mientras que en el control y comercial no los tiene. Esto se puede deber a la presencia de citrato proveniente de la alcalinización con hidróxido de sodio para aumentar pH, convirtiendo el ácido cítrico residual en citrato de sodio (137). El estudio de Moraes et al (2024) explica que estos picos se deben al estiramiento de grupos carbonilo (C=O) de los enlaces éster formados por la esterificación del ácido cítrico o citratos con los grupos O-H primarios de los polisacáridos (138). En el control e hidrolizado aparecen los picos 618.6 y 618.1 cm^{-1} que describen los anillos D-piranosa, posiblemente relacionada a un mayor grado de libertad en la conformación del anillo que se podría relacionar con un menor peso molecular o menor conglomerado de las cadenas principales del polisacárido (134). Estos datos pueden significar que el pululano obtenido a partir del medio hidrolizado y detoxificado incorpora metabolitos secundarios provenientes del medio de fermentación, como ciertos compuestos fenólicos que podrían conferirle propiedades bioactivas adicionales para diferentes aplicaciones en industrias como la farmacéutica o alimentaria.

CONCLUSIONES

Se demostró que hidrolizados de residuos de quinua obtenidos posterior a un proceso de extracción de saponinas y detoxificados pueden ser utilizados como fuente de carbono para la producción de pululano por *A. pullulans* ATCC 42023, alcanzando una concentración máxima de 17.7 g/L y contribuyendo a la valorización integral de los residuos generados tras la extracción de saponina.

Se optimizó el proceso hidrotérmico en el reactor Parr para la hidrólisis de azúcares fermentables, evaluando la concentración de ácido cítrico (mg/g) y el tiempo de hidrólisis (minutos) mediante un diseño central compuesto. Las mejores condiciones fueron 150 mg/g de ácido cítrico y 5 minutos de reacción obteniéndose una concentración final de 57.78 g/L de azúcares reductores totales.

La aplicación de la resina macroporosa AB-8 en dos procesos de adsorción disminuyó la concentración de inhibidores (furfural y HMF), fenólicos y saponinas, obteniéndose una concentración final de 0.01 y 0.24 g/L en el caso de inhibidores furfural y HMF, 3.05 g/L de fenólicos y 2.78 g/L de saponina.

El hidrolizado detoxificado por el sistema de adsorción AB-8/AB-8 se utilizó como medio de fermentación para la producción de pululano a partir de *A. pullulans*, obteniéndose 22.79 gramos de biomasa seca total y 17.7 g/L de EPS. Aunque el perfil de FTIR fue compatible con pululano al compararlo con un estándar comercial, la presencia de bandas adicionales indica que se requieren técnicas complementarias para confirmar su pureza.

RECOMENDACIONES

Determinar metodologías alternas para reducir la concentración de fenólicos y saponinas sin afectar la concentración de azúcares.

Determinar el perfil de fenólicos remanentes en el medio hidrolizado detoxificado por resina AB-8.

Realizar estudios del polímero obtenido, como análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) para determinar el comportamiento en variaciones de temperatura.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI). Agromercado – Gobierno del Perú [Internet]. 2024 [cited 2026 Jan 2]. Exportación de quinua creció en más de 40% hasta julio de 2024. Available from: <https://www.gob.pe/institucion/agromercado/noticias/1016647-gobierno-exportacion-de-quinua-crecio-en-mas-de-40-hasta-julio-de-2024>
2. Dularia C, Sashikala Vadakkoot B, Hossain S. Effect of different processes on physicochemical, antinutritional and textural properties of quinoa seeds and flour. *Food and Humanity*. 2024 May 1;2:100246. doi:10.1016/J.FOOHUM.2024.100246
3. Florez-Martinez E, Heredia-Rondón O, Choquenaira-Quipe C, Buitron-Mercado MF, Huamán-Castilla NL, Tejada-Meza K, et al. Valorization of *Chenopodium quinoa* residues through saponin recovery: Extraction, purification, and evaluation of antioxidant and cytotoxic activities. *Applied Food Research*. 2026 Jun 1;6(1):101908. doi:10.1016/j.afres.2026.101908
4. Guevara Soto VI, García Bustos KA, Colina Andrade G, Pacheco Tanaka A, dos Santos JC, Terán Hilares R. Strategies for valorization of quinoa stalks in an integrated biorefinery approach: Citric acid-assisted hydrothermal pretreatment, membrane separation, production, and use of activated charcoal. *Environ Technol Innov*. 2025 May 1;38(14):104206. doi:10.1016/j.eti.2025.104206
5. Tao L, Zhang J, Lan W, Yu L, Bi Y, Song S, et al. Polysaccharide decolorization: Methods, principles of action, structural and functional characterization, and limitations of current research. *Trends Food Sci Technol*. 2023 Aug 1;138:284–96. doi:10.1016/J.TIFS.2023.06.017
6. Ortiz Silos N, Guevara Soto VI, Colina Andrade GJ, Pacheco Tanaka DA, Santos JC, Terán Hilares R. Exopolysaccharide pullulan production from enzymatic hydrolysate of quinoa stalks via citric acid–assisted hydrothermal pretreatment. *Biomass Conversion and Biorefinery* 2024 15:10. 2024 Nov 1;15(10):16059–71. doi:10.1007/s13399-024-06276-9
7. Dakhili S, Abdolalizadeh L, Hosseini SM, Shojaee-Aliabadi S, Mirmoghtadaie L. Quinoa protein: Composition, structure and functional properties. *Food Chem*. 2019 Nov 30;299:125161. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2019.125161 PubMed PMID: 31323439.
8. Taaime N, Rafik S, El Mejahed K, Oukarroum A, Choukr-Allah R, Bouabid R, et al. Worldwide development of agronomic management practices for quinoa cultivation: a systematic review. *Frontiers in Agronomy*. 2023 Jul 5;5:1215441. doi:10.3389/FAGRO.2023.1215441/FULL
9. Scanlin L, Lewis KA, Dugger P. Quinoa as a Sustainable Protein Source: Production, Nutrition, and Processing. *Sustainable Protein Sources: Advances for a Healthier Tomorrow*, Second Edition. 2024 Jan 1;381–98. doi:10.1016/B978-0-323-91652-3.00009-5

10. Varma A, Jain A. Taxonomy, Morphology, and Life Cycle of Quinoa. In: *Biology and Biotechnology of Quinoa*. Singapore: Springer Singapore; 2021. p. 17–33. doi:10.1007/978-981-16-3832-9_2
11. Repo-Carrasco-Valencia RAM, Serna LA. Quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd.) as a source of dietary fiber and other functional components. *Food Science and Technology*. 2011 Jan;31(1):225–30. doi:10.1590/S0101-20612011000100035
12. Alandia G, Rodriguez JP, Jacobsen SE, Bazile D, Condori B. Global expansion of quinoa and challenges for the Andean region. *Glob Food Sec*. 2020 Sep 1;26:100429. doi:10.1016/J.GFS.2020.100429
13. Hlásná Cepková P, Dostálíková L, Viehmannová I, Jágr M, Janovská D. Diversity of quinoa genetic resources for sustainable production: A survey on nutritive characteristics as influenced by environmental conditions. *Front Sustain Food Syst*. 2022 Oct 26;6:960159. doi:10.3389/FSUFS.2022.960159/FULL
14. Chavan SM, Khadatkar A, Hasan M, Ahmad D, Kumar V, Jain NK. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): Paving the way towards nutraceuticals and value-added products for sustainable development and nutritional security. *Applied Food Research*. 2025 Jun 1;5(1):100673. doi:10.1016/J.AFRES.2024.100673
15. Duque-Acevedo M, Belmonte-Ureña LJ, Cortés-García FJ, Camacho-Ferre F. Agricultural waste: Review of the evolution, approaches and perspectives on alternative uses. *Glob Ecol Conserv*. 2020 Jun;22:e00902. doi:10.1016/j.gecco.2020.e00902
16. Tunio AA, Naqvi M, Qureshi AS, Khushk I, Jatt AN, Nizami AS, et al. Multi enzyme production from mixed untreated agricultural residues applied in enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass for biofuel. *Process Safety and Environmental Protection*. 2024 Jun;186:540–51. doi:10.1016/j.psep.2024.04.039
17. Ponce G, Rodríguez-Llamazares S, Rivera PC, Castaño J, Oporto-Velásquez G, Sabando C, et al. Biocomposites of polylactic acid/ poly(butylene adipate-co-terephthalate) blends loaded with quinoa husk agro-waste: thermal and mechanical properties. *Journal of Polymer Research*. 2022 Aug 1;29(8):1–13. doi:10.1007/S10965-022-03196-Y/FIGURES/6
18. Channi HK, Singh M, Brar YS, Dhingra A, Gupta S, Singh H, et al. Agricultural waste assessment for the optimal power generation in the Ludhiana district, Punjab, India. *Mater Today Proc*. 2022 Jan 1;50:700–8. doi:10.1016/J.MATPR.2021.04.481
19. Casalvara RFA, Ferreira BMR, Gonçalves JE, Yamaguchi NU, Bracht A, Bracht L, et al. Biotechnological, Nutritional, and Therapeutic Applications of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and Its By-Products: A Review of the Past Five-Year Findings. *Nutrients* 2024, Vol 16, Page 840. 2024 Mar 14;16(6):840. doi:10.3390/NU16060840 PubMed PMID: 38542751.
20. Khalid A, Khushnood RA, Ali Memon S. Pyrolysis as an alternate to open burning of crop residue and scrap tires: Greenhouse emissions assessment and mechanical performance investigation in concrete. *J Clean Prod*. 2022 Sep 10;365:132688. doi:10.1016/J.JCLEPRO.2022.132688

21. Maliro MFA, Guwela VF, Nyaika J, Murphy KM. Preliminary studies of the performance of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) genotypes under irrigated and rainfed conditions of central Malawi. *Front Plant Sci.* 2017 Feb 27;8:228168. doi:10.3389/FPLS.2017.00227/BIBTEX
22. Suárez-Estrella D, Torri L, Pagani MA, Marti A. Quinoa bitterness: causes and solutions for improving product acceptability. *J Sci Food Agric.* 2018 Aug 30;98(11):4033–41. doi:10.1002/JSFA.8980;SUBPAGE:STRING:ABSTRACT;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:10970010;WGROUPE:STRING:PUBLICATION PubMed PMID: 29485194.
23. Cantero-Bahillo E, da Cunha-Borges V, Martin D. Quinoa (*Chenopodium quinoa*) or quinoa husk in the diet of *Tenebrio molitor*: Productive parameters, larvae composition, saponins bioaccumulation and bioactivity. *Food Chem.* 2025 Sep 30;487:144667. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2025.144667 PubMed PMID: 40382905.
24. Cantero-Bahillo E, Navarro del Hierro J, de las Nieves Siles-Sánchez M, Jaime L, Santoyo S, Martin D. Combination of Fenugreek and Quinoa Husk as Sources of Steroidal and Triterpenoid Saponins: Bioactivity of Their Co-Extracts and Hydrolysates. *Foods* 2024, Vol 13, Page 562. 2024 Feb 12;13(4):562. doi:10.3390/FOODS13040562
25. Moghimipour E, Handali S. Saponin: Properties, Methods of Evaluation and Applications. *Annu Res Rev Biol.* 2015 Jan 10;5(3):207–20. doi:10.9734/ARRB/2015/11674
26. Mora-Ocación MS, Morillo-Coronado ACruz, Manjarres-Hernández EHelen. Extraction and Quantification of Saponins in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Genotypes from Colombia. *Int J Food Sci.* 2022 Feb 28;2022:1–7. doi:10.1155/2022/7287487
27. Nguyen LT, Farcăș AC, Socaci SA, Tofană M, Diaconeasa ZM, Pop OL, et al. An Overview of Saponins – A Bioactive Group. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Food Science and Technology.* 2020 May 24;77(1):25–36. doi:10.15835/BUASVMCN-FST:2019.0036
28. Sharma P, Tyagi A, Bhansali P, Pareek S, Singh V, Ilyas A, et al. Saponins: Extraction, bio-medicinal properties and way forward to anti-viral representatives. *Food and Chemical Toxicology.* 2021 Apr 1;150. doi:10.1016/j.fct.2021.112075 PubMed PMID: 33617964.
29. Sharma K, Kaur R, Kumar S, Saini RK, Sharma S, Pawde S V., et al. Saponins: A concise review on food related aspects, applications and health implications. *Food Chemistry Advances.* Elsevier Ltd; 2023. doi:10.1016/j.focha.2023.100191
30. Fagbohun OF, Joseph JS, Oriyomi O V., Rupasinghe HPV. Saponins of North Atlantic Sea Cucumber: Chemistry, Health Benefits, and Future Prospectives. *Marine Drugs.* MDPI; 2023. doi:10.3390/md21050262 PubMed PMID: 37233456.
31. Rai S, Kafle A, Devkota HP, Bhattarai A. Characterization of saponins from the leaves and stem bark of *Jatropha curcas* L. for surface-active properties. *Heliyon.* 2023 May 1;9(5):e15807. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e15807

32. Fitria U, Sulisetijono S, Lelitawati M, Jasman MuhW, Firdaus Z, Muktafi A. Comparison of Saponin Levels of Lerak Extract (*Sapindus rarak*) Maceration and Socletation Results Based on UV-Vis Spectrophotometry Analysis. BIO Web Conf. 2024 Jul 5;117:01015. doi:10.1051/bioconf/202411701015
33. Deore SL, Baviskar BA, Rangari AS. Rapid and high yield Extraction method for Saponins from Safed musli. Pharmacognosy Journal. 2015;7(4):210–4. doi:10.5530/pj.2015.4.1
34. Yusoff IM, Mat Taher Z, Rahmat Z, Chua LS. A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins. Food Research International. 2022 Jul 1;157:111268. doi:10.1016/J.FOODRES.2022.111268 PubMed PMID: 35761580.
35. Wang Z, Pan H, Xu J, Chang Y, Liu C, Zhang Y, et al. A sustainable and integrated natural surfactant mediated microwave-assisted extraction technique enhances the extraction of phytochemicals from plants. Ind Crops Prod. 2022 Sep 15;184:115043. doi:10.1016/J.INDCROP.2022.115043
36. Zacharis K, Meneguzzo F, Zabini F, Albanese L. Green Extraction at Scale: Hydrodynamic Cavitation for Bioactive Recovery and Protein Functionalization—A Narrative Review. Molecules 2026, Vol 31, Page 192. 2026 Jan 5;31(1):192. doi:10.3390/MOLECULES31010192
37. Zoglopiti E, Roufou S, Psakis G, Okafor ET, Dasenaki M, Gatt R, et al. Unravelling the Hydrodynamic Cavitation Potential in Food Processing: Underlying Mechanisms, Crucial Parameters, and Antimicrobial Efficacy. Food Engineering Reviews 2025 17:4. 2025 Jul 22;17(4):994–1035. doi:10.1007/S12393-025-09419-4
38. Ranade V, Bhandari V, Nagarajan S, Sarvothaman V, Simpson A. Hydrodynamic Cavitation: Device, Design and Applications. 2022.
39. Ge M, Zhang G, Petkovšek M, Long K, Coutier-Delgosha O. Intensity and regimes changing of hydrodynamic cavitation considering temperature effects. J Clean Prod. 2022 Mar 1;338(1):130470. doi:10.1016/j.jclepro.2022.130470
40. Malkapuram ST, Sonawane SH. Intensified physical and chemical processing using cavitation: how far are we from commercial applications of hydrodynamic cavitation? Curr Opin Chem Eng. 2025 Sep 1;49:101154. doi:10.1016/j.coche.2025.101154
41. Tang J, Zhu X, Jambrak AR, Sun DW, Tiwari BK. Mechanistic and synergistic aspects of ultrasonics and hydrodynamic cavitation for food processing. Crit Rev Food Sci Nutr. 2024;64(24):8587–608. doi:10.1080/10408398.2023.2201834 PubMed PMID: 37194650.
42. Zhu X, Healy L, Das RS, Bhavya ML, Karuppusamy S, Sun DW, et al. Novel biorefinery process for extraction of laminarin, alginate and protein from brown seaweed using hydrodynamic cavitation. Algal Res. 2023 Jul 1;74:103243. doi:10.1016/j.algal.2023.103243

43. Gogate PR, Pandit AB. A review and assessment of hydrodynamic cavitation as a technology for the future. In: *Ultrasonics Sonochemistry*. Elsevier B.V.; 2005. p. 21–7. doi:10.1016/j.ultsonch.2004.03.007 PubMed PMID: 15474948.
44. Oulahal N, Degraeve P. Phenolic-Rich Plant Extracts With Antimicrobial Activity: An Alternative to Food Preservatives and Biocides? *Front Microbiol*. 2022 Jan 4;12:753518. doi:10.3389/FMICB.2021.753518/FULL
45. de la Rosa LA, Moreno-Escamilla JO, Rodrigo-García J, Alvarez-Parrilla E. Phenolic Compounds. *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. 2019 Jan 1;253–71. doi:10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9
46. Zhang Y, Cai P, Cheng G, Zhang Y. A Brief Review of Phenolic Compounds Identified from Plants: Their Extraction, Analysis, and Biological Activity. *Nat Prod Commun*. 2022 Jan 1;17(1). doi:10.1177/1934578X211069721;WEBSITE:WEBSITE:SAGE;ISSUE:ISSUE:DOI
47. Alu'datt MH, Rababah T, Alhamad MN, Al-Mahasneh MA, Almajwal A, Gammoh S, et al. A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. *Food Chem*. 2017 Mar 1;218:99–106. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2016.09.057 PubMed PMID: 27719963.
48. Santos D, Gueiros J, Siqueira W, Lopes Da Silva MG, Donato M, Da Silva G, et al. Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Structural Features, Process Aspects, Kinetics, and Computational Tools. *Biomass* 2026, Vol 6, Page 13. 2026 Feb 3;6(1):13. doi:10.3390/biomass6010013
49. Woźniak A, Kuligowski K, Świerczek L, Cenian A. Review of Lignocellulosic Biomass Pretreatment Using Physical, Thermal and Chemical Methods for Higher Yields in Bioethanol Production. *Sustainability* 2025, Vol 17, Page 287. 2025 Jan 2;17(1):287. doi:10.3390/su17010287
50. Merino D, Athanassiou A. Alkaline hydrolysis of biomass as an alternative green method for bioplastics preparation: In situ cellulose nanofibrillation. *Chemical Engineering Journal*. 2023 Feb 15;454:140171. doi:10.1016/j.cej.2022.140171
51. Barredo A, Asueta A, Amundarain I, Leivar J, Miguel-Fernández R, Arnaiz S, et al. Chemical recycling of monolayer PET tray waste by alkaline hydrolysis. *J Environ Chem Eng*. 2023 Jun 1;11(3):109823. doi:10.1016/J.JECE.2023.109823
52. Cai C, Zhang C, Li N, Liu H, Xie J, Lou H, et al. Changing the role of lignin in enzymatic hydrolysis for a sustainable and efficient sugar platform. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2023 Sep 1;183(7435):113445. doi:10.1016/j.rser.2023.113445
53. Vasić K, Knez Ž, Leitgeb M. Bioethanol Production by Enzymatic Hydrolysis from Different Lignocellulosic Sources. *Molecules*. 2021 Feb 1;26(3):753. doi:10.3390/molecules26030753 PubMed PMID: 33535536.
54. Fagundes VD, Freitag JF, Simon V, Colla LM. Enzymatic hydrolysis of food waste for bioethanol production. *Revista Brasileira de Ciências Ambientais*. 2024 Jun 25;59:e1978–e1978. doi:10.5327/Z2176-94781978

55. Zhang C, Kang X, Wang F, Tian Y, Liu T, Su Y, et al. Valorization of food waste for cost-effective reducing sugar recovery in a two-stage enzymatic hydrolysis platform. *Energy*. 2020 Oct 1;208:118379. doi:10.1016/J.ENERGY.2020.118379
56. Batista G, Souza RBA, Pratto B, dos Santos-Rocha MSR, Cruz AJG. Effect of severity factor on the hydrothermal pretreatment of sugarcane straw. *Bioresour Technol*. 2019 Mar 1;275(4):321–7. doi:10.1016/j.biortech.2018.12.073 PubMed PMID: 30594843.
57. Ahmed B, Aboudi K, Tyagi VK, Álvarez-Gallego CJ, Fernández-Güelfo LA, Romero-García LI, et al. Improvement of Anaerobic Digestion of Lignocellulosic Biomass by Hydrothermal Pretreatment. *Applied Sciences* 2019, Vol 9, Page 3853. 2019 Sep 13;9(18):3853. doi:10.3390/app9183853
58. Yue P, Hu Y, Tian R, Bian J, Peng F. Hydrothermal pretreatment for the production of oligosaccharides: A review. *Bioresour Technol*. 2022 Jan 1;343:126075. doi:10.1016/J.BIORTECH.2021.126075 PubMed PMID: 34606922.
59. Sarker TR, Pattnaik F, Nanda S, Dalai AK, Meda V, Naik S. Hydrothermal pretreatment technologies for lignocellulosic biomass: A review of steam explosion and subcritical water hydrolysis. *Chemosphere*. 2021 Dec 1;284(5):131372. doi:10.1016/j.chemosphere.2021.131372 PubMed PMID: 34323806.
60. Huang J, Li B, Xian X, Hu Y, Lin X. Efficient Bioethanol Production from Spent Coffee Grounds Using Liquid Hot Water Pretreatment without Detoxification. *Fermentation*. 2024 Aug 1;10(8):436. doi:10.3390/fermentation10080436
61. Cui JY, Zhang N, Jiang JC. Effects of Microwave-Assisted Liquid Hot Water Pretreatment on Chemical Composition and Structure of Moso Bamboo. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022 Feb 7;9:821982. doi:10.3389/fbioe.2021.821982
62. Amaro Bittencourt G, Porto de Souza Vandenberghe L, Valladares-Diestra KK, Zwiercheczewski de Oliveira P, Zandoná Filho A, Soccol CR. Integrated Soybean Hull Biorefinery with Citric Acid-Catalyzed Hydrothermal Pretreatment for L-Lactic Acid and Xylooligosaccharide Production. *BioEnergy Research* 2024 17:3. 2024 Jan 5;17(3):1648–61. doi:10.1007/s12155-023-10714-3
63. Gomes MG, Gurgel LVA, Baffi MA, Pasquini D. Pretreatment of sugarcane bagasse using citric acid and its use in enzymatic hydrolysis. *Renew Energy*. 2020 Sep 1;157:332–41. doi:10.1016/J.RENENE.2020.05.002
64. Wang S, You X, Gui Z, Wang J, Kang S, Cao J, et al. Efficient Production of Fermentable Sugars from Common Reed Biomass Through Hydrothermal and Citric Acid Pretreatment Processes. *BioEnergy Research* 2024 17:4. 2024 Aug 8;17(4):2177–89. doi:10.1007/s12155-024-10795-8
65. Manzoor MH, Elsayed I, Hassan EB. Optimization of Hemicellulosic Carbohydrate Extraction from Corncobs via Hydrothermal Treatment: A Response Surface Methodology Approach. *Sustainable Chemistry*. 2025 Sep 1;6(3):27. doi:10.3390/SUSCHEM6030027/S1
66. Ten Caten LR, da Rosa NC, Mayer FD, Brondani LN, Vezaro FD, Abaide ER. An integrated hydrothermal processing strategy for sweet sorghum bagasse to improve

- fermentable sugar production. *Biomass Bioenergy*. 2026 Sep 1;212:109318. doi:10.1016/J.BIOMBIOE.2026.109318
67. Basak B, Patil S, Kumar R, Ha GS, Park YK, Ali Khan M, et al. Integrated hydrothermal and deep eutectic solvent-mediated fractionation of lignocellulosic biocomponents for enhanced accessibility and efficient conversion in anaerobic digestion. *Bioresour Technol*. 2022 May 1;351:127034. doi:10.1016/J.BIORTECH.2022.127034 PubMed PMID: 35314307.
 68. Wang Y, Zhang Y, Cui Q, Feng Y, Xuan J. Composition of Lignocellulose Hydrolysate in Different Biorefinery Strategies: Nutrients and Inhibitors. *Molecules* 2024, Vol 29, Page 2275. 2024 May 11;29(10):2275. doi:10.3390/MOLECULES29102275 PubMed PMID: 38792135.
 69. Nakason K, Sumrannit P, Youngjan S, Wanmolee W, Kraithong W, Khemthong P, et al. Environmental impact of 5-hydroxymethylfurfural production from cellulosic sugars using biochar-based acid catalyst. *Chem Eng Sci*. 2024 Apr 5;287:119729. doi:10.1016/J.CES.2024.119729
 70. He O, Smith BA, Champange P, Jessop PG, Yu H. How to make furfural and HMF production greener? Lessons from life cycle assessments. *Green Chemistry*. 2025;27(45):14436–77. doi:10.1039/D5GC03729H
 71. Jilani SB, Olson DG. Mechanism of furfural toxicity and metabolic strategies to engineer tolerance in microbial strains. *Microbial Cell Factories* 2023 22:1. 2023 Oct 28;22(1):221–. doi:10.1186/S12934-023-02223-X PubMed PMID: 37891678.
 72. Monlau F, Sambusiti C, Barakat A, Quéméneur M, Trably E, Steyer JP, et al. Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. *Biotechnol Adv*. 2014 Sep 1;32(5):934–51. doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2014.04.007 PubMed PMID: 24780154.
 73. B K B, Mudliar SN, Bokade V V., Debnath S. Effect of furfural, acetic acid and 5-hydroxymethylfurfural on yeast growth and xylitol fermentation using *Pichia stipitis* NCIM 3497. *Biomass Conversion and Biorefinery* 2022 14:4. 2022 May 21;14(4):4909–23. doi:10.1007/S13399-022-02758-W
 74. Dos Santos FKF, De Rezende CM, Da Veiga Júnior VF. Macroporous polymeric resins as a tool to obtain bioactive compounds in food and food-waste: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2022 Dec 1;114:104703. doi:10.1016/J.JFCA.2022.104703
 75. Qin Z, Du Y, Zhong Y, Gu Z, Zheng Q, Zheng Y, et al. Purification of steroidal saponins from *dioscoreae hypoglaucae rhizoma* by macroporous resin and evaluation of their anti-inflammatory effect. *Journal of Chromatography B*. 2025 Nov 1;1265:124769. doi:10.1016/j.jchromb.2025.124769 PubMed PMID: 40829486.
 76. Kovač MJ, Pavić V, Huđ A, Cindrić I, Molnar M. Determination of Suitable Macroporous Resins and Desorbents for Carnosol and Carnosic Acid from Deep Eutectic Solvent Sage (*Salvia officinalis*) Extract with Assessment of Antiradical and

- Antibacterial Activity. Antioxidants. 2021 Apr 1;10(4):556. doi:10.3390/antiox10040556 PubMed PMID: 33918515.
77. Yang D, Li MM, Wang WJ, Zheng GD, Yin ZP, Chen JG, et al. Separation and purification of anthocyanins from Roselle by macroporous resins. LWT. 2022 May 1;161:113371. doi:10.1016/J.LWT.2022.113371
 78. Zhang L, Wang C, Zhang H, Guo H, Xiong L, Li H, et al. Synthesis of glycidyl methacrylate modified hyper-cross-linked resins and enhancing their adsorptions toward levulinic acid and furfural from sugarcane bagasse hydrolysate. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2020 Sep 1;95(9):2537–48. doi:10.1002/JCTB.6440
 79. Hu L, Zheng J, Li Q, Tao S, Zheng X, Zhang X, et al. Adsorption of 5-Hydroxymethylfurfural, Levulinic Acid, Formic Acid, and Glucose Using Polymeric Resins Modified with Different Functional Groups. ACS Omega. 2021 Jul 6;6(26):16955–68. doi:10.1021/ACSOMEGA.1C01894
 80. Hocking MBB. Handbook of Chemical Technology and Pollution Control. 2013.
 81. Dev MJ, Warke RG, Warke GM, Mahajan GB, Patil TA, Singhal RS. Advances in fermentative production, purification, characterization and applications of gellan gum. Bioresour Technol. 2022 Sep;359:127498. doi:10.1016/j.biortech.2022.127498
 82. Ma Y, Li B, Zhang X, Wang C, Chen W. Production of Gluconic Acid and Its Derivatives by Microbial Fermentation: Process Improvement Based on Integrated Routes. Front Bioeng Biotechnol. 2022 May 16;10:864787. doi:10.3389/FBIOE.2022.864787/BIBTEX PubMed PMID: 35651548.
 83. Guo J, Tang C, Liu Y, Shi J, Vunduk J, Tang C, et al. Innovative submerged directed fermentation: Producing high molecular weight polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. Food Chem. 2025 Apr;471:142759. doi:10.1016/j.foodchem.2025.142759
 84. Wani SM, Mir SA, Khanday FA, Masoodi FA. Advances in pullulan production from agro-based wastes by *Aureobasidium pullulans* and its applications. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2021 Dec 1;74:102846. doi:10.1016/J.IFSET.2021.102846
 85. Gupta K, Bardhan P, Saikia D, Rather MA, Loring S, Mandal M, et al. Microbial Fermentation: Basic Fundamentals and Its Dynamic Prospect in Various Industrial Applications. Industrial Microbiology and Biotechnology. 2022 Jan 1;107–28. doi:10.1007/978-981-16-5214-1_4/TABLES/2
 86. Mascarin GM, Golo PS, de Souza Ribeiro-Silva C, Muniz ER, de Oliveira Franco A, Kobori NN, et al. Advances in submerged liquid fermentation and formulation of entomopathogenic fungi. Applied Microbiology and Biotechnology 2024 108:1. 2024 Aug 30;108(1):451-. doi:10.1007/S00253-024-13287-Z PubMed PMID: 39212719.
 87. Doriya K, Jose N, Gowda M, Kumar DS. Solid-State Fermentation vs Submerged Fermentation for the Production of L-Asparaginase. Adv Food Nutr Res. 2016 Jan 1;78:115–35. doi:10.1016/BS.AFNR.2016.05.003 PubMed PMID: 27452168.

88. Di Francesco A, Zajc J, Stenberg JA. *Aureobasidium* spp.: Diversity, Versatility, and Agricultural Utility. *Horticulturae* 2023, Vol 9, Page 59. 2023 Jan 3;9(1):59. doi:10.3390/horticulturae9010059
89. Prasongsuk S, Lotrakul P, Ali I, Bankeeree W, Punnapayak H. The current status of *Aureobasidium pullulans* in biotechnology. *Folia Microbiologica* 2017 63:2. 2017 Oct 27;63(2):129–40. doi:10.1007/s12223-017-0561-4 PubMed PMID: 29079936.
90. Haghighatpanah N, Mirzaee H, Khodaiyan F, Kennedy JF, Aghakhani A, Hosseini SS, et al. Optimization and characterization of pullulan produced by a newly identified strain of *Aureobasidium pullulans*. *Int J Biol Macromol.* 2020 Jun 1;152:305–13. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.02.226 PubMed PMID: 32088229.
91. *Aureobasidium pullulans* (AUREPU). EPPO Global Database. 2002. EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization).
92. Yu B, Weng H, Qiu L. Multidisciplinary design optimization of micro electro mechanical systems. *Jixie Gongcheng Xuebao/Chinese Journal of Mechanical Engineering*. 2006 May 1;42(SUPPL.):65–8. doi:10.3901/jme.2006.sup.065
93. Singh RS, Kaur N, Rana V, Kennedy JF. Pullulan: A novel molecule for biomedical applications. *Carbohydr Polym.* 2017 Sep 1;171(2):102–21. doi:10.1016/j.carbpol.2017.04.089 PubMed PMID: 28578944.
94. Chen CT, Chen KI, Chiang HH, Chen YK, Cheng KC. Improvement on Physical Properties of Pullulan Films by Novel Cross-Linking Strategy. *J Food Sci.* 2017 Jan 1;82(1):108–17. doi:10.1111/1750-3841.13577 PubMed PMID: 27992648.
95. Aquinas N, Chithra CH, Bhat MR. Progress in bioproduction, characterization and applications of pullulan: a review. *Polymer Bulletin* 2024 81:14. 2024 May 17;81(14):12347–82. doi:10.1007/s00289-024-05300-2
96. West TP. Pullulan Production from Lignocellulosic Plant Biomass or Starch-Containing Processing Coproduct Hydrolysates. *Fermentation* 2026, Vol 12, Page 84. 2026 Feb 3;12(2):84. doi:10.3390/FERMENTATION12020084
97. Singh RS, Kaur N, Pandey A, Kennedy JF. Hyper-production of pullulan from de-oiled rice bran by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor and its characterization. *Bioresour Technol Rep.* 2020 Sep 1;11:100494. doi:10.1016/J.BITEB.2020.100494
98. Rai M, Ingle AP, Gupta I, Pandit R, Paralikar P, Gade A, et al. Smart nanopackaging for the enhancement of food shelf life. *Environmental Chemistry Letters* 2018 17:1. 2018 Sep 5;17(1):277–90. doi:10.1007/s10311-018-0794-8
99. Kaith A, Garg U, Jain N, Pandey M, Kaul S, Gorain B, et al. Pullulan as a sustained release carrier for ocular drug delivery: a review. *Int J Biol Macromol.* 2025 May 1;309(23):143146. doi:10.1016/j.ijbiomac.2025.143146 PubMed PMID: 40233906.
100. Dewan MF, Islam MN. Pullulan-Based Films: Unveiling Its Multifaceted Versatility for Sustainability. *Advances in Polymer Technology.* 2024 Jan 1;2024(1):2633384. doi:10.1155/2024/2633384

101. Zeng Q, Qi X, Zhang M, Tong X, Jiang N, Pan W, et al. Efficient decontamination of heavy metals from aqueous solution using pullulan/polydopamine hydrogels. *Int J Biol Macromol*. 2020 Feb 15;145:1049–58. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.197 PubMed PMID: 31759765.
102. Mahato RP, Kumar S. A review of pullulan nanopolymer derived from agro-food waste and its applications. *Iranian Polymer Journal* 2024 33:10. 2024 May 31;33(10):1493–526. doi:10.1007/S13726-024-01338-1
103. Fadlelmoula A, Pinho D, Carvalho VH, Catarino SO, Minas G. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy to Analyse Human Blood over the Last 20 Years: A Review towards Lab-on-a-Chip Devices. *Micromachines* 2022, Vol 13, Page 187. 2022 Jan 26;13(2):187. doi:10.3390/MI13020187
104. Al-Amin K, Kawsar M, Mamun MTRB, Sahadat Hossain M. Fourier transform infrared spectroscopic technique for analysis of inorganic materials: a review. *Nanoscale Adv*. 2025;7(21):6677. doi:10.1039/D5NA00522A PubMed PMID: 40949700.
105. Niemi C, Mortensen AM, Rautenberger R, Matsson S, Gorzsás A, Gentili FG. Rapid and accurate determination of protein content in North Atlantic seaweed by NIR and FTIR spectroscopies. *Food Chem*. 2023 Mar 15;404:134700. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2022.134700 PubMed PMID: 36279781.
106. Ghanbari E, Picken SJ, van Esch JH. Analysis of differential scanning calorimetry (DSC): determining the transition temperatures, and enthalpy and heat capacity changes in multicomponent systems by analytical model fitting. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2023 148:22. 2023 Sep 26;148(22):12393–409. doi:10.1007/S10973-023-12356-1
107. Blesstina SRK, Mathavan T, Buvaneshwari P, Joel T, Benial AMF. Conducting behaviour of a novel solid biopolymer electrolyte for electrochemical application. *Ionics* 2023 29:9. 2023 Jul 20;29(9):3437–50. doi:10.1007/S11581-023-05087-8
108. Xie R, Weisen AR, Lee Y, Aplan MA, Fenton AM, Masucci AE, et al. Glass transition temperature from the chemical structure of conjugated polymers. *Nature Communications* 2020 11:1. 2020 Feb 14;11(1):893-. doi:10.1038/s41467-020-14656-8 PubMed PMID: 32060331.
109. Aniza R, Chen WH, Kwon EE, Bach QV, Hoang AT. Lignocellulosic biofuel properties and reactivity analyzed by thermogravimetric analysis (TGA) toward zero carbon scheme: A critical review. *Energy Conversion and Management: X*. 2024 Apr 1;22:100538. doi:10.1016/J.ECMX.2024.100538
110. Călin C, Sîrbu EE, Tănase M, György R, Popovici DR, Banu I. A Thermogravimetric Analysis of Biomass Conversion to Biochar: Experimental and Kinetic Modeling. *Applied Sciences* 2024, Vol 14, Page 9856. 2024 Oct 28;14(21):9856. doi:10.3390/APP14219856
111. Shah YA, Bhatia S, Al-Harrasi A, Oz F, Khan MH, Roy S, et al. Thermal Properties of Biopolymer Films: Insights for Sustainable Food Packaging Applications. *Food*

- Engineering Reviews 2024 16:4. 2024 Jul 6;16(4):497–512. doi:10.1007/S12393-024-09380-8
112. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem.* 2002 Mar 1;31(3):426–8. doi:10.1021/ac60147a030
 113. Chen X, Lei Z, Cao F, Guo Q, Wang J. Extraction, purification of saponins components from *Xanthoceras sorbifolium* Bunge leaves: potential additives in the food industry. *Journal of Food Measurement and Characterization.* 2023 Feb 1;17(1):916–32. doi:10.1007/s11694-022-01669-8
 114. Hiai S, Oura H, Hamanaka H, Odaka Y. A color reaction of panaxadiol with vanillin and sulfuric acid. *Planta Med.* 1975;28(2):131–8. doi:10.1055/S-0028-1097841/BIB PubMed PMID: 1197415.
 115. Blainski A, Lopes GC, De Mello JCP. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules* 2013, Vol 18, Pages 6852-6865. 2013 Jun 10;18(6):6852–65. doi:10.3390/MOLECULES18066852 PubMed PMID: 23752469.
 116. Vilca Pascuali C, Delgado Pineda D, Colina Andrade G, Terán Hilaes R. Microbial exopolysaccharide pullulan-based seed priming combined with *Chlorella vulgaris* enhances salinity tolerance in maize. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2026 42:1. 2026 Jan 8;42(1):35-. doi:10.1007/S11274-025-04774-0 PubMed PMID: 41504947.
 117. Sganzerla WG, Viganó J, Castro LEN, Maciel-Silva FW, Rostagno MA, Mussatto SI, et al. Recovery of sugars and amino acids from brewers' spent grains using subcritical water hydrolysis in a single and two sequential semi-continuous flow-through reactors. *Food Research International.* 2022 Jul 1;157:111470. doi:10.1016/j.foodres.2022.111470 PubMed PMID: 35761701.
 118. Maitra S, Cheng MH, Liu H, Cao VD, Kannan B, Long SP, et al. Sustainable co-production of plant lipids and cellulosic sugars from transgenic energycane at an industrially relevant scale: A proof of concept for alternative feedstocks. *Chemical Engineering Journal.* 2024 May 1;487:150450. doi:10.1016/j.cej.2024.150450
 119. Miranda DA, Carrasco C, Romero-Soto L, Lundqvist J, Sundman O, Hedenström M, et al. Sustainable production of exopolysaccharides from quinoa stalk hydrolysates using halotolerant *Bacillus weizmannii*: fermentation kinetics and product characterization. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining.* 2025 Sep 1;19(5):1326–48. doi:10.1002/BBB.70021
 120. Martín C, Dixit P, Momayez F, Jönsson LJ. Hydrothermal Pretreatment of Lignocellulosic Feedstocks to Facilitate Biochemical Conversion. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022 Feb 16;10:846592. doi:10.3389/FBIOE.2022.846592 PubMed PMID: 35252154.
 121. Bittencourt GA, Vandenberghe LP de S, Valladares-Diestra KK, Soccol CR. Soybean hull valorization for sugar production through the optimization of citric acid pretreatment

- and enzymatic hydrolysis. *Ind Crops Prod.* 2022 Oct 15;186(2):115178. doi:10.1016/j.indcrop.2022.115178
122. Carrasco C, Jönsson LJ, Martín C. Hydrothermal Pretreatment of Water-Extracted and Aqueous Ethanol-Extracted Quinoa Stalks for Enzymatic Saccharification of Cellulose. *Energies* 2021, Vol 14, Page 4102. 2021 Jul 7;14(14):4102. doi:10.3390/EN14144102
 123. Guo H, Zhao Y, Chang JS, Lee DJ. Inhibitor formation and detoxification during lignocellulose biorefinery: A review. *Bioresour Technol.* 2022 Oct 1;361:127666. doi:10.1016/j.biortech.2022.127666 PubMed PMID: 35878776.
 124. Fernández-Sandoval MT, García A, Teymennet-Ramírez K V., Arenas-Olivares DY, Martínez-Morales F, Trejo-Hernández MR. Removal of phenolic inhibitors from lignocellulose hydrolysates using laccases for the production of fuels and chemicals. *Biotechnol Prog.* 2024 Jan 1;40(1). doi:10.1002/BTPR.3406 PubMed PMID: 37964692.
 125. Chipkar S, Smith K, Whelan EM, Debrauske DJ, Jen A, Overmyer KA, et al. Water-soluble saponins accumulate in drought-stressed switchgrass and may inhibit yeast growth during bioethanol production. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 2022 15:1. 2022 Oct 31;15(1):116-. doi:10.1186/S13068-022-02213-Y
 126. Canal C, Ozen B, Baysal AH. Characterization of antimicrobial activities of olive phenolics on yeasts using conventional methods and mid-infrared spectroscopy. *J Food Sci Technol.* 2018 Jan 15;56(1):149. doi:10.1007/S13197-018-3468-4 PubMed PMID: 30728556.
 127. Kimani BG, Kerekes EB, Szebenyi C, Krisch J, Vágvölgyi C, Papp T, et al. In vitro activity of selected phenolic compounds against planktonic and biofilm cells of food-contaminating yeasts. *Foods.* 2021 Jul 1;10(7):1652. doi:10.3390/FOODS10071652/S1
 128. Preechakun T, Pongchaiphon S, Raita M, Champreda V, Laosiripojana N. Detoxification of hemicellulose-enriched hydrolysate from sugarcane bagasse by activated carbon and macroporous adsorption resin. *Biomass Conversion and Biorefinery* 2022 14:13. 2022 Dec 8;14(13):14559–74. doi:10.1007/S13399-022-03596-6
 129. Zhu L, Wang S, Wan F, Zhou Y, Wang Z, Fan G, et al. Quantitative Analysis of *Camellia oleifera* Seed Saponins and Aqueous Two-Phase Extraction and Separation. *Molecules* 2023, Vol 28, Page 2132. 2023 Feb 24;28(5):2132. doi:10.3390/MOLECULES28052132 PubMed PMID: 36903377.
 130. Li C, Liu T, Li X, Gao W, Lv J, Hu G, et al. Review of quinoa fermentation: product diversity, process optimization, and nutritional enhancement. *Front Nutr.* 2025 Sep 16;12:1605558. doi:10.3389/FNUT.2025.1605558/FULL
 131. Xia J, Qiu Z, Ma S, Liu Q, Han R, Liu X, et al. Efficient polymalic acid production from corn straw hydrolysate by detoxification of phenolic inhibitors. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023 Dec 13;11:1339982. doi:10.3389/FBIOE.2023.1339982/TEXT
 132. Tagne RFT, Cruz-Santos MM, Antunes FAF, Shibukawa VP, Miano SB, Kenfack JAA, et al. Pullulan Production from Sugarcane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate by *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023 in Bubble Column Reactor. *Fermentation* 2024, Vol 10, Page 322. 2024 Jun 20;10(6):322. doi:10.3390/FERMENTATION10060322

133. Geng B, Jia X, Peng X, Han Y. Biosynthesis of value-added bioproducts from hemicellulose of biomass through microbial metabolic engineering. *Metab Eng Commun.* 2022 Dec 1;15:e00211. doi:10.1016/J.MEC.2022.E00211 PubMed PMID: 36311477.
134. Gieroba B, Kalisz G, Krysa M, Khalavka M, Przekora A. Application of Vibrational Spectroscopic Techniques in the Study of the Natural Polysaccharides and Their Cross-Linking Process. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol 24, Page 2630. 2023 Jan 30;24(3):2630. doi:10.3390/IJMS24032630 PubMed PMID: 36768949.
135. Erceg T, Mitrović I, Teofilović V, Micić D, Ostojić S. Room-Temperature Synthesis of Pullulan-Based Hydrogels for Controlled Delivery of Microbial Fertilizers. *Polymers* 2025, Vol 17, Page 3323. 2025 Dec 16;17(24):3323. doi:10.3390/POLYM17243323
136. Vedyashkina N, Ignatova L, Brazhnikova Y, Digel I, Stupnikova T. Development of Antimicrobial Wound Healing Hydrogels Based on the Microbial Polysaccharide Pullulan. *Polysaccharides* 2026, Vol 7, Page 7. 2026 Jan 9;7(1):7. doi:10.3390/POLYSACCHARIDES7010007
137. Randriana NR, Randrianomenjanahary AM, Rabeharitsara AT. Trisodium Citrate Synthesis at Ambient Temperature Using Sodium Hydroxide Relatively in Excess and Citric Acid with Ethanol-90 as Solvent. *American Journal of Applied Chemistry* 2021, Volume 9, Page 83. 2021 Jun 25;9(3):83–9. doi:10.11648/J.AJAC.20210903.14
138. Morais MAP, Silva M, Barros M, Halley P, Almeida Y, Vinhas G. Impact of citric acid on guar gum carboxymethylcellulose crosslinked blend films. *J Appl Polym Sci.* 2024 Nov 20;141(44):e56162. doi:10.1002/APP.56162;JOURNAL:JOURNAL:10974628