



Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO Instituto Tecnológico de Veracruz

**Caracterización metabólica y cinética de la levadura autóctona
Pichia kudriavzevii ITV-S42**

Por

M.C. Libia Elena Díaz Nava

Documento predoctoral propuesto como requerimiento parcial
para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Asesores:

Dra. María Guadalupe Aguilar Uscanga

Dr. Noé Montes García

Dra. Patricia G. Mendoza García

Veracruz, Veracruz

2018

RESUMEN

Díaz-Nava, Libia Elena, M.C. Programa de Doctorado en Ciencias en Alimentos. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz. Noviembre, 2018. CARACTERIZACIÓN METABÓLICA Y CINÉTICA DE LA LEVADURA AUTÓCTONA *Pichia kudriavzevii* ITV-S42. Asesores: Aguilar-Uscanga, María Guadalupe, Montes-García, Noé y Mendoza-García, Patricia G.

Pichia kudriavzevii ITV-S42, es una levadura autóctona aislada en el laboratorio de Bioingeniería del Instituto Tecnológico de Veracruz, la cual presenta características deseables en el proceso de producción de etanol, y de la cual se tiene escaso conocimiento del efecto de la fuente de carbono asimilable y fermentable, de los requerimientos nutricionales y del oxígeno sobre su crecimiento y producción de etanol. Con la finalidad de generar conocimiento para concluir sobre el potencial de uso de esta cepa, fue necesario determinar su comportamiento cinético y metabólico. *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 resultó ser capaz de asimilar glucosa, fructosa y glicerol como fuente de carbono, el incremento de las sales y extracto de levadura en el medio de cultivo logró mejorar la tolerancia a etanol hasta 90 g/L, así como una disminución del tiempo de fermentación, además de presentar el efecto Crabtree y el efecto Pasteur, considerado una ventaja al utilizarla de manera industrial. La Actividad Killer de esta cepa se mantuvo durante toda la fermentación, en todas las fuentes de carbono asimilables. Finalmente se caracterizó la cinética de fermentación en jugo de caña de azúcar y jugo de sorgo dulce, donde resultó ser el jugo de sorgo dulce el medio mejor asimilado por la levadura, alcanzando concentraciones de etanol de 23 g/L.

ABSTRACT

Díaz-Nava, Libia Elena, M.C. Doctoral Program in Food Sciences. Veracruz Institute of Technology. Food Research and Development Unit. November, 2018. METABOLIC AND KINETIC CHARACTERIZATION OF THE NATIVE YEAST *Pichia kudriavzevii* ITV-S42. Assesors: Aguilar-Uscanga, María Guadalupe, Montes-García, Noé and Mendoza-García, Patricia G.

Pichia kudriavzevii ITV-S42, is a native yeast isolated in the Bioengineering laboratory of the Technological Institute of Veracruz, which has desirable characteristics in the ethanol production process, and of which there is little knowledge of the effect of the carbon source assimilable and fermentable, of the nutritional and oxygen requirements on its growth and ethanol production. In order to generate knowledge to conclude about the potential use of this strain, it was necessary to determine its kinetic and metabolic behavior. *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 was able to assimilate glucose, fructose and glycerol as a carbon source, the increase in salts and yeast extract in the culture medium improved the tolerance to ethanol up to 90 g/L, as well as a decrease of the fermentation time, besides presenting the Crabtree effect and the Pasteur effect, considered an advantage when using it in an industrial way. Killer Activity of this strain was maintained throughout the fermentation, in all assimilable carbon sources. Finally, the kinetics of fermentation in sugarcane juice and sweet sorghum juice were characterized, where it turned out that the sweet sorghum juice was the best medium assimilated by the yeast, reaching ethanol concentrations of 23 g/L.

Contenido

| | |
|--|-----|
| RESUMEN | i |
| ABSTRACT..... | ii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | vii |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | x |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 3 |
| 2.1. Levaduras | 3 |
| 2.2. Producción de etanol por levaduras..... | 4 |
| 2.3. Materias Primas utilizadas para la producción de etanol | 5 |
| 2.3.1. Sorgo Dulce | 6 |
| 2.4. Requerimientos nutricionales de las levaduras | 9 |
| 2.4.1. Fuente de Carbono | 9 |
| 2.4.2. Fuente de Hidrógeno..... | 10 |
| 2.4.3. Fuente de Oxígeno..... | 11 |
| 2.4.4. Fuente de Nitrógeno..... | 12 |
| 2.4.5. Fuente de Azufre | 12 |
| 2.4.6. Fuente de Fósforo | 13 |
| 2.4.7. Oligoelementos..... | 13 |
| 2.4.8. Factores de crecimiento | 14 |
| 2.5. Adquisición de nutrientes | 14 |
| 2.6. Factores que afectan la fermentación alcohólica | 17 |
| 2.6.1. Inhibición por producto | 17 |
| 2.6.2. Inhibición por sustrato | 19 |
| 2.6.3. Contaminación..... | 20 |
| 2.6.3.1. Actividad Killer en levaduras..... | 21 |

| | |
|--|----|
| 2.7. Metabolismo de las levaduras..... | 23 |
| 2.7.1. Metabolismo respiratorio y fermentativo..... | 26 |
| 2.7.1.1. Metabolismo respiratorio | 26 |
| 2.7.1.2. Metabolismo Fermentativo..... | 27 |
| 2.7.2. Efectos de represión catabólica..... | 29 |
| 2.7.2.1. Efecto Pasteur..... | 30 |
| 2.7.2.2. Efecto Crabtree | 30 |
| 2.7.2.3. Efecto Custer..... | 32 |
| 2.7.2.4. Efecto Kluyver | 33 |
| 2.8. Levaduras del género <i>Pichia</i> | 34 |
| 2.9. <i>Pichia kudriavzevii</i> ITV-S42..... | 36 |
| 3. JUSTIFICACIÓN..... | 38 |
| 4. OBJETIVOS | 39 |
| 4.1. Objetivo general..... | 39 |
| 4.2. Objetivos específicos..... | 39 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS | 40 |
| 5.1. Material Biológico..... | 40 |
| 5.2. Medios de cultivo | 40 |
| 5.2.1. Medio de conservación | 40 |
| 5.2.2. Medio de fermentación..... | 40 |
| 5.2.3. Medio para la determinación de la Actividad Killer | 41 |
| 5.3. Metodología | 42 |
| 5.3.1. Condiciones de fermentación | 42 |
| 5.3.1.1. Activación y preinóculo..... | 42 |
| 5.3.1.2. Evaluación de la fermentación con diferentes fuentes de carbono | 42 |

| | |
|--|----|
| 5.3.2. Determinación de la Actividad Killer | 43 |
| 5.3.3. Fermentaciones en cultivo por lote en reactor | 43 |
| 5.3.4. Evaluación del efecto del oxígeno sobre la producción de etanol y de biomasa | 43 |
| 5.3.5. Fermentaciones en cultivo lote alimentado | 44 |
| 5.3.5.1. Determinación del coeficiente global de transferencia de oxígeno (k_{La}) .. | 45 |
| 5.3.5.2. Cálculo de la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) | 47 |
| 5.4. Métodos analíticos | 47 |
| 5.4.1. Análisis de la biomasa..... | 47 |
| 5.4.2. Cuenta celular | 48 |
| 5.4.3. Viabilidad celular | 49 |
| 5.4.4. Análisis de formación de producto y consumo de sustrato | 50 |
| 5.5. Análisis de datos experimentales..... | 51 |
| 5.5.1. Balance de Carbono..... | 51 |
| 5.5.2. Rendimiento y productividad..... | 53 |
| 5.5.3. Velocidades Globales..... | 54 |
| 5.5.4. Velocidades específicas..... | 55 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 56 |
| 6.1. Evaluación del efecto de la fuente de carbono sobre la producción de etanol y el crecimiento celular..... | 56 |
| 6.2. Determinación de la Actividad Killer en las fuentes de carbono asimilables | 63 |
| 6.3. Evaluación del efecto del enriquecimiento del medio de cultivo con nutrientes sobre la producción de etanol..... | 65 |
| 6.4. Evaluación del efecto del oxígeno y la concentración de sustrato sobre el crecimiento celular y la producción de etanol de <i>Pichia kudriavzevii</i> ITV-S42 | 74 |

| | |
|--|----|
| 6.5. Evaluación del efecto del oxígeno y del medio de cultivo sobre la producción de etanol y el crecimiento celular. | 84 |
| 7. CONCLUSIONES | 89 |
| 8. RECOMENDACIONES..... | 90 |
| 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 91 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. Estructura típica de levadura | 3 |
| FIGURA 2. Cultivo típico de sorgo dulce. | 7 |
| FIGURA 3. Esquema de diferentes vías metabólicas en levaduras (Flores <i>et al.</i> , 2000). | 24 |
| FIGURA 4. Proceso de fermentación alcohólica por medio de microorganismos (Nielsen, 2003). | 28 |
| FIGURA 5. Esquema de las vías de ramificación del piruvato (Adaptado de Rodrigues <i>et al.</i> ,2006). | 32 |
| FIGURA 6. Curva de correlación D.O-peso seco de la levadura <i>Pichia kudriavzevii</i> ITV S-42. | 48 |
| FIGURA 7. Cámara de Thoma (Distribución de cuadrícula). | 49 |
| FIGURA 8. Efecto del consumo de glucosa (a) y fructosa (b),sobre el crecimiento celular y la producción de etanol de <i>Pichia kudriavzevii</i> ITV-S42 | 56 |
| FIGURA 8. Continua | 57 |
| FIGURA 9. Influencia de la fuente de carbono glucosa: (◆) y fructosa (■) sobre las velocidades específicas | 58 |
| FIGURA 10. Influencia de la fuente de carbono carbono: glucosa (◆) y fructosa (■) sobre rendimientos (a) y productividades (b). | 59 |
| FIGURA 11. Efecto del consumo de glicerol (●) sobre el crecimiento celular(■) de <i>Pichia kudriavzevii</i> ITV-S42 | 62 |
| FIGURA 12. Actividad Killer en la levadura <i>Pichia kudriavzevii</i> ITV-S42 creciendo en diferentes fuentes de carbono (comparada con cepa de referencia) | 64 |
| FIGURA 13. Efecto del enriquecimiento del medio de cultivo con extracto de levadura (● 1 g/L y ■ 2 g/L) sobre el consumo de glucosa y la producción de etanol. | 66 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 14. Efecto del enriquecimiento del medio de cultivo con sales (●MS y ■MSE1), sobre el consumo de glucosa (a), la producción de etanol (b) y crecimiento celular (c). | 68 |
| FIGURA 15. Efecto del enriquecimiento del medio de cultivo con sales y extracto de levadura (■MSE1 y ▲MSE2) sobre el consumo de glucosa (a), la producción de etanol (b) y crecimiento celular (c). | 70 |
| FIGURA 16. Efecto del enriquecimiento del medio de cultivo con nutrientes a diferentes concentración de sustrato (▲MSE2 y ◆ MSE3) sobre el consumo de glucosa (a) la producción de etanol (b) y el crecimiento celular (c). | 72 |
| FIGURA 17. Efecto del oxígeno sobre el crecimiento celular, producción de etanol y ácido acético por la levadura <i>Pichia kudriavzevii</i> ITV-S42 en un medio de cultivo aireado (●) y sin aireación (■) con 30 g/L de glucosa | 75 |
| FIGURA 18. Balances de carbono a diferentes tiempos de fermentación para un cultivo aireado (a) y limitado de oxígeno (b) con 30 g/L de glucosa inicial. Glucosa residual (■), Etanol (■), Glicerol (■), Biomasa (■) y CO ₂ (■) | 77 |
| FIGURA 19. Efecto del oxígeno y diferentes concentraciones de sustrato (a) 1g/L; (b) 5 g/L; (c) 10 g/L sobre la producción de etanol (▲) y el crecimiento celular (■) | 80 |
| FIGURA 20. Rendimientos de etanol (■) y biomasa (■) alcanzados por <i>Pichia kudriavzevii</i> ITV-S42 en fermentaciones aerobias a diferentes concentraciones de sustrato | 81 |
| FIGURA 21. Balances de carbono a diferentes tiempos de fermentación para un cultivo aireado de <i>Pichia kudriavzevii</i> ITV-S42 cultivado en 1 g/L (a) y 10 g/L (b) de glucosa | 82 |
| FIGURA 21. Continua | 83 |

FIGURA 22. Evaluación del cocultivo de *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 y *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 en jugo de sorgo dulce sobre el consumo de azúcares fermentables (a), producción de etanol (b) y biomasa (c) a diferentes tiempos de fermentación. Tiempo de inóculo: T0 (▲), T12 (■) y T24 (●)

88

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| TABLA 1. Composición promedio del jugo de sorgo dulce (Ariyajarearnwong <i>et al.</i> , 2011). | 8 |
| TABLA 2. Clasificación de las levaduras según su capacidad fermentativa (Scheffers, 1987). | 29 |
| TABLA 3. Composición del medio de conservación. | 40 |
| TABLA 4. Composición del medio de cultivo de fermentación a nivel matraz | 41 |
| TABLA 5. Medio para la determinación de la actividad Killer. | 41 |
| TABLA 6. Condiciones de cultivo para lote alimentado | 45 |
| TABLA 7. Composición de los medios enriquecidos evaluados. | 67 |
| TABLA 8. Parámetros cinéticos y estequiométricos de <i>Pichia kudriavzevii</i> ITV-S42 en diferentes medios enriquecidos a las 12 h de fermentación | 73 |
| TABLA 9. Rendimientos y concentraciones máximas de etanol y biomasa de <i>Pichia kudriavzevii</i> ITV-S42 en medios limitados y no limitados de oxígeno | 78 |
| TABLA 10. Concentraciones máximas obtenidas de etanol y biomasa; rendimiento de etanol (Y_p/s), rendimiento de biomasa (Y_x/s) y productividad (Q_p) utilizando jugo de caña de azúcar y jugo de sorgo dulce bajo distintas condiciones de cultivo | 86 |

1. INTRODUCCIÓN

Las levaduras son microorganismos que han sido objeto de estudio durante muchos años, debido a la importancia que representan en diversas áreas biotecnológicas tales como: la industria de la fermentación, tecnologías ambientales, industria alimentaria y química, industria farmacéutica, entre otras (Walker, 1998). Actualmente, el aprovechamiento de las levaduras impacta de manera significativa en relación a la generación de energías renovables, particularmente en procesos fermentativos para la producción de biocombustibles.

Con respecto a los biocombustibles, el bioetanol se ha posicionado como una alternativa energética no contaminante y renovable. La producción de bioetanol a nivel industrial, es llevada a cabo a través de la vía fermentativa empleando diferentes tipos de materias primas ricas en azúcares. Entre las que destaca el sorgo dulce, el cual ha sido considerado como una opción viable debido a las características que posee tales como: la resistencia a diferentes tipos de suelos, a su alto contenido de azúcares fermentables, entre otros (Almodares *et al.*, (2009).

Puesto que, las fermentaciones alcohólicas son llevadas a cabo principalmente por levaduras, se han reportado características deseables en cepas de levaduras productoras de etanol, como son principalmente; la osmotolerancia, la termotolerancia, tolerancia a compuestos tóxicos y cepas que presenten actividad Killer (toxina que produce muerte celular a levaduras sensibles)(Panchal, 1990).

En la actualidad, especies de levaduras denominadas no-*saccharomyces* han destacado debido a su contribución en el proceso de fermentación alcohólica, destacando en ellas el género *Pichia*, dentro del cual se encuentra la levadura *Pichia kudriavzevii* ITV-S42, la cual ha sido aislada durante la fermentación espontánea de jugo de sorgo dulce y presenta características importantes en el proceso fermentativo.

No obstante, las características metabólicas específicas, las cuales representan el criterio principal para determinar su utilidad en los procesos industriales no han sido estudiadas tan detalladamente como en otras especies.

Con base en el metabolismo de las levaduras, existen diferentes fuentes de carbono que pueden ser asimiladas para su crecimiento o para la producción de algún metabolismo de interés, y que dependiendo de la disponibilidad de oxígeno y concentración de azúcares éstas pueden dirigir su metabolismo hacia respiración o fermentación bajo los efectos de represión catabólica.

Por todo lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo principal: caracterizar metabólica y cinéticamente, la levadura *Pichia kudriavzevii* ITV-S-42. En el capítulo dos se presentan los antecedentes relacionados con las generalidades de la levadura *Pichia kudriavzevii* ITV-S-42, el metabolismo respiratorio y fermentativo de las levaduras y los efectos de represión catabólica que se encuentran presentes en las fermentaciones alcohólicas.

Posteriormente la metodología y resultados de la evaluación del comportamiento metabólico y cinético de la levadura *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 en diferentes sustratos (glucosa, xilosa, sacarosa, fructosa y glicerol) en medio sintético y la evaluación de los efectos de la concentración de oxígeno y sustrato sobre la producción de biomasa y etanol en medio sintético utilizando un reactor de 2L; así como la caracterización de la cinética de producción de etanol y biomasa de la levadura *Pichia kudriavzevii* ITV-S42, en jugo de caña de azúcar y sorgo dulce.

2. ANTECEDENTES

2.1. Levaduras

Las levaduras están definidas como hongos unicelulares aerobios, formadoras de colonias (Bonaly *et al.* 1985) (Figura 1); presentan gran diversidad en relación a su tamaño, algunas especies pueden medir solo 2-3 μm , mientras que otras pueden alcanzar longitudes de 20-50 μm .

Con respecto a su morfología, estas pueden ser: elipsoidales u ovoides, cilíndricas, curvadas, filamentosas, esféricas o alargadas (dependiendo las condiciones de crecimiento). Están delimitadas por envoltura celular, considerado como la estructura que rodea y encierra el citoplasma de la levadura; ocupando alrededor del 15% del volumen de la célula; esta envoltura juega un papel fundamental controlando las propiedades osmóticas y permeables de la célula (Walker, 1998).

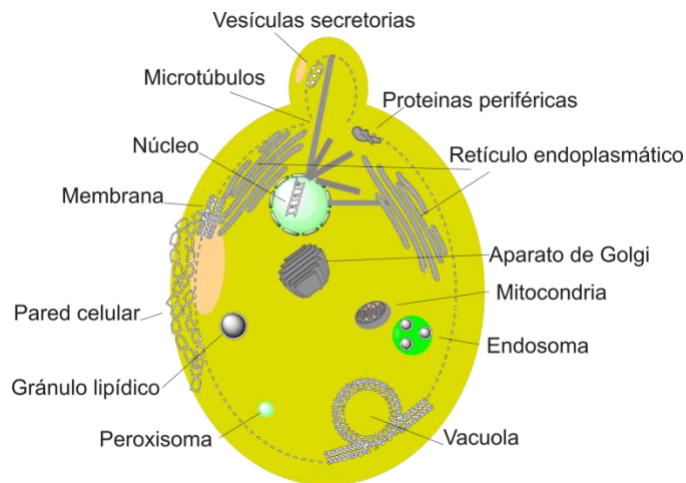


FIGURA 1. Estructura típica de levadura

Además, las levaduras se han convertido en sistemas de modelos importantes para la investigación básica sobre la célula eucariota, así como de estudios detallados en cuanto a su fisiología, revelaron aspectos importantes de respiración y fermentación, en particular acerca de la regulación del metabolismo de la glucosa (Bonaly *et al.* 1985)

La fisiología de las levaduras puede ser definida, como el entendimiento de crecimiento y metabolismo de las células (Walker, 1998) . Conocer la fisiología de las levaduras se considera de gran importancia, ya que en base a ello, se pueden establecer las condiciones de operación para el proceso biotecnológico de interés.

El impacto que generan estos microorganismos, se extiende más allá de los productos populares como el pan, la cerveza y el vino. En los últimos años, han incursionado en diversas aéreas biotecnológicas, como la industria química, la industria alimentaria, industria farmacéutica, tecnologías ambientales, las fermentaciones alcohólicas y biocombustibles.

2.2. Producción de etanol por levaduras

Las fermentaciones alcohólicas se ven afectadas por diversos factores tales como: las condiciones ambientales (pH, temperatura, aireación), el modo de operación del bioreactor (lote, lote alimentado y continuo), los requerimientos nutricionales (fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, suplementarlos con algunas vitaminas y sales), y por último, el microorganismo empleado; el proceso de producción de etanol, es llevado a cabo por algunas bacterias, hongos y principalmente por levaduras.

Por tal motivo se busca, que las levaduras presenten características deseables con el fin de promover las mejoras en los procesos fermentativos. Estas características son: la fácil propagación, genéticamente estables, resistentes a etanol, osmotolerantes, termotolerantes, resistentes a compuestos tóxicos, capaces de utilizar diferentes sustratos, ácido tolerantes y que presenten actividad Killer (Panchal *et al.*, 1980).

A pesar de que *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura más comúnmente estudiada y utilizada en los procesos fermentativos, se ha encontrado que algunos tipos de levaduras denominadas como no-*Saccharomyces* han adquirido relevancia en las fermentaciones alcohólicas, aunque su uso a nivel industrial es aun limitado debido a que no compiten en cuanto a tolerancia a etanol, osmotolerancia y actividad killer con respecto a *Saccharomyces* (Jolly *et al.*, 2006).

La producción de etanol por vía fermentativa, se realiza es a partir de una gran variedad de materias primas ricas en carbohidratos (Aristidou y Penttilä, 2000). Esto ha impactado en la búsqueda de nuevas fuentes de carbono, que logren la producción de etanol de manera renovable y no contaminante.

2.3. Materias Primas utilizadas para la producción de etanol

En los últimos años, la tecnología industrial se ha basado en el uso de materias primas con alto contenido de azúcares fermentables, almidón y residuos lignocelulósicos, como sustratos iniciales para la producción de etanol de primera y segunda generación (Vázquez y Dacosta, 2007)(Almodares y Hadi, 2009) .Estas de materias primas utilizadas para la producción de etanol, pueden clasificarse en tres grupos.

•**Con alto contenido de Azúcares.** El jugo que se obtiene de estas plantas (la caña de azúcar, la melaza, el sorgo dulce, remolacha azucarada, etc.) puede ser fermentado directamente para la obtención de etanol.

•**Con alto contenido de Almidón.** Los almidones contienen carbohidratos de mayor complejidad molecular como el maíz, trigo, cebada, yuca y papa, necesitan ser transformados en azúcares más simples mediante un proceso de sacarificación, introduciendo un paso adicional en la producción de etanol.

•**Con alto contenido de celulosa.** La cual está presente en la madera, residuos agrícolas y forestales. Las materias primas ricas en celulosa son las más abundantes, sin embargo, la complejidad de sus azúcares hacen que la conversión a carbohidratos fermentables sea más complicada que en el caso del almidón. Los biocombustibles obtenidos a partir de biomasa lignocelulósica son denominados de "segunda generación" ya que son producidos a partir de materias primas que no son fuentes alimenticias, para lo cual se utilizan tecnologías que todavía están en etapas de investigación y desarrollo y con costos de producción aún muy elevados (Sánchez y Cardona, 2005).

2.3.1. Sorgo Dulce

El sorgo dulce (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) (Figura 2), originario del este de África, perteneciente a la familia de las gramíneas, con una altura aproximada de 1 a 3 metros en dependencia de la subespecie, es un cultivo de alta eficiencia fotosintética, debido a su metabolismo C4 fotosintético que permite que el sorgo acumule CO₂ durante la noche, reduzca la tasa de la fotorrespiración en presencia de luz y disminuya la pérdida de agua a través del estoma (Keeley y Rundel, 2003).

Algunas notables características que lo hacen atractivo para el uso de este cultivo como materia prima en procesos fermentativos son: la resistencia a la salinidad, a las inundaciones y sequía, presenta de 2 a 3 cosechas por año, la cantidad de fertilizante que requiere es mucho menor en comparación con la caña de azúcar y el maíz, cultivos que se utilizan actualmente como materias primas para la producción de biocombustible. Como resultado, el sorgo es extremadamente eficiente en el uso de agua, de dióxido de carbono, los nutrientes y la luz solar (Serna-Saldívar, 2010).



FIGURA 2. Cultivo típico de sorgo dulce.

Otro aspecto a considerar, es la composición del tallo del sorgo dulce, el cual presenta un alto contenido de carbohidratos y azúcares fermentables (16-23% °Brix), que lo convierten en la principal alternativa para la producción de etanol.

El jugo extraído del tallo, contiene diferentes tipos de azúcares, como: sacarosa, glucosa, fructosa, maltosa y xilosa (Almodares *et al.*, 2008), los cuales, al fermentarse, pueden producir aproximadamente 74 litros de etanol por tonelada de caña (Smith y Frederiksen, 2000).

La concentración de azúcares fermentables presentes en este jugo dependerá de diversos factores como: variedad de cultivo, temporada de cosecha, etapa de madurez, entre otros factores agronómicos (Mamma *et al.*, 1996; Phowchinda *et al.*, 1997). En la Tabla 1 se presenta la composición promedio del jugo de sorgo.

TABLA 1. Composición promedio del jugo de sorgo dulce (Ariyajarearnwong *et al.*, 2011).

| Componente | Jugo concentrado de sorgo dulce |
|---------------------------------|--|
| Total de sólidos solubles (°Bx) | 75 |
| Nitrógeno (%) | 0.276 |
| Fosfato (%) | 0.164 |
| Potasio (%) | 5.0550 |
| Sodio (%) | 0.394 |
| Calcio (%) | 0.064 |
| Magnesio (%) | 0.0638 |
| Fierro (%) | 0.0004 |
| Manganeso (%) | 0.0003 |
| Cobre (%) | 0.0002 |
| Zinc (%) | 0.0023 |
| Azufre (%) | 0.0230 |

Existen grandes variedades de sorgo, y pueden ser clasificado en 3 grandes grupos dependiendo el uso final que se otorgue: sorgo grano utilizado como alimento para humanos y animales, forrajero, para forraje de ganado y dulce, donde el jugo de este es empleado para producir etanol. Recientemente, se creó una nueva categoría de sorgo denominado de alta biomasa, utilizada principalmente para producción de etanol de segunda generación. (Almodares *et al.*, 2008).

Por todo lo anterior, el sorgo dulce está siendo considerado como una de las materias primas alternativas de gran importancia a nivel mundial para la producción de etanol (Almodares *et al.*, 2008).

2.4. Requerimientos nutricionales de las levaduras

Con respecto a las levaduras y su empleo en las fermentaciones alcohólicas, se debe tener en cuenta diversos aspectos nutricionales para promover el crecimiento celular y mantener la viabilidad en valores elevados.

La nutrición de levaduras se refiere de manera general a la utilización de fuentes de elementos esenciales para llevar a cabo su proceso metabólico. La importancia que tiene los requerimientos nutricionales y la adquisición de nutrientes, junto con la regulación de transporte de estos, no es solo para lograr cultivos exitosos de levaduras en los laboratorios, sino para optimizar procesos industriales (Walker 1998).

Dependiendo de los nutrientes incluidos o ausentes del medio de fermentación se contribuye de manera importante a la protección de las células, cuando esta es expuesta a factores de estrés, lo que influye directamente en la tasa de crecimiento, la degradación de sustrato y los cambios sobre el producto final (Sablayrolles *et al.*, 1996).

No obstante, ya que existe una gran diversidad de levaduras, estas presenta requerimientos nutricionales diferentes, aunque es posible mencionarlos de manera general como: carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, oligoelementos y factores de crecimiento (Ortíz-Muñiz *et al.*, 2010).

2.4.1. Fuente de Carbono

La levaduras son organismos quimiorganotrofos, debido a que obtienen su energía y fuente de carbono, a partir de compuestos orgánicos, generalmente azúcares.

Son capaces de emplear un amplio rango de sustratos entre hexosas, pentosas, disacáridos y oligosacáridos, así como etanol, acetato, glicerol, entre otros; siendo la glucosa su fuente de carbón preferida, la cual metaboliza a etanol mediante la glucólisis y el metabolismo anaeróbico del piruvato (Dickinson 2003).

Aunque la glucosa es el azúcar mas metabolizable por las levaduras, en realidad generalmente manifiesta efectos de inhibición y de represión en la asimilación de otros azúcares (Walker,1998).

Una pequeña porción aproximadamente el 5% de sus requerimientos de carbono pueden ser reincorporados como CO₂, tal fijación es necesaria en reacciones anapleróticas reemplazando ácidos dicarboxílicos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos empleados para la síntesis de purinas, pirimidinas y ácidos grasos(Walker,1998).

2.4.2. Fuente de Hidrógeno

Los iones hidrógeno son muy importantes en la fisiología de las células de levadura, ya que variaciones en el pH intracelular y extracelular pueden influenciar significativamente en el crecimiento y metabolismo celular.

Generalmente las levaduras crecen bien cuando el pH inicial en el medio se encuentra entre 4-6, aunque existen especies capaces de crecer en rangos de pH de 2-8. Además que la producción de etanol puede ser sensible a alteraciones en el pH del medio de cultivo (Walker,1998).

2.4.3. Fuente de Oxígeno

Las levaduras son organismos aerobios, algunas son estrictamente aerobias y otras facultativas. Las facultativas crecen en presencia de oxígeno y bajo condiciones anaerobias, lo hacen lentamente. En tanto las aerobias estrictas son conocidas también como oxidativas (García-Cortes, 2004).

Es preciso señalar, que no existen levaduras anaerobias estrictas, ya que estos microorganismos requieren de oxígeno para llevar a cabo la biosíntesis de esteroides y ácidos grasos insaturados de la membrana citoplasmática de la levadura. Estos componentes son responsables de la resistencia al alcohol de las levaduras al final de la fermentación. Las levaduras necesitan una cantidad entre 5 y 10 mg/l de oxígeno (Walker, 1998).

Específicamente las levaduras necesitan de oxígeno para la oxidasa de función mixta que convierte el 2,3 epóxido de escualeno a lanosterol. Los requerimientos de ergosterol y ácido oleico para levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, disipa el concepto que esta levadura pueda crecer en anaerobiosis (Walker, 1998).

El oxígeno podría ser considerado un factor de crecimiento importante para las levaduras. Además de que la disponibilidad de oxígeno, y la concentración de azúcares, son factores que dirigen al metabolismo de los carbohidratos hacia la respiración celular o hacia la fermentación alcohólica, bajo los efectos de represión catabólica.

2.4.4. Fuente de Nitrógeno

Aunque no todas las levaduras pueden fijar el nitrógeno molecular, estas pueden utilizarlo de forma orgánica o inorgánica; como en el caso del sulfato de amonio o el sulfato diamónico, los cuales son comúnmente utilizados como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo de crecimiento.

El ion amonio es utilizado por las levaduras para formar ácido glutámico, el cual actúa como donador de un grupo amino para la síntesis de aminoácidos (Aguilar, 1998).

La habilidad que tienen ciertas levaduras para asimilar sustratos, ha sido empleada como criterio de clasificación taxonómica entre ciertos géneros. *Hansenula* y *Brettanomyces* son consideradas nitrato-positivo, mientras que *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Pichia* han sido clasificadas como nitrato-negativo (Aguilar, 1998; Walker, 1998).

Se debe tener en consideración los tiempos de adición de nitrógeno desde la inoculación, ya que el nutriente es metabolizado y utilizado para el crecimiento mismo de las levaduras. mientras que si es empleado al comienzo de la fase estacionaria, será utilizado para mantener o reactivar la síntesis de proteínas para varias funciones como el transporte de azúcar. La presencia de amonio se asocia a la activación de la fosfofructoquinasa al inicio de la glicólisis (Manginot *et al.*, 1998).

2.4.5. Fuente de Azufre

El azufre es empleado por las levaduras para la biosíntesis de aminoácidos azufrados (Ortiz-Muñoz *et al.*, 2010).

Diferentes fuentes de azufre pueden ser utilizadas por las levaduras, estas son : sulfatos, sulfitos, tiosulfatos, metionina y glutatión. No obstante, el sulfato inorgánico y la metionina son compuestos centrales para el metabolismo del azufre en levaduras; en tanto que la metionina es el aminoácido más efectivamente usado en la nutrición de levaduras (Walker, 1998).

Aguilar (1998), reportó que casi todas las levaduras tienen la capacidad de sintetizar aminoácidos azufrados a partir del sulfato.

2.4.6. Fuente de Fósforo

El fósforo es indispensable para el crecimiento de levaduras, debido a que se encuentra presente en ácidos nucleicos y en fosfolípidos. Es asimilado por las levaduras en forma de ortofosfato monovalente, este actúa como sustrato y efector de varias enzimas involucradas en la transducción de energía. Además, participa en la síntesis de lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos; también mantiene la integridad de la pared celular (Walker, 1998; Ortiz-Muñoz *et al.*, 2010).

Theobald *et al.* (1996) establece que aunque los niveles de fósforo en el citosol sean bajos, estos llegan a fluctuar dependiendo del modo del catabolismo de azúcares adoptado por las levaduras; puesto que se observa un aumento dramático en los niveles de fosfato intracelular durante un pulso de glucosa en el medio, empleando levaduras que presentan el efecto Crabtree.

2.4.7. Oligoelementos

Los oligoelementos o también conocidos como elementos traza, son requeridos en cantidades micromolares o en ocasiones nanomolares para apoyar el crecimiento, desarrollo y función óptima de las levaduras.

Los elementos traza nutricionalmente importantes incluyen: manganeso, calcio, cobre, hierro, cobalto, níquel, molibdeno y zinc.

Actúan generalmente como cofactores de diversas enzimas implicadas en el metabolismo de levaduras. Algunos elementos aceptan o donan electrones en reacciones de óxido-reducción, que son de gran importancia en la generación y utilización de energía metabólica (Gost y Villa, 1993).

La cantidad adecuada del elemento garantiza el desempeño de las funciones biológicas de la levadura. Si esta concentración llegara a sobrepasar los valores normales, el elemento puede manifestar características tóxicas.

2.4.8. Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento son compuestos orgánicos requeridos en bajas concentraciones para llevar a cabo una función específica estructural o catalítica en levaduras. Son fácilmente asimilables y de rápido consumo al inicio de la fermentación; sin embargo, no son sintetizados por el microorganismo.

Estos factores están divididos básicamente en 3 grupos: 1) aminoácidos esenciales precursores de proteínas, 2) bases púricas y pirimídicas y 3) vitaminas, las cuales actúan como coenzimas o precursores de coenzimas (Montoya-Villafane, 2008). En las levaduras, los factores más empleados son: vitaminas (biotina, tiamina y piridoxina) y esteroides (ergosterol) (Walker,1998).

2.5. Adquisición de nutrientes

La estructura que define la célula y permite mantener diferencias entre el contenido de ésta y el medio que la rodea, es la membrana plasmática.

A través de ella pasan al interior celular los nutrientes, se expulsan los productos residuales y se secretan algunas proteínas (Riballo-Fernández, 1995).

Existen diversos mecanismos en las células de levadura para facilitar el transporte de azúcares a través de la membrana plasmática, puesto que las membranas en levaduras no son libremente permeables para azúcares altamente polares; por tal motivo que el primer paso del catabolismo de estos carbohidratos tiene como objetivo el transporte de tales compuestos a través de la membrana plasmática. De hecho la regulación de estos transportadores es una de las principales estrategias que emplea *Saccharomyces* para adaptarse a los cambios del medio (Walker, 1998).

En el sistema de transporte de glucosa, participan un elevado número de proteínas capaces de transportar fructosa y manosa además de glucosa (Lagunas,1993), este transporte alcanza el equilibrio y no es acumulativo; así como durante el transporte no hay consumo de energía y la fosforilación acompaña a la glucosa al entrar a la célula (Walker,1998) . El transporte es catalizado por sistemas específicos que son denominados permeasas. Se han caracterizado diferentes permeasas en levaduras, existiendo diferencias en sus propiedades para diferentes tipos de azúcares (Gancedo & Serrano, 1989).

El transporte activo de solutos en la membrana plasmática es regulado por la actividad de la bomba de protones de la ATPasa, esta enzima participa bombeando protones del citoplasma al exterior para regular el pH intracelular que disminuye durante el crecimiento celular, generando un gradiente electroquímico necesario para el ingreso de nutrientes a la célula(Lagunas,1993).

En *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado 20 transportadores de hexosas (*HXT*) que difieren en su abundancia y afinidad para ciertas hexosas (Bisson y Coons, 1993; Kruckeberg,1996).

Por ejemplo posee tres enzimas capaces de fosforilar glucosa: hexoquinasa PI (*HXK1*), hexoquinasa PII (*HXK2*) y la glucoquinasa (*GLK1*).

La glucoquinasa también cataliza la fosforilación de manosa, pero no de fructosa, y las hexoquinasas fosforilan manosa, así como la fructosa y glucosa (Bisson y Coons, 1993).

Considerando el transporte de pentosas por levaduras, este depende al igual que con las hexosas, de la especie de levadura y de su condición nutricional. Las pentosas son generalmente transportadas hacia el interior de la célula por la generación de un potencial de membrana debido a un proton-simport (transporte simultáneo de una molécula no cargada y de un catión en la misma dirección, por un mismo transportador), aunque la difusión facilitada puede intervenir en sistemas de baja afinidad (Singh y Mishra, 1995).

La presencia de glucosa inhibe el consumo de xilosa en las levaduras fermentadoras de pentosas, asegurando el uso preferente de la glucosa en medios complejos como los hidrolizados hemicelulósicos.

Ciertos disacáridos no son transportados por permeasas al interior de la célula; no obstante, la capacidad de hidrolizar tales compuestos dependerá de la especie de la levadura y de la naturaleza del azúcar. La hidrólisis de estos disacáridos es realizada en el espacio periplasmático o dentro de la célula después de su transporte (Flores *et al.*, 2000).

En tanto, la sacarosa es un azúcar fácilmente fermentado por levaduras, se ha reportado que ciertas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* tienen un simport sacarosa-protón; aunque este disacárido debe primero convertirse en glucosa y fructosa antes de ingresar a la célula, por medio de una invertasa periplásmica.

La expresión del gen de la invertasa (*SUC2*) es reprimido en presencia de glucosa y expresado cuando esta se encuentra en concentraciones bajas (Walker,1998).

2.6. Factores que afectan la fermentación alcohólica

Existen factores que limitan los procesos de fermentación alcohólica de manera industrial, como es el caso de la exposición de las levaduras a altas concentraciones de etanol (Ortiz-Zamora, 2006), o cuando se encuentran inmersas en medios con altas concentraciones de azúcares. Esto conlleva a la inhibición en el crecimiento celular y de producción de etanol, afectando con ello los rendimientos y la productividad en el proceso fermentativo. Además, debido a que las fermentaciones industriales no se realizan en medios estériles, se presentan problemas por la contaminación de otros microorganismos en el medio de fermentación, lo cual genera la producción de metabolitos secundarios y de compuestos tóxicos, como el ácido acético que provocan la muerte celular de la levadura implementada (Aguilar-Uscanga, 1998).

2.6.1. Inhibición por producto

La acumulación de grandes cantidades de etanol mientras se lleva a cabo el proceso de fermentación, ha representado un problema para las industrias productoras de etanol. Este metabolito actúa inhibiendo el crecimiento y capacidad fermentativa en las levaduras, las cuales dependiendo de la cepa que se trate, difieren en su capacidad para tolerar diferentes niveles de etanol, aunque muchas cepas de levaduras permanecen viables en presencia de concentraciones de etanol (3-4 % p/v) que son letales para otros microorganismos. (Casey e Ingledew, 1986).

Ingram y Buttke (1984) señaló que existen dos hipótesis básicas para explicar el mecanismo inhibitorio del etanol: inhibición por producto final de las enzimas glicolíticas y el deterioro de la membrana plasmática.

La desnaturalización de proteínas y enzimas glicolíticas por efecto del etanol ha sido estudiada por diversos autores, encontrando que muchas de estas enzimas eran inhibidas (Nagodawithana *et al.*, 1977). Además observaron una inhibición no competitiva entre la velocidad de crecimiento y la producción de etanol, lo cual puede predecir el patrón cinético para estas inhibiciones, pudiendo reflejar, el efecto que tiene el etanol sobre la enzima específica de la glucólisis que presente mayor sensibilidad hacia éste, una enzima que comúnmente sugiere esta inhibición es la hexoquinasa.

Navarro *et al.* (1978), realizó un estudio con *Saccharomyces carlsbergensis*, en el cual utilizó cada uno de los intermediarios glucolíticos, desde la glucosa hasta gliceraldehído-3-fosfato como sustrato de inicio en el proceso de fermentación alcohólica. Sólo cuando se utilizó glucosa se redujo significativamente la velocidad fermentación, lo cual sugirió que la hexoquinasa era la enzima glucolítica más sensible al etanol.

Sin embargo, la estructura de la membrana plasmática parece ser parte fundamental en el transporte del etanol hacia la célula, debido a que es el sitio de control de transporte de nutrientes y la excreción de productos de desechos en el medio circundante. Los ácidos grasos insaturados y esteroides en la membrana plasmática de levaduras son importantes para mejorar la tolerancia a etanol y la producción de metabolitos en diversos microorganismos, ya que estos ácidos grasos se requieren como factores de crecimiento para las células.

2.6.2. Inhibición por sustrato

Las altas concentraciones de sustrato en el medio de fermentación inhiben el crecimiento celular y la actividad fermentativa de las levaduras como resultado de la alta presión osmótica y la baja actividad de agua (Casey e Ingledew, 1986).

Dicha inhibición se explica por un fenómeno de ósmosis: si una célula de levadura se encuentra en una disolución de azúcar de presión osmótica más fuerte que la del contenido de sus vacuolas, la célula será más o menos plasmolizada (Brown y Oliver, 1982), es decir, cuando las condiciones del medio extracelular tienen una concentración mayor que la que existe en el interior celular (hipertónicas), el agua que hay dentro de la célula sale al medio hipertónico (ósmosis) y la célula se deshidrata, ya que pierde el agua que la llenaba, reduciendo así su tamaño.

Cuando la concentración de azúcar inicial es elevada, la fase lag se prolonga, la viabilidad celular durante la fase lag disminuye y los recuentos de células viables durante la fermentación dan valores bajos, es decir la fermentación se retarda y quedan elevados niveles de azúcar residual.

La naturaleza del azúcar también es importante. Por ejemplo, la inhibición por sustrato en fermentaciones con concentraciones iguales de glucosa y sacarosa, la presión osmótica ejercida por la glucosa es 1.73 veces mayor que la de la sacarosa (Casey e Ingledew, 1986).

Ingledew (1995), con un suplemento de nutrientes en el medio, ha enfrentado los inconvenientes de la presión osmótica y ha logrado fermentar mostos de cereales, cuyos contenidos de azúcares reductores son superiores a 300g/L, obteniendo rendimientos alcohólicos de hasta 23% (v/v).

2.6.3. Contaminación

Debido a que los procedimientos industriales en las fermentaciones alcohólicas industriales no son estériles (preparación de mosto, limpieza, etc.), pueden permitir el desarrollo de otros tipos de microorganismos que compiten por los azúcares, produciendo compuestos orgánicos indeseables para la calidad final del alcohol, que a su vez resultan ser tóxicos para las levaduras (Camargo *et al.*, 1990).

Los ácidos orgánicos de mayor importancia en los procesos fermentativos son el láctico y el acético. El ácido láctico es inhibitorio en la producción de etanol cuando se encuentra en concentraciones que superan 0.8% p/v y el acético por encima de 0.05% p/v. El primero es producido principalmente por bacterias ácido lácticas, mientras que el segundo puede ser producido tanto por bacterias como por levaduras, como es el caso de las levaduras del género *Brettanomyces*.

Aguilar-Uscanga (1998), realizó la caracterización cinética de *Brettanomyces bruxellensis*, y observó que este tipo de levaduras, al ser productoras de ácido acético, pueden estar presentes en una fermentación alcohólica llevada a cabo por levaduras del género *Saccharomyces* e incrementar las concentraciones de ácido acético en el medio, lo que conlleva a una disminución de la viabilidad de las células de *Saccharomyces* y por lo tanto manifestarse una disminución en la producción de etanol.

Aunque la contaminación por bacterias no representa un problema tan grave ya que puede ser controlada por medio de antibióticos adicionados al medio de cultivo, encontrarse con levaduras no deseables en el proceso de fermentación puede fomentar la aparición de metabolitos secundarios; por lo cual es necesario recurrir a otras alternativas, como el uso de cultivos de levaduras que presenten actividad Killer, las cuales ayudaran a controlar el crecimiento de levaduras no deseadas (Díaz-Nava, 2014).

2.6.3.1. Actividad Killer en levaduras

Recientemente, la actividad Killer en levaduras ha manifestado gran interés en procesos industriales, ya que pueden ser utilizadas como un antimicrobiano potencial ante contaminaciones por levaduras, hongos y bacterias debido a su amplio espectro (Ortiz-Zamora,2006).

Aunque el fenotipo Killer está presente en una gran variedad de especies de levaduras, este ha sido estudiado a detalle en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y en cuanto a cepas de levaduras non-*Sacharomyces*, la *Kluveryromyces lactis* es la cepa mejor estudiada (Portugal, 1999).

Las levaduras Killer presenta la característica de secretar dentro del medio de cultivo una toxina capaz de inhibir el crecimiento o matar a levaduras denominadas sensibles (Young,1989). Todas las toxinas son de naturaleza proteica, algunas de ellas están asociadas con los carbohidratos.

Se han encontrado 5 toxinas en cepas de *Saccharomyces cerevisiae*: K1, K2, K3, KT28 y K3GR1(van Vuuren y Wingfield, 1986).

La toxina K1 es una pequeña proteína formada por dos subunidades polipéptidicas, rica en ácido aspártico y glutámico, la toxicidad máxima se observa a pH entre 4.2-4.6. La toxina K2 se encuentra asociado a los residuos glucosídicos, el intervalo de pH tolerado por la toxina es mayor que la K1, este se encuentra entre 2.8-4.8 (Pfeiffer y Radler, 1984).

El modo de acción de la toxina, inicia cuando se une a un sitio receptor de la pared celular, esta unión fue identificada como un enlace (1-6)- β -D-glucano, y no se requiere de energía metabólica de la célula huésped.

Sin embargo en 1973, Bussey *et al.*, demostraron la existencia de un segundo sitio de recepción situado a nivel membrana plasmática; observaron que el esferoplasto (células que han perdido la pared celular), obtenido a partir de una cepa resistente a la K1 toxina, fueron capaces de unirse a la proteína.

Después de dicha unión entre la toxina Killer y la membrana plasmática, se desencadenan una serie de modificaciones al interior de la célula, como la inhibición de ciertas macromoléculas, proteínas y ácidos nucleicos ; además de una pérdida de iones potasio acompañada de una reducción en el pH intracelular (Bussey *et al.*, 1973).

Kluyveromyces lactis, secreta una proteína constituida por 3 subunidad: α , β y γ . La subunidad γ , está asociada directamente con los carbohidratos (Stark y Boyd, 1986); la toxina inhibe la enzima adenilato ciclasa y bloquea la división celular en la fase de crecimiento.

En cuanto a la glicoproteína de *Pichia kluyveri*, la actividad máxima se expresa a una temperatura de 40°C, esta toxina provoca la formación de grandes poros en la membrana fosfolipídica, lo que incrementa la permeabilidad de la membrana (Middelbeek *et al.*, 1979).

2.7. Metabolismo de las levaduras

El metabolismo en general puede ser definido como la suma de todas las reacciones enzimáticas en una célula o microorganismo (Lehninger, 1993).

Teniendo como funciones específicas: obtener energía química de moléculas combustibles o de luz solar absorbida; sintetizar proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otros componentes celulares; degradar biomoléculas necesarias para el mantenimiento celular.

El metabolismo central de carbono en diferentes especies de levaduras es básicamente el mismo, sin embargo los mecanismos de consumo de nutrientes, fermentación y respiración celular, difieren significativamente (Flores *et. al*, 2000).

Gancedo & Serrano (1989) y Flores *et al.* (2000), afirman que todas las levaduras tienen en común el metabolismo de conversión de la glucosa 6- fosfato o fructosa 6- fosfato en piruvato a través de la vía glucolítica; aunque, el destino del piruvato depende de la especie de la levadura y de las condiciones de cultivo (Figura 3).

Esta diversidad metabólica es evidente en tres aspectos: el transporte y, en el caso de los oligosacáridos, hidrólisis; la conversión de fosfatos de azúcar a piruvato mediante separación y oxidación; y el metabolismo del piruvato (Pronk *et al.*, 1996).

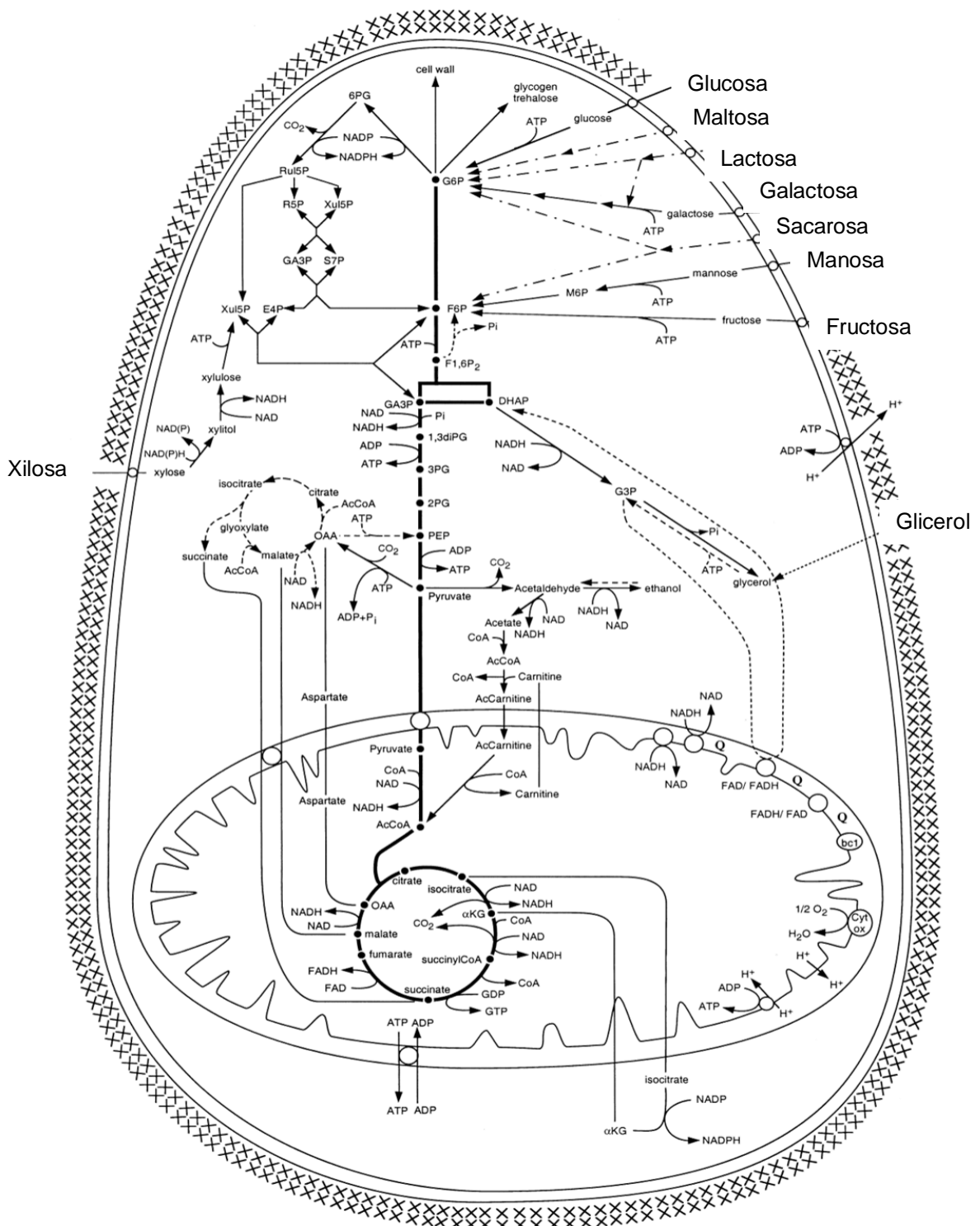


FIGURA 3. Esquema de diferentes vías metabólicas en levaduras (Flores *et al.*, 2000).

La glicólisis es la ruta metabólica realizada en el citosol, mediante la cual se degrada la glucosa hasta dos moléculas de piruvato, a la vez que se produce energía en forma de ATP y de NADH. En este proceso participan 10 enzimas diferentes que catalizan diez reacciones secuenciales, divididas en tres etapas principalmente: a) formación de fructosa 1,6- bisfosfato a partir de glucosa, b) formación de triosas fosfato (gliceraldehído 3-fosfato y dihidrixiacetona fosfato) a partir de fructosa 1,6- bisfosfato y c) formación de piruvato a partir de gliceraldehído 3-fosfato.

Las enzimas claves regulatorias en la glicólisis son la hexoquinasa, fosfofructoquinasa y el piruvato quinasa, y su actividad puede verse afectada por diversos efectores, tal es el caso del ATP (Dawes, 1986).

La regulación del flujo del carbono en la vía glicolítica, se realiza a nivel de la vía de las pentosas-fosfato, aproximadamente el 90% del carbono que va a través de la vía pentosa fosfato vuelve a entrar en la glicólisis en el nivel de la fructosa 6-fosfato o gliceraldehído 3-fosfato.

En tanto, si la levadura es capaz de crecer en presencia de oxígeno, el piruvato entra a la matriz mitocondrial donde es oxidado y descarboxilado a acetil-CoA, esto a través del complejo multienzimático mitocondrial, piruvato deshidrogenasa (PDH), el cuál une a la glicólisis con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), en donde se terminará de oxidar el acetil-CoA a CO₂ (Walker, 1998). Aunque alternativamente, el piruvato puede transformarse a acetil-CoA en el citosol vía acetaldehído para formar acetato por la llamada vía de desviación.

La principal función catalítica del TCA, es proporcionar equivalentes reductores para la cadena respiratoria a través de la descarboxilación oxidativa del acetil-CoA; además de suministrar intermediarios para otras rutas metabólicas (Rodrigues *et al.*, 2006).

Durante el ciclo, los hidrógenos son transferidos por deshidrogenasas, los transportadores redox son oxidados mediante la cadena de transporte de electrones y el oxígeno es reducido a agua (Ortiz-Muñiz *et al.*, 2010).

La energía liberada por la transferencia de electrones es usada para sintetizar ATP mediante un proceso llamado fosforilación oxidativa.

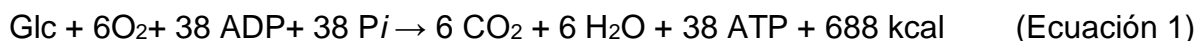
2.7.1. Metabolismo respiratorio y fermentativo

El metabolismo de levaduras, dependiendo de la naturaleza del aceptor final de electrones en el proceso de producción de energía, puede dividirse en dos tipos de metabolismo: respiratorio y fermentativo.

2.7.1.1. Metabolismo respiratorio

En el metabolismo respiratorio, la glucosa es oxidada a través de la vía de la glucólisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, el cual es considerado como la vía degradativa más importante para la generación de ATP; ya que reduce el NADH y el FADH que se forman; estos son reoxidados por el sistema enzimático transportador de electrones, estableciendo así un flujo de electrones, los cuales son dirigidos hacia el oxígeno como aceptor final.

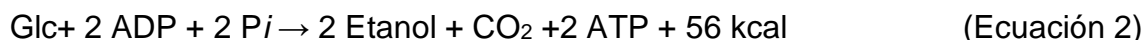
Los productos de este proceso son una molécula de agua y una gran cantidad de energía liberada, energía que es utilizada para sintetizar ATP, y puede ser representado por la siguiente ecuación estequiométrica:



2.7.1.2. Metabolismo Fermentativo

Este tipo de metabolismo, puede ser definido como una oxidación incompleta del sustrato empleado, siendo el aceptor final de electrones un compuesto orgánico; estos aceptores finales de electrones son lo que caracterizan el tipo de fermentación. En otras palabras, en la fermentación alcohólica, el aceptor final de electrones es el acetaldehído y en la fermentación láctica es el ácido pirúvico.

En cuanto a la fermentación alcohólica, la energía es sintetizada en forma de ATP a partir de un proceso de glucólisis al que sigue el metabolismo del piruvato (Figura 4). Así pues, la fermentación complementa la glucólisis y hace posible producir energía en ausencia de oxígeno (Nielsen, 2003). Este proceso es representado por la siguiente ecuación estequiométrica:



Para evaluar la transformación de azúcares a etanol se utiliza como parámetro estequiométrico el rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{X/S}$), que se define como la cantidad de levadura producida por cantidad de sustrato consumido, el rendimiento producto/sustrato ($Y_{P/S}$) el cual es la cantidad de producto sintetizado por cantidad de sustrato consumido, y la productividad (Q_p) la cual se define como la cantidad de etanol producido por unidad de tiempo y volumen (Vázquez y Dacosta, 2007).

El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 gramos de etanol producido por gramos de glucosa consumida, y 0.49 gramo de CO_2 por gramo de glucosa consumida; es difícil lograr este rendimiento, ya que el microorganismo utiliza la glucosa para producir otros metabolitos y para su mantenimiento celular (Owen, 1991). El rendimiento experimental varía entre el 90 y el 95 % del teórico, y en la industria varía del 87 al 93 % del teórico (Vázquez y Dacosta, 2007).

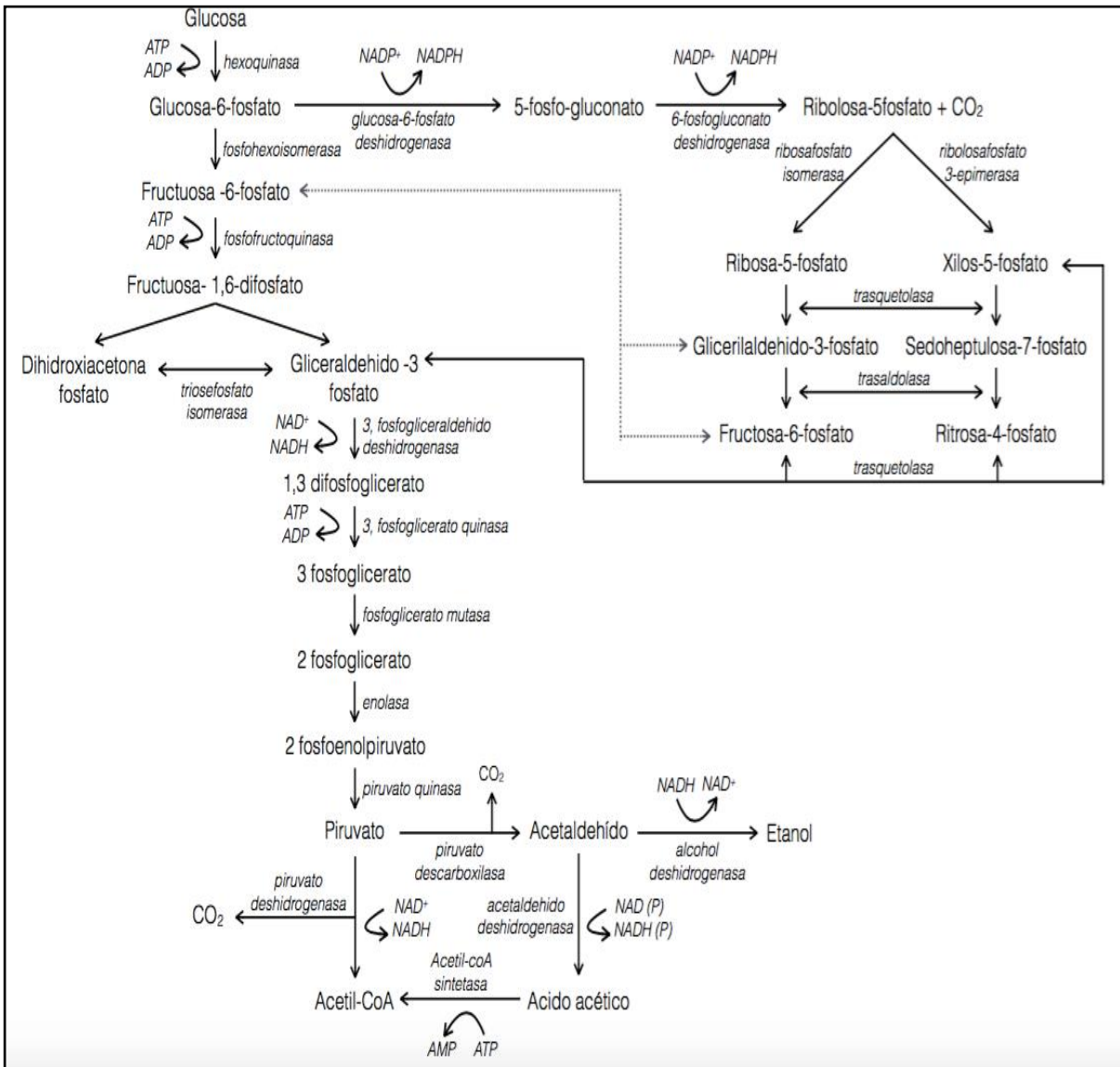


FIGURA 4. Proceso de fermentación alcohólica por medio de microorganismos (Nielsen, 2003).

Las levaduras presentan diversas maneras de generar energía, y pueden ser clasificadas con respecto a la utilización de la respiración o la fermentación para generar ATP (Tabla 2).

TABLA 2. Clasificación de las levaduras según su capacidad fermentativa (Scheffers, 1987).

| Clase | Observación | Microorganismo |
|---------------------------------|--|--|
| Fermentativa obligada | Levadura deficiente respiratoria natural, solo fermenta aun en presencia de O ₂ | <i>Candida pintolopessi</i> <i>Saccharomyces telluris</i> |
| Fermentativa facultativa | | |
| Crabtree-Positiva | Fermentan en medios con altas concentraciones de azúcares aun en presencia de O ₂ | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| Crabtree-Negativa | No producen etanol bajo condiciones aeróbicas y no pueden crecer anaeróbicamente | <i>Candida utilis</i> |
| No fermentativa | No producen etanol en presencia o ausencia de O ₂ | <i>Rhodotorula rubra</i> |

Los metabolismos de respiración y fermentación, se encuentran presentes tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, sin embargo dependiendo de la disponibilidad de oxígeno y la concentración de fuente de carbono, dirigen el metabolismo de las levaduras hacia uno u otro. Estos mecanismos han sido denominados como: efectos de represión catabólica (Aguilar-Uscanga, 1998; Walker, 1998).

2.7.2. Efectos de represión catabólica

Según Fiechter *et al.* (1981), la represión catabólica ocurre cuando glucosa o algún producto inicial del metabolismo de la glucosa, reprime la síntesis de varias enzimas respiratorias y gluconeogénicas.

Actualmente se conocen cuatro efectos de represión catabólica, frecuentemente observados con el tipo de proceso de generación de energía, ya sea fermentación o respiración; estos efectos son: Efecto Pasteur, Efecto Crabtree, Efecto Custer y Efecto Kluuyver (Pronk *et al.*, 1996; Walker, 1998).

2.7.2.1. Efecto Pasteur

El efecto Pasteur está definido como la inhibición de la vía glicolítica en presencia de oxígeno, manifestándose como una inhibición en la fermentación alcohólica (Fiechter *et al.*, 1981; Lagunas, 1979) . Está asociado con una disminución de la afinidad por el consumo de azúcares en condiciones aerobias.

Aguilar (1998), reportó que este mecanismo modifica el metabolismo a nivel enzimático como: la regulación de la actividad isocitrato deshidrogenasa, inhibición de la actividad de la fosfofrutoquinasa e inhibición alostérica sobre la actividad de la glucosa a través de la membrana plasmática.

Según Lagunas (1981), mostró que las descripciones iniciales de Pasteur eran debido a las alteraciones del crecimiento anaerobio por falta de esteroides y ácidos grasos. *Saccharomyces cerevisiae* solo presenta este efecto cuando las concentraciones de glucosa son bajas (1 g/L), bajo limitaciones de nutrientes (Lagunas, 1979; Walker, 1998) y en condiciones de reposo, donde una alta contribución de la respiración al catabolismo de azúcares se produce debido a la pérdida de la capacidad fermentativa.

La velocidad de consumo de glucosa es menor en aerobiosis que en anaerobiosis; asimismo la velocidad de fermentación disminuye. Esto puede ser explicado mejor por la teoría de la competencia enzimática de Holzer (Holzer, 1961), ya que, la piruvato deshidrogenasa tiene mayor afinidad por el piruvato que la piruvato descarboxilasa que conduce a la fermentación alcohólica.

2.7.2.2. Efecto Crabtree

Este efecto se presenta cuando las concentraciones de glucosa son altas y se encuentra en presencia de O₂ (Aguilar, 1998).

Es decir, este efecto establece que aun bajo condiciones aeróbicas, prevalece la fermentación sobre la respiración; el NADH es preferentemente oxidado durante la fermentación que durante la respiración (Walker, 1998).

La glucosa tiene un efecto represivo en los procesos de biosíntesis de enzimas respiratorias en levaduras del genero *Saccharomyces* (Moulin *et al.*, 1984; Lagunas, 1993).

Se propone la teoría del "desbordamiento/limitación en la capacidad respiratoria", en el punto de ramificación del metabolismo (Kappeli, 1986).

Uno de mecanismos fundamentales en la regulación del flujo del piruvato a través de diferentes rutas, es la regulación de enzimas involucradas y sus propiedades cinéticas (Rodrigues *et al.*,2006).

Comparado con el piruvato descarboxilasa citosólico; el complejo mitocondrial piruvato deshidrogenasa (PDH) tiene mayor afinidad para piruvato y por lo tanto puede fluir a través del complejo PDH a bajas tasas glucolíticas.

Sin embargo al incrementar las concentraciones de glucosa, la velocidad glucolítica incrementa y se forma una gran cantidad de piruvato, que conlleva a la saturación del PDH-bypass, desplazando el flujo del carbono a través de la producción de etanol (Figura 5).

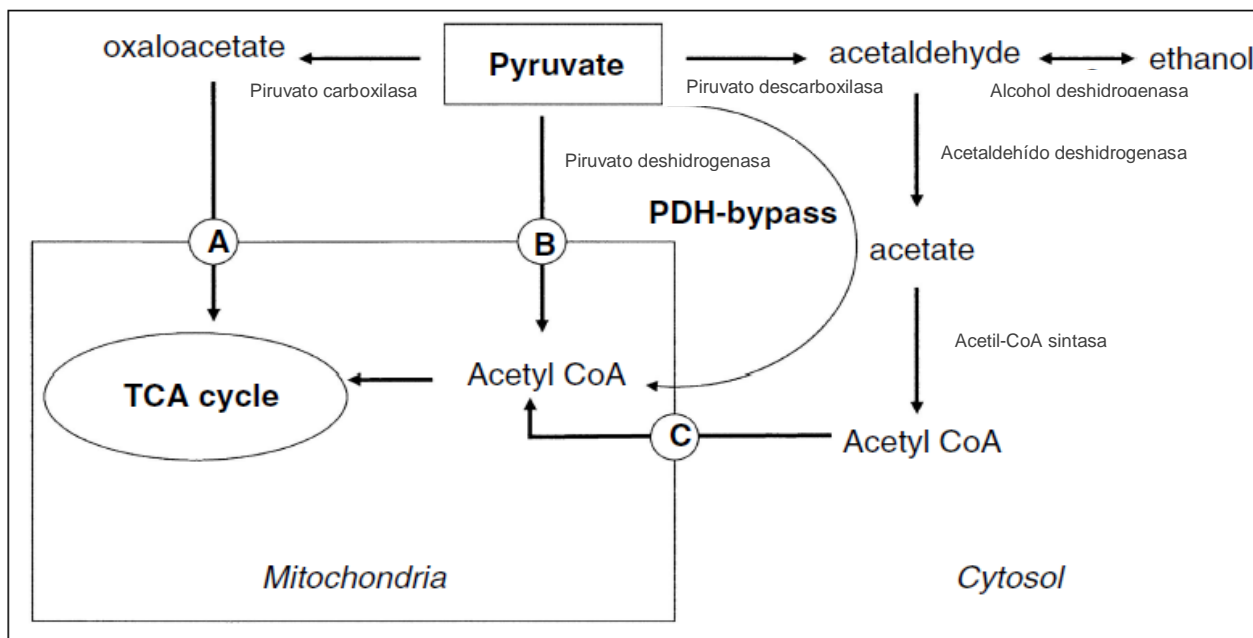


FIGURA 5. Esquema de las vías de ramificación del piruvato (Adaptado de Rodrigues *et al.*, 2006).

El efecto Crabtree fue dividido en corto y largo término (Petrik *et al.*, 1983). El efecto de corto término, está definido como la capacidad de desencadenar de manera repentina la fermentación en altas concentraciones de glucosa; y el efecto de largo término, es caracterizado como el metabolismo respiro-fermentativo observado en cultivos por lotes o continuos por encima de la tasa de dilución crítica.

2.7.2.3. Efecto Custer

Se define como la inhibición de la fermentación alcohólica en ausencia de oxígeno. Este efecto es también conocido como Efecto Pasteur negativo.

Scheffers y Wiken (1969), demostraron que el efecto Pasteur y el efecto Custer dependen de mecanismos diferentes, pudiendo intervenir simultáneamente durante la fermentación alcohólica de numerosas levaduras.

Este efecto se encuentra presente en levaduras del genero *Brettanomyces* y su anmorfo *Dekkera*, por lo cual es considerado un criterio de clasificación taxonómico.

En *Brettanomyces*, el consumo de glucosa es rápido en presencia de oxígeno, esto debido a una reducción total de NAD^+ a NADH por la formación elevada de ácido acético, lo que provoca un desequilibrio redox y la incapacidad de producir glicerol; se cree que el efecto es causado por un estrés reductivo (Scheffers y Wiken 1969; Rodrigues *et al.*,2006).

2.7.2.4. Efecto Kluver

El efecto Kluver se ha definido como la ausencia de la fermentación alcohólica en ausencia de oxígeno y en presencia de disacáridos. Este fenómeno no se presenta en *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo este efecto si es característico de ciertas levaduras como *Dekkeromyces lactis* y *Candida utilis* (Walker 1998).

La incapacidad de fermentar otros azúcares, además de la glucosa, parece ser una característica encontrada en levaduras facultativas (Sims y Barnett, 1978). Algunas de estas levaduras son: *C. utilis* en presencia de maltosa, *K. wickerhamii*, en presencia de lactosa y *Debaryomyces yamadae* en presencia de sacarosa (Kaliterna *et al.*, 1995; Castrillo *et al.*, 1996).

Este efecto aparece como competencia entre la respiración y la fermentación en presencia de oxígeno, afectando el transporte de azúcar. Aunque el efecto Kluver no se conoce a detalle, pareciera estar relacionado con la unión de varios factores que involucran bajas velocidades de transporte de azúcares.

Sims y Barnett (1978), encontraron una actividad reducida de la piruvato descarboxilasa en *Candida*, *Kluyveromyces* y *Debaromyces*, ocasionando una disminución en los flujos de carbono en azúcares diferentes a la glucosa a través de la glucolisis.

Kaliterna *et al.* (1995), sugiere que la regulación de *C. utilis* ocurre a nivel de la síntesis del transportador de la maltosa. Asimismo, el etanol suprime la utilización de la matosa en *C. utilis* y *D. castellii* (Weusthuis *et al.*, 1994).

2.8. Levaduras del género *Pichia*

Las levaduras llamadas *no-Saccharomyces* están recibiendo cada vez más atención en la producción de etanol, ya que han presentado numerosas contribuciones debido a sus altos rendimientos de producto. Las especies que han sido objeto de investigación para la producción de vino, hasta el momento, incluyen los géneros de *Candida*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Brettanomyces*, *Saccharomycodes*, *Williopsis* y *Pichia* (Jolly *et al.*, 2006).

Algunas de las especies de *Pichia* son consideradas de importancia biotecnológica. De manera general se puede decir que, el género *Pichia* pertenece a la familia *Saccharomycetaceae*; en medio sólido forma colonias no filamentosas de color blanco o color crema (Querol y Fleet, 2006). Especies de este género pueden ser encontradas en diversos ambientes, incluyendo salmuera.

Dentro del género *Pichia* se encuentran especies tanto fermentativas como no fermentativas.

En el caso de levaduras fermentativas han sido consideradas como fermentadores débiles, debido a que durante su crecimiento aerobio una proporción menor del 30% de glucosa es fermentada, además, azúcares como la lactosa no son fermentados ni asimilados (Gancedo y Serrano, 1989).

En el caso de *Pichia stipitis*, se ha destacado en la fermentación de xilosa, esta levadura es capaz de producir etanol a partir de xilosa en condiciones anaerobias debido a la especificidad de la enzima xilosa-reductasa con doble cofactor (NADPH y NADH) que posee (Amore *et al.*, 1991). Por otra parte la producción de etanol es limitada, ya que esta levadura solo alcanza los 35 g/L aproximadamente (Walker, 1998)

Además, *Pichia pastoris* y *Pichia angusta* han sido empleadas en la expresión de proteínas recombinantes (Wolf, 1996; Kurtzman, 2011); por otro lado *Pichia nakazawae* es productora de amilasa, mientras que *Pichia guilliermondii* produce riboflavina. La presencia de actividad de pectinasa en levaduras es especialmente de importancia en la fermentación de café donde se han mostrado levaduras tales como *Pichia kluyveri* y *Pichia anomala* para ser capaces de degradar la pectina en la capa de mucílago que rodea el grano de café (Masoud *et al.*, 2004).

Sin embargo, la especie *kudriavzevii*, ha recibido gran atención debido a la contribución biotecnológica que presenta. Por ejemplo, en bioremediación de suelos (Evy *et al.*, 2013), o en el caso de Andreas *et al.* (2012), quienes han estudiado a *Pichia kudriavzevii* TY13, debido a la habilidad para degradar el fitato. Destaca también, en la industria de la biorrefinería, al contribuir en la producción de ácido succínico (Xiao *et al.*, 2014) y en la producción de biodiesel (Santosh *et al.*, 2013), por presentar características de levadura oleaginosas.

En cuanto a la producción de etanol, Sandeep *et al.*, 2011 y Harinder *et al.*, 2011, han evaluado la termotolerancia de esta especie, en diversas materias primas utilizadas, como el de jugo de caña y el hidrolizado de paja de arroz respectivamente.

2.9. *Pichia kudriavzevii* ITV-S42

La levadura *Pichia kudriavzevii* ITV-S42, es una levadura autóctona, fue aislada durante la fermentación espontánea del jugo de diferentes variedades de sorgo dulce en el Laboratorio de Bioingeniería del Instituto Tecnológico de Veracruz por Díaz-Nava (2014). Fue seleccionada de entre 60 cepas de levadura, por presentar características deseables en el proceso de fermentación alcohólica.

Tales características fueron relacionadas con levaduras del mismo género y levaduras utilizadas en fermentaciones alcohólicas como en el caso de *Saccharomyces cerevisiae*. *Pichia kudriavzevii* ITV-S42, presenta osmotolerancia en glucosa hasta los 200 g/L, misma concentración que caracteriza a *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 una levadura autóctona aislada de melazas de caña de azúcar (Ortíz-Muñiz, *et. al.*, 2010); al igual que esta presenta Actividad Killer, la cual es de gran importancia para controlar la contaminación en fermentaciones alcohólicas industriales.

En tanto a la tolerancia a compuestos tóxicos presentes principalmente en hidrolizados lignocelulósicos, *Pichia kudriavzevii* ITV-S42, presenta una alta tolerancia a ácido acético hasta 18 g/L, a diferencia de *Pichia stipitis* (*Scheffersomyces stipitis*) NRRL Y-7124 y *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01, que muestran una tolerancia a este ácido hasta 4.18 g/L y 8.46 g/L respectivamente (Ortíz-Muñiz, *et. al.*, 2010).

En el caso de la tolerancia a furfural y 5-HMF, mostró similitud con *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01, ambas cepas presenta tolerancia de un 1 g/L de furfural y 5-HMF; no obstante, *Pichia stipitis* (*Scheffersomyces stipitis*) NRRL Y-7124 solo logró alcanzar una tolerancia de 0.5 g/L para estos compuesto.

Otro aspecto que presentó *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 fue la termotolerancia hasta 40°C, misma que supera a *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 evaluada por Campos (2008) presentando una termotolerancia hasta 35°C.

Pruebas preliminares en jugo de sorgo dulce, han mostrado que *Pichia kudriavzevii* ITV-S42, ha alcanzado la concentración máxima de etanol para el género *Pichia* de 35 g/L (Díaz-Nava, 2014; Partidas-Sedas, en curso).

Sin embargo las características metabólicas y cinéticas de *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 no han sido estudiadas a detalles, siendo esto fundamental para el mejoramiento de diferentes procesos industriales, donde se puede aprovechar el metabolismo de esta levadura.

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, las levaduras juegan un papel importante en relación a la energía renovable, biotecnología ambiental, control biológico e industria alimentaria.

La cepa autóctona, *Pichia kudriavzevii* ITV-S42, aislada en el laboratorio de Bioingeniería en el Instituto Tecnológico de Veracruz, presenta características deseables para el proceso de producción de etanol, y se desconoce el efecto de la fuente de carbono asimilable y fermentable, de los requerimientos nutricionales y del oxígeno sobre su metabolismo.

Con la finalidad de generar conocimiento para concluir sobre el potencial de uso de esta levadura autóctona, se hace necesario determinar su comportamiento cinético y metabólico.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Caracterizar el comportamiento metabólico y cinético de la levadura autóctona *Pichia kudriavzevii* ITV-S42.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de diferentes fuentes de carbono (glucosa, xilosa, fructosa, sacarosa y glicerol) empleando la levadura *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 en medio sintético sobre la producción de biomasa y etanol.
- Evaluar la presencia de Actividad Killer en las fuentes de carbono asimilables por *Pichia kudriavzevii* ITV-S42.
- Determinar los requerimientos nutricionales de la levadura *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 para la producción de biomasa y etanol.
- Determinar los efectos de represión sobre el metabolismo de *Pichia kudriavzevii* ITV-S42.
- Caracterizar la cinética de crecimiento y producción de metabolitos en jugo de caña de azúcar y jugo de sorgo dulce para evaluar su potencial como levadura productora de bioetanol o biomasa.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material Biológico

La cepa de *Pichia kudriavzevii* ITV-S42, aislada a partir de la fermentación espontánea de jugo de sorgo dulce por Díaz-Nava (2014) y seleccionada por presentar características de interés para la producción de etanol, tales como su osmotolerancia, termotolerancia, tolerancia a compuestos tóxicos y la Actividad Killer.

5.2. Medios de cultivo

5.2.1. Medio de conservación

La conservación de la cepa se realizó en refrigeración a 4°C y resembrada cada 3 meses en el medio descrito en la Tabla 3., esterilizado a 121°C durante 15 min.

TABLA 3. Composición del medio de conservación.

| Componente | g/L |
|----------------------|-----|
| Agar-agar | 20 |
| Glucosa | 20 |
| Extracto de Levadura | 10 |

5.2.2. Medio de fermentación

Las cinéticas de fermentación fueron realizadas en diferentes medios de cultivo, utilizando un medio de cultivo sintético básico (Tabla 4) propuesto por Strehaiano (1984), variando la fuente de carbono (glucosa, fructosa, sacarosa, xilosa y glicerol),

así como la concentración de cada una de ellas; así como jugo de caña de azúcar y jugo de sorgo dulce.

TABLA 4. Composición del medio de cultivo de fermentación a nivel matraz

| Componente | g/L |
|---|----------------------------|
| Fuente de Carbono | Variable según experimento |
| KH_2PO_4 | 5.0 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 2.0 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.4 |
| Extracto de Levadura | 1.0 |

El medio de fermentación a nivel matraz fue esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 min (matraces Erlenmeyer) y 20 minutos para el fermentador.

5.2.3. Medio para la determinación de la Actividad Killer

Para la determinación de la actividad Killer en las levaduras seleccionadas se utilizó un medio de cultivo YPD-Agar-BM, con la composición que se presenta en la Tabla 5.

TABLA 5. Medio para la determinación de la actividad Killer.

| Componente | g/L |
|----------------------|-------|
| Extracto de levadura | 10 |
| Peptona | 20 |
| Glucosa | 20 |
| Agar | 30 |
| Azul de metileno | 0.003 |

Se ajustó el pH 4 con una solución tampón: citrato-fosfato y se esterilizó a 121°C y 15 min.

5.3. Metodología

5.3.1. Condiciones de fermentación

5.3.1.1. Activación y preinóculo

Para la activación de la cepa, se tomaron tres asadas de la levadura en conservación y se disolvieron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 100 mL de medio sintético (Tabla 4). El pH inicial se ajustó a 5.5 y se incubó por 12 h a 30°C y 250 rpm.

Después de transcurridas las 12 h de incubación, con el fin de disminuir la fase de adaptación del microorganismo al medio de cultivo de fermentación, la levadura fue adaptada por medio de un preinóculo, tomando 3×10^6 células viables/mL e inoculándolas en un segundo matraz, el cual es incubado a las mismas condiciones durante 12 h. Finalmente en un tercer matraz se toman 6×10^6 células viables/mL, como inóculo para llevarse a cabo las cinéticas a nivel matraz.

5.3.1.2. Evaluación de la fermentación con diferentes fuentes de carbono

Con la finalidad de evaluar el comportamiento metabólico de la levadura en diferentes fuentes de carbono en el medio de fermentación; se realizaron las cinéticas a nivel matraz en medio sintético, variando el sustrato inicial, siendo estos: glucosa 30 g/L, xilosa 30 g/L, sacarosa 30 g/L, fructosa 30 g/L y glicerol 20 g/L.

Se analizó el crecimiento, consumo de sustrato y producción de etanol en función a rendimientos y productividades, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

5.3.2. Determinación de la Actividad Killer

La Actividad Killer fue evaluada utilizando el método descrito por Rosini (1983): se activó la cepa de levadura sensible a la toxina Killer, en medio sintético (Tabla 4) a 30°C por 24 h a 250 rpm, variando la fuente de carbono.

Posteriormente, se inocularon 25×10^6 células viables/mL en un medio conteniendo YPD-Agar-BM (Tabla 5) a 45°C, el cual se homogenizó y se vertió en cajas petri. Una vez solidificado, se procedió a hacer pozos sobre el agar, en donde se inoculó la biomasa de levadura seleccionada con posible Actividad Killer por 48-72 h a 22°C. La formación de un halo de inhibición rodeado de azul alrededor del pozo donde la biomasa fue depositada, denota Actividad Killer.

5.3.3. Fermentaciones en cultivo por lote en reactor

Se llevaron a cabo fermentaciones a nivel reactor (Marca: SEV Modelo:FAM 2000 de capacidad de 2L) el cual cuenta con sensores de pH, sensores de oxígeno disuelto, y control de temperatura por medio de chaqueta a 30°C; con la finalidad de evaluar el efecto del oxígeno y las concentraciones de sustrato sobre el metabolismo de la levadura, creciendo en medio sintético y medios industriales; dependiendo de las cinéticas, las muestras se tomaron cada dos y tres horas para posteriormente observar la viabilidad celular y el análisis de sustratos y productos por HPLC.

5.3.4. Evaluación del efecto del oxígeno sobre la producción de etanol y de biomasa

Una vez evaluado el comportamiento metabólico en la levadura, fueron seleccionadas las fuentes de carbono asimiladas por la cepa *Pichia kudriavzevii*

ITV-S42 y utilizadas para evaluar el efecto del oxígeno sobre la producción de etanol y biomasa. Los parámetros cinéticos que se evaluaron fueron bajo las condiciones siguientes: anaerobiosis estricta (con eliminación de oxígeno a través de un barrido con nitrógeno); microaerobiosis, iniciando con un sistema saturado de oxígeno y manteniendo velocidades de agitación (150 rpm) y flujos de aire constante (0.1 vvm) y aerobiosis, manteniendo el porcentaje de oxígeno disuelto (O_2D) siempre mayor a 20) .

5.3.5. Fermentaciones en cultivo lote alimentado

En el caso de las fermentaciones por lote alimentado, el volumen de trabajo del bioreactor fue de 1 L , y el pH fue ajustado a 5.5 de acuerdo con lo reportado por Campos (2008) y se inocularon con 6×10^6 cel/mL. El cultivo por lote alimentado a volumen constante de manera general consiste en iniciar la fermentación con un volumen, concentración de microorganismos y sustrato determinados, mientras que a medida que transcurre el proceso de fermentación el sustrato es alimentado sin diluir al cultivo, no viéndose alterado el volumen de manera significativa. Una vez que la fermentación alcanza las condiciones que no puedan ser mantenidas, el cultivo es removido y la biomasa es diluida al volumen original con agua estéril o medio (Brown *et al.*, 1986; Zampraka y Damarola, 2008)

Las cinéticas se llevaron a cabo una velocidad de agitación de 150 rpm. Durante la cinética se tomaran muestras cada 2 h durante 36 h, con la finalidad de evaluar en cada muestra el crecimiento celular, sustratos y productos por HPLC.

Las fermentaciones iniciaron con un cultivo por lote y una concentración de sustrato de 30 g/L (glucosa), las condiciones de cultivo para el lote alimentado se muestran a continuación:

TABLA 6. Condiciones de cultivo para lote alimentado

| VARIABLE | LA 1 | LA 2 | LA 3 |
|----------------------------|------|------|------|
| Glucosa g/L (Lote) | 30 | | |
| Glucosa g/L (Alimentación) | 1 | 5 | 10 |
| Flujo mL/min | 0.1 | 0.13 | 0.3 |

*LA: Lote Alimentado

5.3.5.1. Determinación del coeficiente global de transferencia de oxígeno (k_{La})

Para determinar el cálculo del coeficiente global de transferencia de oxígeno (k_{La}), se utilizó el método indirecto de gaseado "gassing out", donde fue necesario seguir los cambios de la concentración de oxígeno disuelto en el medio a diferentes tiempos. El método consiste principalmente en desalojar el oxígeno presente en el medio de cultivo mediante la inyección de nitrógeno hasta la saturación, para posteriormente alimentarse con un flujo de aire al medio con las condiciones requeridas y la concentración de oxígeno comenzará a elevarse.

Las condiciones para determinar el k_{La} en el bioreactor fueron las utilizadas en las fermentaciones a nivel reactor: 30°C, 150 rpm, volumen del reactor 1 L, medio agua y se variaron los flujos de aire. Con estos datos se realizó la gráfica de saturación de O_2 con respecto al tiempo.

La concentración de oxígeno disuelto C medida está dada en función del tiempo según la ecuación:

$$C = C^* (1 - e^{-k_L at}) \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde:

C: Concentración de oxígeno disuelto en el medio (g/L)

C*: Concentración de oxígeno disuelto en saturación en el medio (g/L)

k_{LA} : Coeficiente de transferencia de oxígeno (h^{-1})

t: Tiempo (h)

Tomando en cuenta los tiempos de respuesta de la sonda, se puede calcular la concentración de oxígeno disuelto C en el medio de la siguiente manera:

$$T \frac{dS}{dT} + S = C \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde:

S: Señal de salida de la sonda

T: Tiempo de respuesta de la sonda

Al combinar las ecuaciones 1 y 2 se obtiene la ecuación 3:

$$\frac{C^* - S}{C^* - C_0} = \frac{1}{1 - k_{LA}T} [e^{-k_{LA}t} - k_{LA}T e^{-t/T}] \quad (\text{Ecuación 4})$$

Los tiempos de la sonda se determinaron previamente (60s) ya que pueden variar dependiendo del equipo que se utilice, el k_{LA} se calcula por un método de identificación paramétrico numérico (Gauss-Newton) donde el valor de k_{LA} minimiza el cuadrado del error (Aguilar-Uscanga, 1998).

5.3.5.2. Cálculo de la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR)

El OTR es calculado mediante los valores obtenidos utilizando la ecuación 5, para los flujos de aire seleccionados:

$$\text{OTR} = k_L a (C^* - C) \quad (\text{Ecuación } 5)$$

donde:

OTR: es la velocidad de transferencia de oxígeno (mgO_2/Lh)

Con dicha fórmula se relaciona el flujo de aire con la velocidad de transferencia de oxígeno lo que permite entender de forma cuantitativa, los requerimientos aerobios de la fermentación.

5.4. Métodos analíticos

5.4.1. Análisis de la biomasa

El análisis del crecimiento celular fue medido por densidad óptica a 620 nm. Se determinó la correlación entre la densidad óptica (D.O.) y el peso seco de las muestras tomadas a diferentes tiempos de la fermentación; las lecturas fueron tomadas ente 0.2-0.8, para lo cual se hicieron las diluciones pertinentes. La ecuación de la recta (Figura 6) se utilizó para calcular la concentración celular en g/L, al correlacionar la D.O con el peso seco.

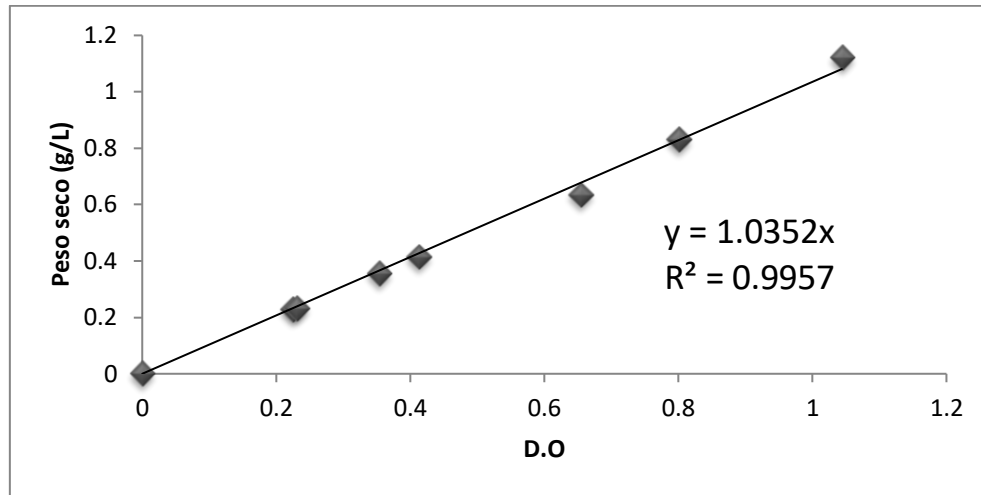


FIGURA 6. Curva de correlación D.O.-peso seco de la levadura *Pichia kudriavzevii* ITV S-42

Para la determinación de peso seco, se realizó una cinética de crecimiento tradicional por duplicado durante 24 h utilizando la levadura *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 en medio sintético, se tomaron muestra cada 4 h; cada muestra se filtró al vacío mediante el uso de membranas de acetato de celulosa de 0.45 μm . Las membranas con o sin muestra se sometieron previamente a una etapa de secado al vacío a 60°C durante 24 h, se midió el peso en una balanza analítica. La diferencia de pesos de la membrana con y sin muestra dio como resultado el peso de la biomasa.

5.4.2. Cuenta celular

Las células se contaron con ayuda de una cámara de Thoma. Las muestras fueron diluidas de tal manera que el número de células viables/mL durante la cuenta en la cámara se encuentre en un rango de 30 a 300 células. Cada conteo se realizó a partir de 5 cuadros grandes (0.25 mm) (Figura 7), sabiendo que el volumen de cada cuadro es de 4×10^{-6} mL. La concentración de células (X) por mililitro está dada por la ecuación:

$$X = \frac{N \cdot d}{4n} \cdot 10^{-6} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde:

N: Número de células contadas

d: Dilución

n: Número de cuadros grandes

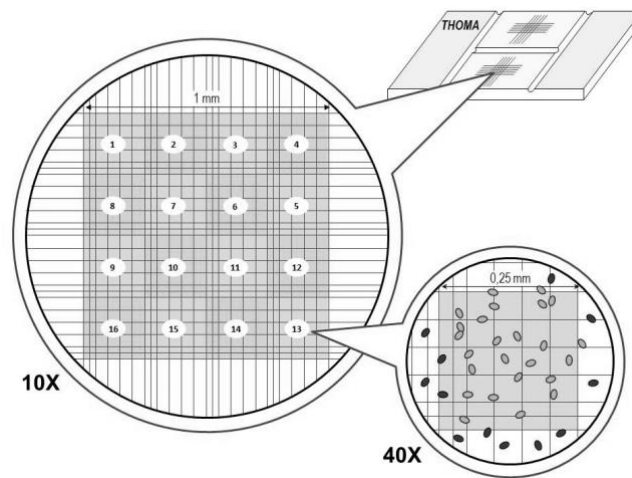


FIGURA 7. Cámara de Thoma (Distribución de cuadrícula).

5.4.3. Viabilidad celular

La viabilidad celular, se estimó a través del conteo de células vivas y muertas al microscopio después de la coloración con azul de metileno, de acuerdo con el método de Lange *et al.* (1993). La muestra se mezcló con el colorante en relación 1:1 y se dejó reposar 10 min. Después de transcurrido el tiempo de contacto, se realizó el conteo al microscopio, determinando como células vivas a todas aquellas que no presentaron coloración, mientras que las células muertas fueron coloreadas de azul.

Lo cual puede atribuirse a dos razones: que la membrana de las células muertas se debilita, permitiendo que el azul de metileno penetre a la célula, a diferencia de las células vivas, las cuales conservan la permeabilidad de su membrana; ó a que

siendo el azul de metileno un colorante de óxido-reducción, sea reducido por una hidrogenasa y este se vuelva incoloro (forma reducido) si la célula está viva (Aguilar-Uscanga, 1998).

Para la preparación del azul de metileno, se disolvió 1g de azul de metileno en 1L de solución aforada de citrato de sodio dihidratado al 2% (p/v), filtrado por una membrana de nitrocelulosa (0.22 µm) marca Millipore. El reactivo se conservó a 4°C y en ausencia de luz.

Este método permite inocular con seguridad la cantidad exacta de levaduras viables para las fermentaciones realizadas. El porcentaje de viabilidad (%V) está dado por la siguiente fórmula:

$$\%V = \frac{N_v}{N_t} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde:

N_v: Número de células vivas

N_t: Número de células vivas y muertas

5.4.4. Análisis de formación de producto y consumo de sustrato

La concentración de glucosa, fructosa, sacarosa, xilosa, etanol, ácido acético y glicerol se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando un equipo marca Waters modelo 2695, con un detector de Índice de refracción modelo 2414, marca Waters y una columna Shodex, SH 1011, específica para

separación de azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes acoplada a una columna de exclusión molecular e intercambio catiónico. La fase móvil que se utilizó fue de H_2SO_4 5 mM, con un flujo de 0.6 mL/min.

Las muestras obtenidas de las cinéticas de fermentación en medio sintético, fueron centrifugadas (10 min; 4°C; 10,000 rpm) y congeladas.

Para las muestras de las fermentaciones de jugo de sorgo dulce, fue necesario realizar una hidrólisis ácida y detoxificación; a 1mL de muestra se le adicionó 1 mL de HCl 4M (baño maría, 60°C, 10 min), se tomó 1mL y se adicionó 125 μL de BaO (0.3 M) y 125 μL ZnSO_4 (5% p/v), se dejó reposar la muestra por 10 min y se centrifugó (10 min; 4°C ; 10,000 rpm), antes de ser inyectadas al cromatógrafo. Las muestras de medio sintético y las muestras detoxificadas de jugo de sorgo dulce se filtraron con acrodiscos (0.22 μm) marca Millipore antes de ser inyectadas al HPLC.

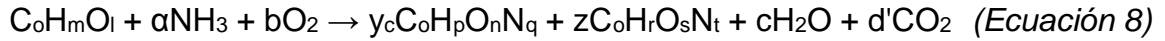
El software utilizado por el equipo fue Empower, que integra el área del pico eluido y la concentración de la muestra se determina por la correlación con una mezcla de estándares previamente definidos.

5.5. Análisis de datos experimentales

5.5.1. Balance de Carbono

Para demostrar que el sustrato que es utilizado en las fermentaciones alcohólicas es convertido a los diferentes productos y CO_2 fueron empleados los balances de carbono.

La reacción bioquímica del crecimiento microbiano se representa de la siguiente forma:



Por lo que se tiene:

$$1 = y_c + z + d' \quad (\text{Ecuación 9})$$

Donde y_c , z , d' son, respectivamente, las fracciones de carbono de sustrato transformados en biomasa, en producto y CO_2 . Los cuales son calculados a partir de las siguientes ecuaciones:

$$y_c = \frac{X}{S_0 - S} \frac{\sigma X}{\sigma S} \quad (\text{Ecuación 10})$$

$$z = \frac{P}{S_0 - S} \frac{\sigma P}{\sigma S} \quad (\text{Ecuación 11})$$

$$d = \frac{CO_2}{S_0 - S} \frac{\sigma CO_2}{\sigma S} \quad (\text{Ecuación 12})$$

donde:

S_0 = Concentración inicial de sustrato (g/L)

S = Concentración final de sustrato (g/L)

X = Concentración final de biomasa (g/L)

P= Concentración final de producto (g/L)

CO₂= Dióxido de carbono producido (g/L)

5.5.2. Rendimiento y productividad

La ecuación de rendimiento $Y_{P/S}$ (g de producto/g de sustrato consumido) que expresa el producto con respecto al sustrato es:

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (\text{Ecuación 13})$$

Donde:

Pf: Producto final (g/L)

P0: Producto inicial (g/L)

S0: Sustrato inicial (g/L)

Sf: Sustrato final (g/L)

La ecuación de rendimiento $Y_{X/S}$ (g de biomasa/g de sustrato consumido) que expresa el producto con respecto al sustrato es:

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (\text{Ecuación 14})$$

Donde:

Xf: Biomasa final (g/L)

X0: Biomasa inicial (g/L)

La ecuación de productividad Qp (g de producto/litro/hora) que expresa la velocidad de formación de producto es:

$$Qp = \frac{Pf}{tf} \quad (\text{Ecuación 15})$$

Donde:

Pf: Producto final (g/L)

tf: Tiempo final (h)

5.5.3. Velocidades Globales

Las velocidades globales son calculadas de acuerdo a las siguientes fórmulas:

Producción de biomasa (r_x):

$$r_x \text{ (g/Lh)} = \frac{dX}{dt} \quad (\text{Ecuación 16})$$

Consumo de sustrato (r_s):

$$r_s \text{ (g/Lh)} = \frac{dS}{dt} \quad (\text{Ecuación 17})$$

Consumo de sustrato (r_p):

$$r_p \text{ (g/Lh)} = \frac{dP}{dt} \quad (\text{Ecuación 18})$$

5.5.4. Velocidades específicas

Las velocidades específicas son calculadas de acuerdo a las siguientes fórmulas:

Crecimiento (μ):

$$\mu (h^{-1}) = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (\text{Ecuación 19})$$

Consumo de sustrato (V_s):

$$V_s (gg^{-1}h^{-1}) = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (\text{Ecuación 20})$$

Consumo de sustrato (V_p):

$$V_p (gg^{-1}h^{-1}) = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (\text{Ecuación 21})$$

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Evaluación del efecto de la fuente de carbono sobre la producción de etanol y el crecimiento celular

Con la finalidad de evaluar el efecto de la fuente de carbono sobre la producción de etanol y crecimiento celular; se realizaron cinéticas utilizando como sustrato inicial: 30 g/L de glucosa, fructosa, xilosa, sacarosa y 20 g/L de glicerol. Las cinéticas se llevaron a cabo a nivel matraz a 250 rpm y 30°C.

Se muestra que, glucosa y fructosa fueron fuentes de carbono asimiladas y fermentadas por *Pichia kudriavzevii* ITV-S42. Se observa que a las 12 horas hubo un consumo total de ambas fuentes de carbono. La concentración máxima de etanol utilizando glucosa como sustrato inicial fue de aproximadamente 15 g/L, y se logró alcanzar una concentración de biomasa de alrededor 10 g/L (Figura 8a).

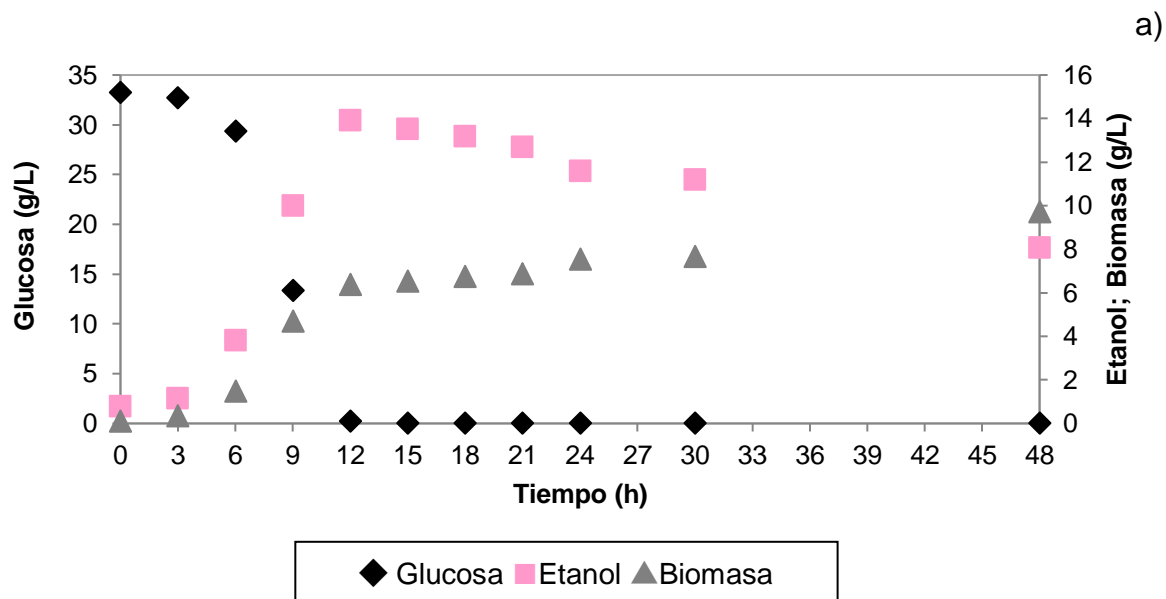


FIGURA 8. Efecto del consumo de glucosa (a) y fructosa (b), sobre el crecimiento celular y la producción de etanol de *Pichia kudriavzevii* ITV-S42

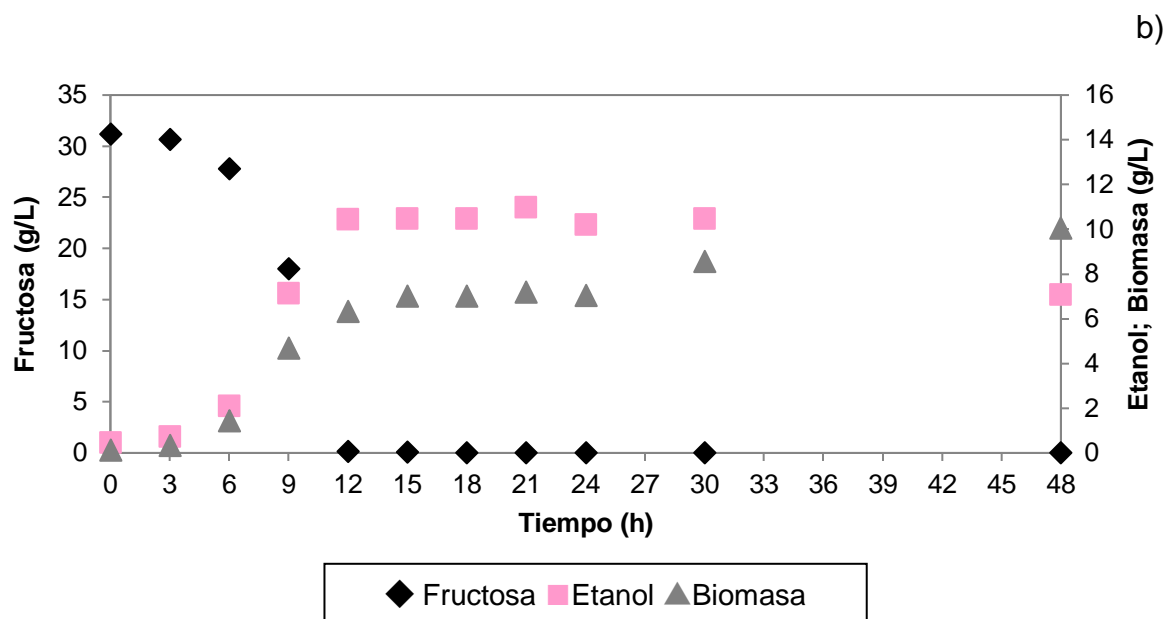


FIGURA 8. Continua

En cuanto, a la fructosa, los resultados mostraron que a diferencia de la glucosa utilizada como fuente de carbono para *Pichia kudriavzevii* ITV-S42, solo se obtuvieron 11 g/L aproximadamente de etanol (Figura 8b); aunque esto pareciera no afectarle al crecimiento celular, ya que la concentración de biomasa fue similar a la obtenida con glucosa.

A pesar de observar un comportamiento similar de la cepa entre estas dos fuentes de carbono, se analizó la influencia de la fuente de carbono sobre las velocidades específicas (Figura 9) y los rendimientos y productividades de etanol y biomasa (Figura 10).

La velocidad específica de crecimiento (μ) mostró valores muy similares alrededor de 0.4 h^{-1} , en ambos sustratos (Figura 9a); sin embargo las velocidades específicas de consumo de sustrato (Figura 9b) y producción de etanol (Figura 9c) muestran una diferencia significativa. La velocidad específica de consumo de sustrato en el caso de la glucosa incrementó alrededor de 64% en comparación con la de fructosa; así pues, cuando se utilizó glucosa como única fuente de

carbón la velocidad específica de consumo de sustrato fue de 1.73 (g/gh) en comparación con la de fructosa 1.06 (g/gh).

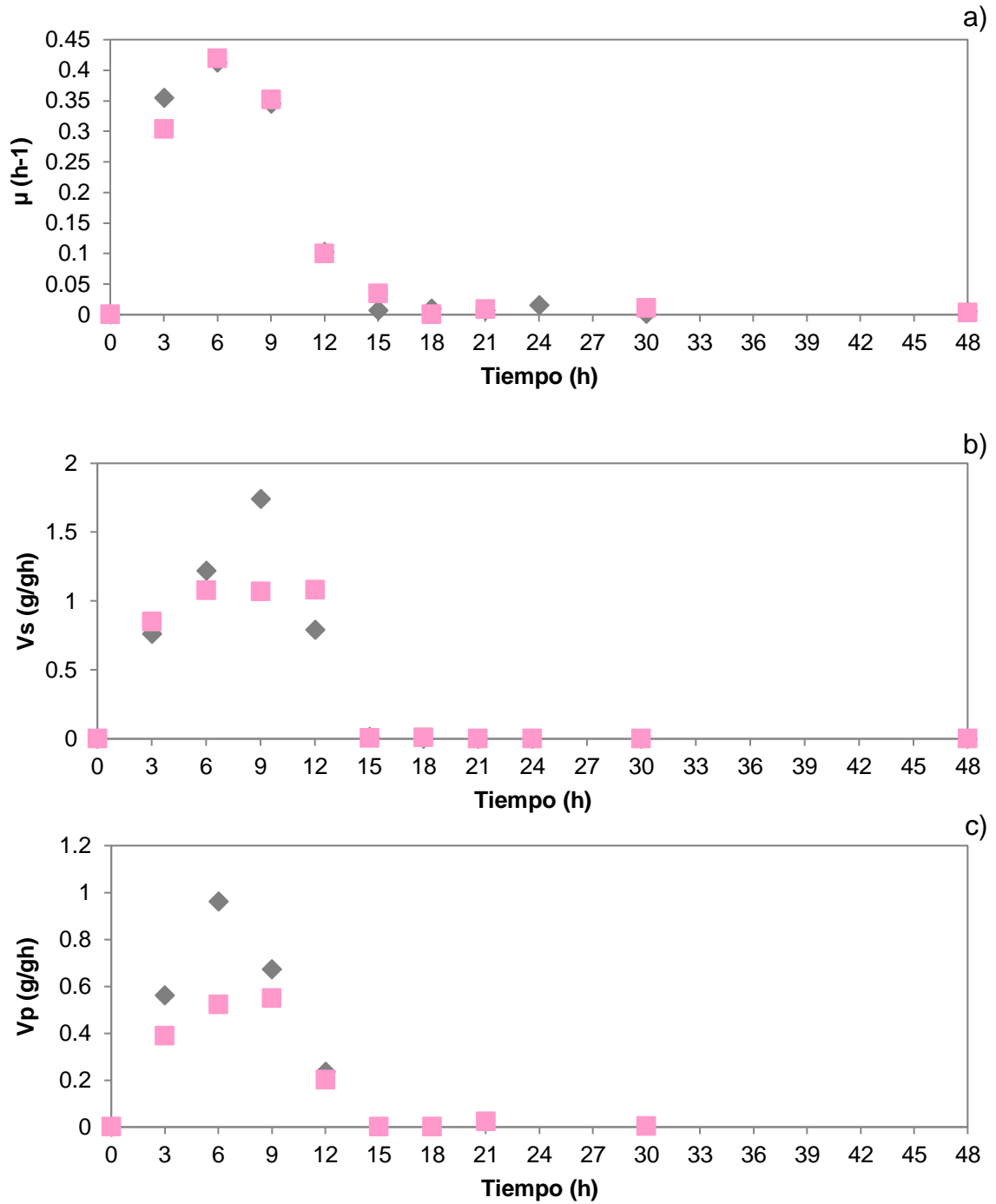


FIGURA 9. Influencia de la fuente de carbono glucosa: (◆) y fructosa (■) sobre las velocidades específicas

Se observa que al utilizar glucosa como fuente de carbono la velocidad específica de producción de etanol, alcanza un valor de 0.96 g/gh, no obstante, con el uso de fructosa, esta disminuye casi en un 50%.

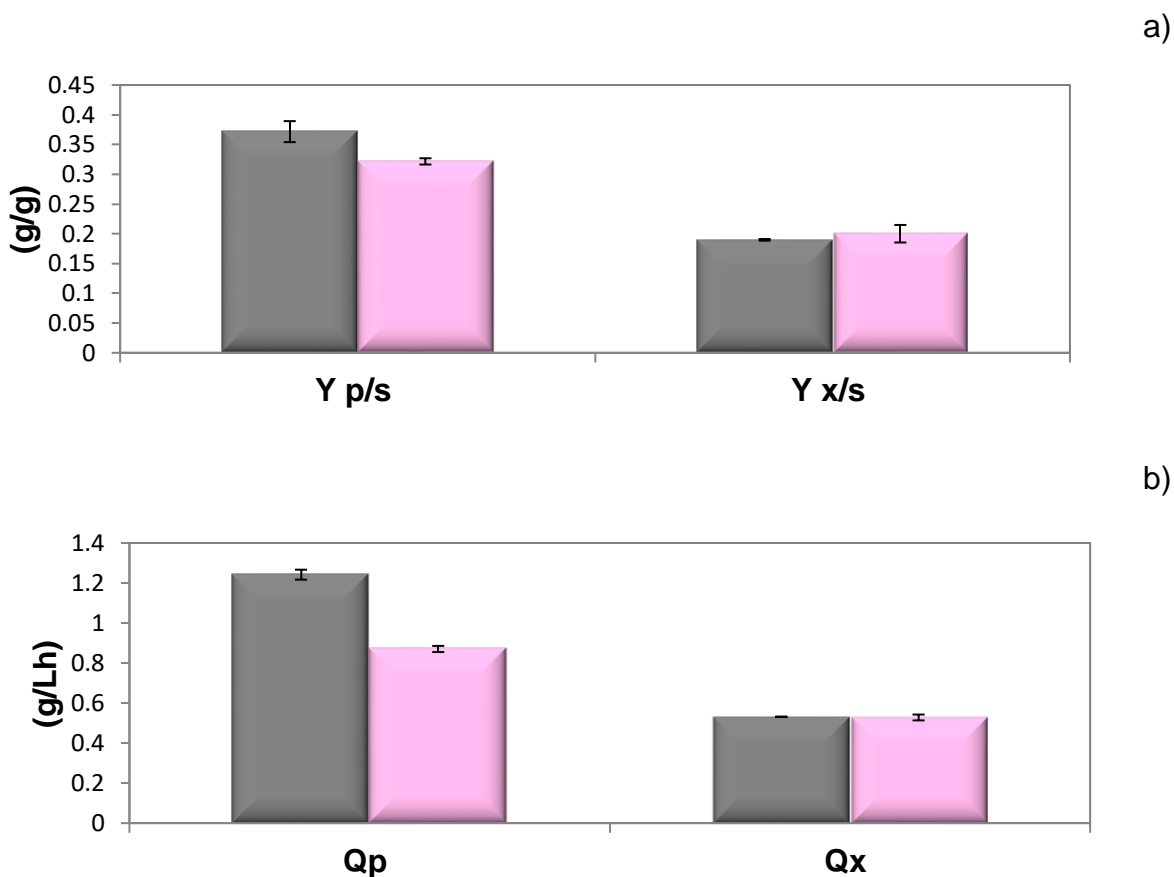


FIGURA 10. Influencia de la fuente de carbono carbono: glucosa (◆) y fructosa (■) sobre rendimientos (a) y productividades (b).

Los rendimientos de etanol usando glucosa como fuente de carbono mostraron ser mayores (0.37 g/g) que cuando se utilizó fructosa (0.32 g/g); sin embargo los rendimientos de biomasa para ambos sustratos no mostraron diferencia significativa (Figura 10a).

Estos resultados pueden ser comparados con lo de Xiao *et al.* (2014), quienes caracterizaron bioquímicamente la cepa de *Issatchenkia orientalis* (*Pichia kudriavzevii*) SD108; utilizando 50 g/L como concentración inicial de glucosa y fructosa y obtuvieron rendimientos de etanol de 0.31 g/g para y glucosa y 0.24 g/g para fructosa, después de 24 h de fermentación.

Con respecto a la productividad de etanol, se alcanzó un valor de 1.37 g/Lh cuando se utilizó glucosa como sustrato inicial, no obstante esta productividad mostró una notable disminución (0.87 g/Lh) cuando la fuente de carbono fue fructosa (Figura 10b) .

Esto puede deberse a que, a pesar de que el flujo metabólico en la fermentación de la fructosa es muy similar al de la glucosa, la glucosa es la fuente de energía más utilizada en las células.

En fermentaciones alcohólicas utilizando *S. cerevisiae*, la glucosa tiene una tasa mayor de consumo que la fructosa, como en la mayoría de las levaduras industriales usadas para la producción de etanol; así que la habilidad de la levadura para fermentar la fructosa es de importancia crítica para mantener la fermentación hasta el final del proceso (Guillaume *et al.*, 2007).

El transporte del azúcar a través de la membrana es el primer factor en la diferencia de fermentación entre las dos azúcares; así como los distintos pasos de fosforilación. La glucosa después del transporte es fosforilada por tres enzimas, la GLK1, la HXK1 y la HXK2, mientras que la fructosa solo es fosforilada por la HXK1 y la HXK2; otro factor importante en el transporte son las propiedades fisicoquímicas de los azúcares, la glucosa es transportada en forma de piranosa y la fructosa en forma de furanosa (Colville *et al.*, 1993).

Por el contrario, xilosa y sacarosa utilizadas como fuente de carbono, no mostraron ser asimiladas ni fermentadas por *Pichia kudriavzevii* ITV-S42.

La capacidad de algunas levaduras para fermentar xilosa en condiciones anaerobias se ha atribuido a la doble especificidad de los cofactores de sus xilosas reductasas. Xilosa reductasa está ligada a NADH, mientras que Xilitol deshidrogenasa utiliza NAD. En condiciones anaerobias, la conversión de xilosa en xilulosa por la acción de NADPH dependiente de Xilosa reductasa y NAD dependiente de Xilitol deshidrogenasa con llevan desequilibrio redox de NAD/NADH, por lo puede bloquear la actividad metabólica en ciertas especies de levaduras (Bruinenberg *et al.*, 1984).

Del mismo modo, no todas las levaduras pueden asimilar y fermentar disacáridos como la sacarosa; estas deben ser capaces de utilizar sacarosa como fuente de carbono y energía mediante la producción de la enzima invertasa, la cual divide la sacarosa para producir glucosa y fructosa. Las células de levadura pueden producir dos formas de la enzima: una enzima fuertemente glucosilada secretada en el espacio periplásmico (invertasa "externa") y una forma aparentemente no glucosilada retenido dentro de la célula (invertasa "interna"). La enzima secretada es responsable de la primera etapa en la fermentación de sacarosa, la hidrólisis extracelular de sacarosa (Carlson *et al.*, 1981).

Por último, fue evaluado el efecto del glicerol como fuente de carbono en el crecimiento celular de *Pichia kudriavzevii* ITV-S42. En la Figura 11, se observa que después de haber transcurrido 48 h de cinética, la concentración de glicerol disminuyó considerablemente, hasta alcanzar 8.6 g/L, que conllevó al aumento de la concentración de biomasa, logrando obtener 11.35 g/L.

El glicerol no fue consumido en su totalidad por la levadura, esto podría deberse a la limitación de algún nutriente en el medio de cultivo o quizás a la insuficiencia del tamaño de inóculo utilizado.

Sin embargo, es interesante observar la capacidad que tiene *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 de asimilar glicerol; Gallardo *et al.* (2011), observó que ciertas levaduras de *I. orientalis*, mostraban ser capaces de asimilar glicerol en rangos de temperatura de entre 30-40°C a diferencias de cepas de *S. cerevisiae*.

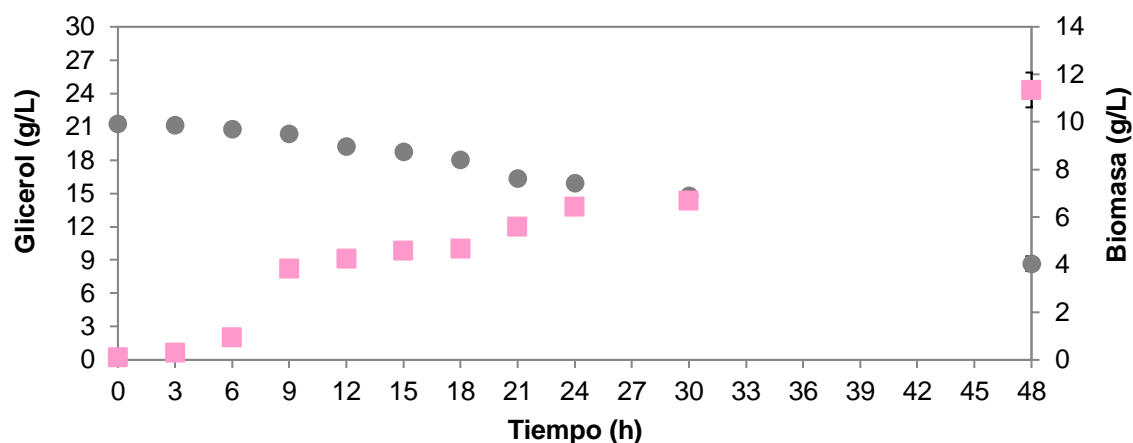


FIGURA 11. Efecto del consumo de glicerol (●) sobre el crecimiento celular (■) de *Pichia kudriavzevii* ITV-S42

Como el glicerol es el subproducto más grande de la industria de biodiesel, el uso de glicerol por levaduras representa una ruta prometedora para lograr la viabilidad económica de la industria de los biocombustibles, como en el caso de la producción de biodiesel. Varios organismos son capaces de asimilar glicerol y sintetizar productos con una amplia gama de funcionalidades (Yazdani y Gonzalez 2007).

Además, con el uso de esta fuente de carbono, podría manifestarse un aumento en la producción de lípidos en la levadura, ya que se ha demostrado que los aceites microbianos producidos por estos microorganismos se puede utilizar como materia prima para la producción de biodiesel (Santosh *et al.*, 2013).

6.2. Determinación de la Actividad Killer en las fuentes de carbono asimilables

Levaduras que presenta Actividad Killer resultan de gran interés en el control biológico contra patógenos de las plantas, descomposición de alimentos, hongos, levaduras y bacterias (Hernandez *et al.*, 2008); están involucradas directamente en las fermentaciones alcohólicas debido a que estos procesos no son estériles, consiguiendo disminuir el riesgo por contaminación de otras cepas de levaduras.

Con el fin de determinar si la Actividad Killer seguía estando presente en las diferentes fuentes de carbono asimilables para *Pichia kudriavzevii* ITV-S42.

Esta actividad se determinó una cepa de *S. cerevisiae* 522D que presenta sensibilidad a la toxina Killer, a través de la presencia de un halo de inhibición celular alrededor de la cepa evaluada. Se utilizó como cepa de referencia a *S. cerevisiae* K1, la cual presenta Actividad Killer.

Pichia kudriavzevii ITV-S42 no mostró incapacidad por seguir secretando la toxina Killer al final de la fermentación alcohólica; aun cuando la fuente de carbono (glucosa, fructosa y glicerol) fuera diferente.

El efecto inhibitorio puede apreciarse en la Figura 12, en donde se observa que alrededor de la cepa probada, no existe crecimiento celular de la cepa sensible presente en el medio.

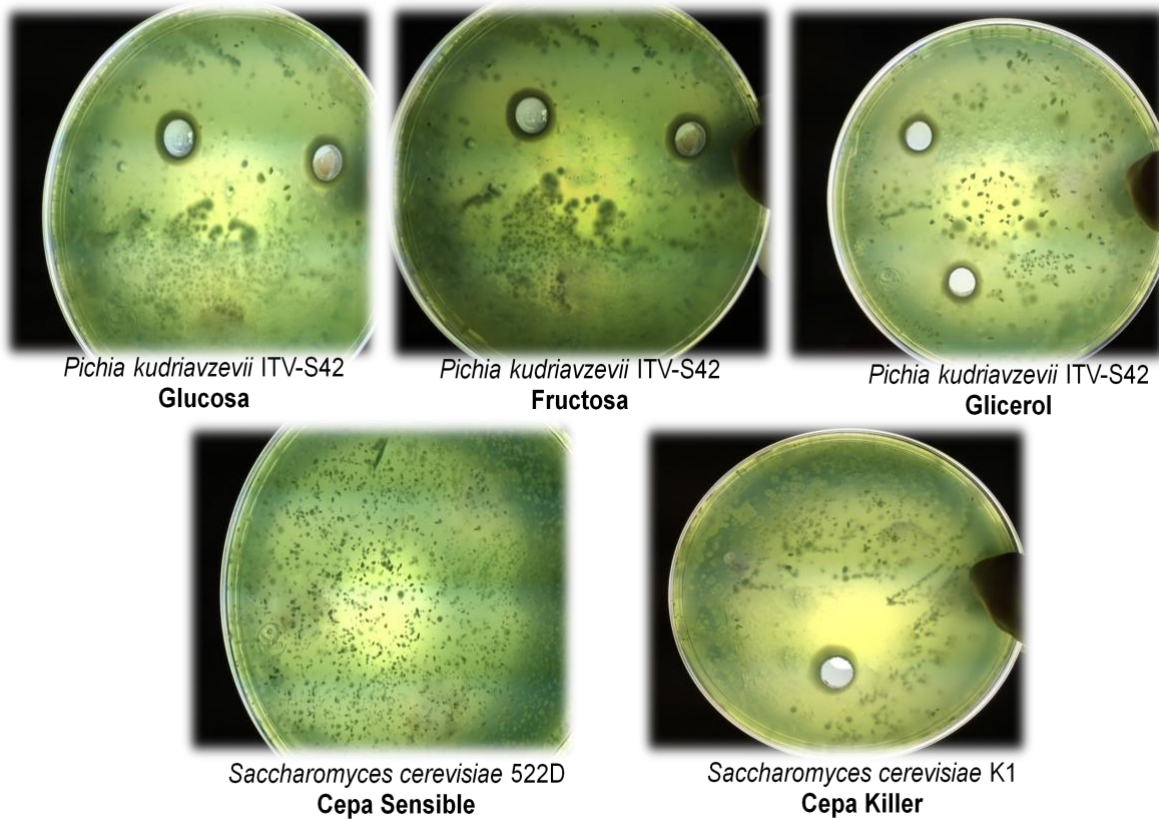


FIGURA 12. Actividad Killer en la levadura *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 creciendo en diferentes fuentes de carbono (comparada con cepa de referencia)

Feet (2003) reportó que en algunas ocasiones una cepa Killer de *Saccharomyces cerevisiae* predomina al final del proceso fermentativo, sugiriendo que la expresión de la toxina le permitió conducir parte de la fermentación.

Bijender *et al.* (2012) mostraron por primera vez el fenómeno Killer en *Pichia kudriavzevii*; la toxina de *Pichia kudriavzevii* RY55 presentó una excelente actividad antibacteriana contra varios patógenos como *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas alcaligenes*.

6.3. Evaluación del efecto del enriquecimiento del medio de cultivo con nutrientes sobre la producción de etanol

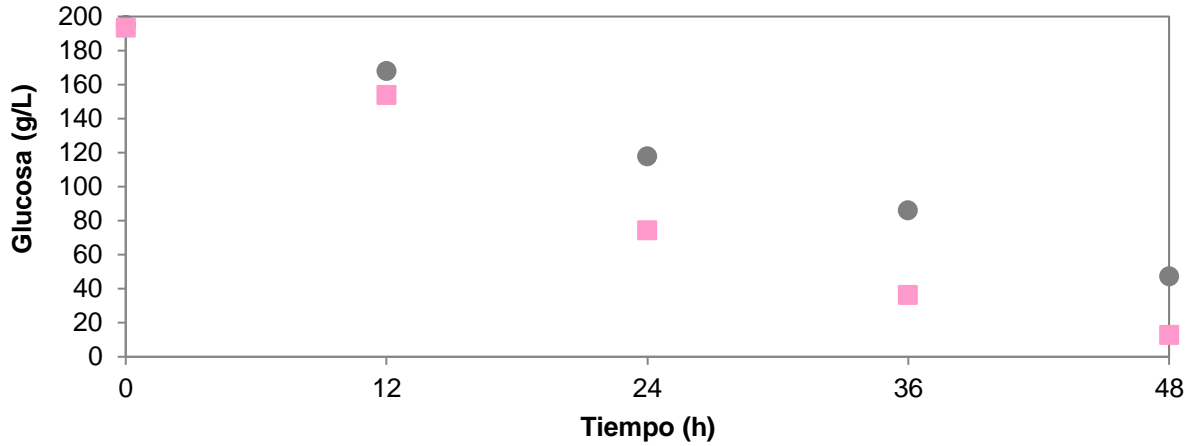
Con la finalidad de evaluar si la osmotolerancia de 200 g/L presentada por *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 estaba dada por la limitación de algún nutriente en el medio de cultivo, se decidió aumentar solo la concentración de extracto de levadura en el medio de 1g/L a 2 g/L, debido a que se ha reportado por diversos autores (Aguilar-Uscanga, 1998; Ortíz-Muñiz *et. al.*, 2010) que este componente, es uno de los más importantes, y un exceso de este no afecta en el crecimiento ni a la capacidad fermentativa de las levaduras.

En la Figura 13, se presenta el efecto del enriquecimiento del medio de cultivo con extracto de levadura sobre el consumo de glucosa y la producción de etanol. Se observa que al incrementarse la concentración de extracto de levadura en el medio de cultivo, al cabo de 48 h, la levadura es capaz de consumir casi en su totalidad los 200 g/L de glucosa inicial (Figura 13a). La producción de etanol también se afectó de manera significativa, ya que se logró alcanzar una concentración de 57 g/L aproximadamente en comparación con los 36 g/L obtenidos utilizando 1 g/L de extracto de levadura (Figura 13b).

La estimulación en el consumo de glucosa y en la producción de etanol, dada por el incremento de extracto de levadura en el medio de cultivo, está relacionada principalmente por la aportación de cofactores como la biotina y riboflavina que contiene dicho componente.

De modo que, los resultados obtenidos, revelan que *Pichia Kudriavzevii* ITV-S42 es capaz de producir concentraciones de etanol por arriba de las reportadas para levaduras del género *Pichia* en general.

a)



b)

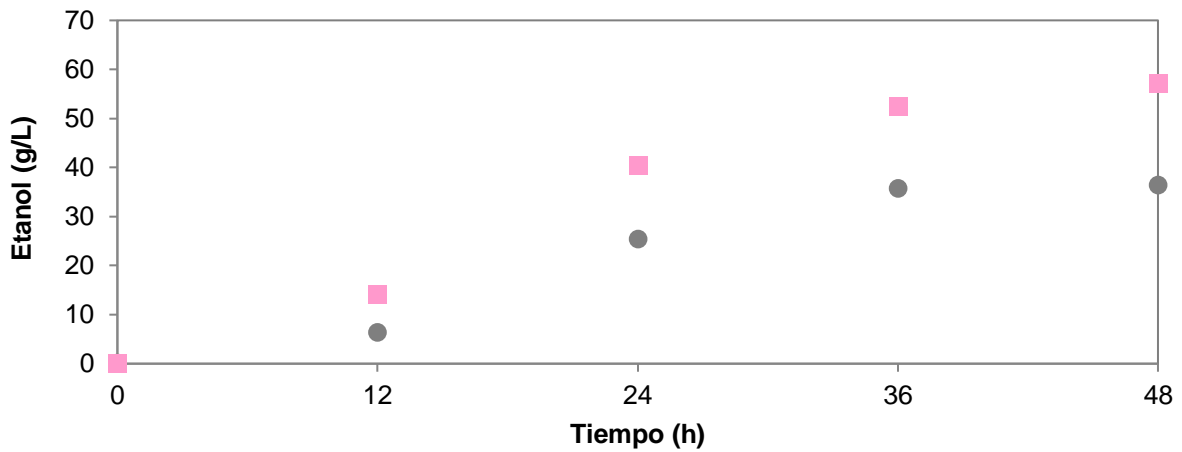


FIGURA 13. Efecto del enriquecimiento del medio de cultivo con extracto de levadura (● 1 g/L y ■ 2 g/L) sobre el consumo de glucosa y la producción de etanol.

Por lo anterior, se procedió a aumentar la concentración de todos los nutrientes en el medio de cultivo; se tomó como referencia los medios evaluados por Ortíz-Muñiz *et al.* (2010) para una cepa autóctona de *Saccharomyces cerevisiae*. En la tabla 7, se presenta la composición de cada uno de los medios evaluados.

TABLA 7. Composición de los medios enriquecidos evaluados.

| Componente | Medio sin enriquecer (MS) (g/L) | Medio enriquecido 1 (MSE1) (g/L) | Medio enriquecido 2 (MSE2) (g/L) | Medio enriquecido 3 (MSE3) (g/L) |
|----------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Glucosa | 200 | 200 | 200 | 250 |
| Sulfato de amonio | 2 | 5 | 5 | 5 |
| Sulfato de Magnesio | 0.4 | 1 | 1 | 1 |
| Fosfato de Potasio | 5 | 8 | 8 | 8 |
| Extracto de Levadura | 1 | 1 | 2 | 2 |

En la Figura 14, se presenta el efecto del enriquecimiento del medio de cultivo con sales sobre el consumo de glucosa, la producción de etanol y crecimiento celular.

Se puede apreciar que, al aumentare solo las concentraciones de las sales en el medio de cultivo, se logró el total consumo de glucosa por *Pichia kudriavzevii* ITV-S42, además de disminuir el tiempo de la fermentación 12 h, lo que representa una productividad de 2.084 g/Lh, en comparación con el medio de cultivo sintético tradicional que alcanzó un valor de 1.209 g/Lh.

En cuanto a la producción máxima de etanol obtenida, se observó un incremento de 5 g/L en el medio enriquecido con sales, dando como resultado una concentración máxima de 62 g/L .

El crecimiento celular también se vio favorecido, *Pichia kudriavzevii* ITV-S42, alcanzó una concentración máxima de biomasa de 25 g/L con respecto al medio sin enriquecer con el cual se obtuvieron 21 g/L aproximadamente.

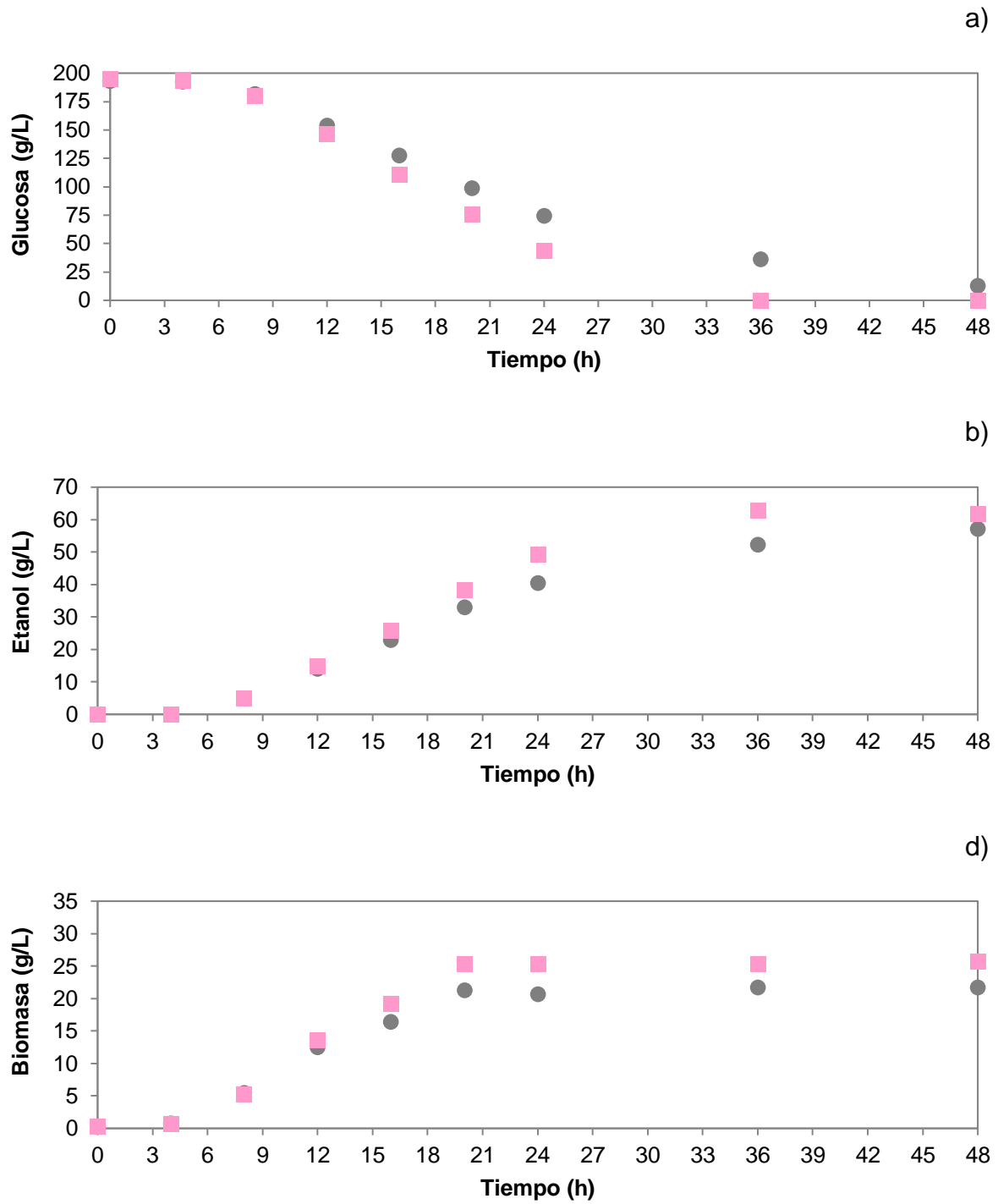


FIGURA 14. Efecto del enriquecimiento del medio de cultivo con sales (●MS y ■MSE1), sobre el consumo de glucosa (a), la producción de etanol (b) y crecimiento celular (c).

Mendes-Ferrera *et al.*, (2004) estudiaron el efecto de diferentes concentraciones sulfato y fosfato de amonio sobre el crecimiento y la velocidad fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* PYCC 407 en un cultivo en lote y en un medio definido con glucosa (200 g/L). Estos autores determinaron la producción máxima de biomasa 7.8 g/l para una concentración de 4 gN/L y en concentraciones limitantes de nitrógeno, la cantidad de biomasa producida era 3.5 veces menor. Además, mientras la fermentación finalizaba en 5 días , la fermentación limitante en requirió 28 días para su finalización.

Está claro que el enriquecimiento del medio de cultivo con sales tiene un efecto sobre la cinética fermentativa. Así pues, continuando con la evaluación del enriquecimiento del medio de cultivo, se mostró que el incremento de sales permitía el consumo total de glucosa, por lo cual se prosiguió al incremento de extracto de levadura, para observar el efecto que tenía junto con el aumento de sales.

Se puede observar en la Figura 15, la cinética de consumo de glucosa, la producción de etanol y el crecimiento celular y cómo el efecto que presenta el medio enriquecido con sales y extracto de levaduras sobre ellas.

La cinética de consumo de glucosa (Figura 15a) muestra que el consumo de glucosa fue total después de transcurridas 24 h con el medio enriquecido con sales y extracto de levadura.

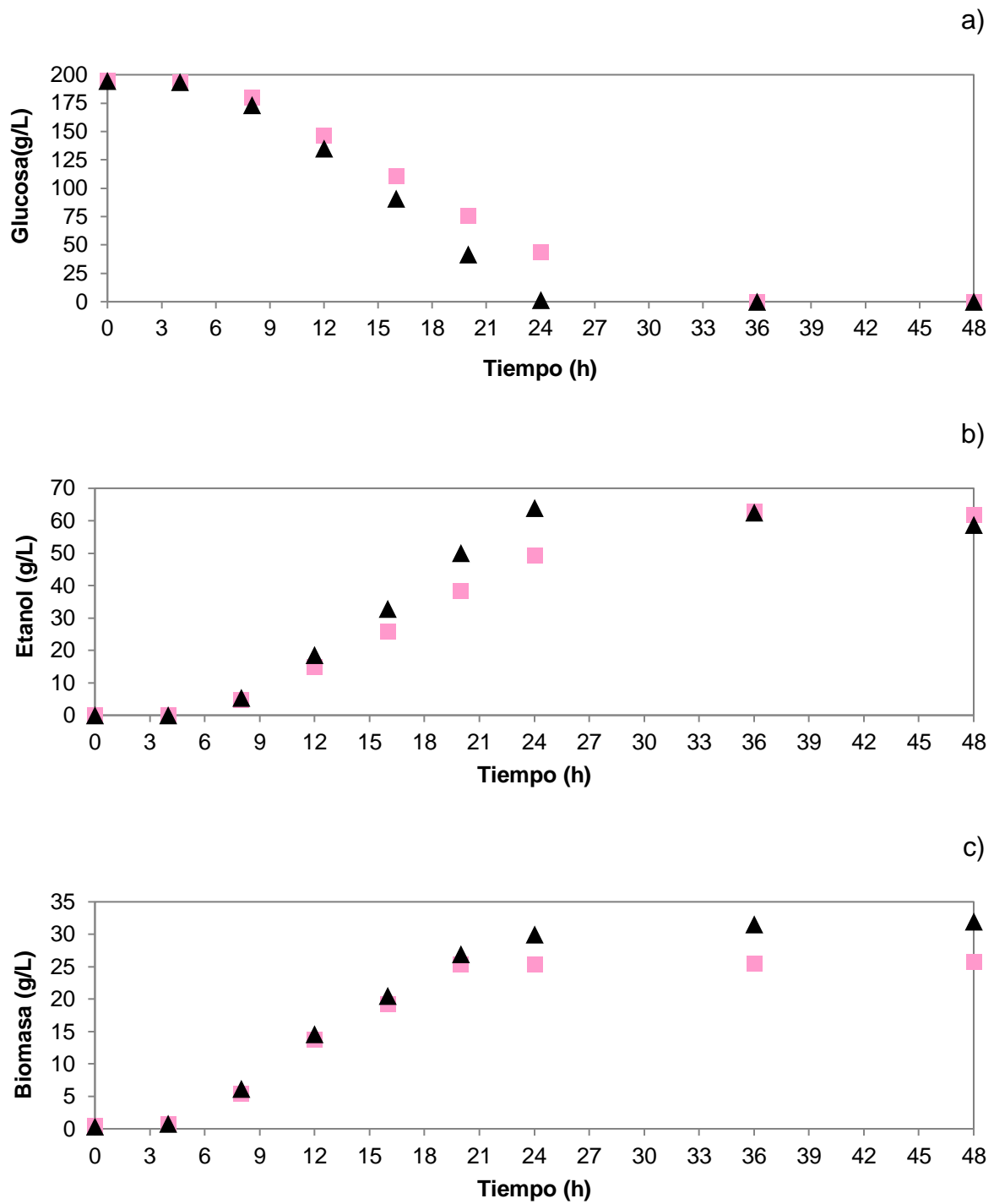


FIGURA 15. Efecto del enriquecimiento del medio de cultivo con sales y extracto de levadura (■ MSE1 y ▲ MSE2) sobre el consumo de glucosa (a), la producción de etanol (b) y crecimiento celular (c).

La producción de etanol se vio favorecida en el medio MSE2, el cual presenta un aumento en la concentración de sales y extracto de levadura, logrando alcanzar una máxima concentración de etanol de casi 64 g/L y obteniendo un rendimiento de 0.332 g/g (Figura 15b). Aunque lo que causa mayor impacto, es el aumento en la productividad de etanol utilizando el medio MSE2 (2.665 g/Lh) con respecto a la obtenida con el medio sintético tradicional (MS) (1.209 g/Lh). Consiguiéndose con esto, una disminución en el proceso fermentativo de 24 h comparado con las 48 h requeridas en el fermentación alcohólica con un medio sin enriquecimiento de nutrientes.

En tanto, a la formación de biomasa (Figura 15c), esta alcanzó una máxima producción de 31.89 g/L y la velocidad específica de crecimiento fue de 1.589 h⁻¹, al emplearse el medio de cultivo MSE2. Según lo reportado por Manginot *et al.*(1998) los bajos niveles de nitrógeno han sido asociado con la baja actividad celular bajo y el bajo rendimiento de biomasa.

Resulta evidente que el enriquecimiento con sales y extracto de levadura tiene un efecto sobre la cinética fermentativa de *Pichia kudriavzevii* ITV-S42. Thailandier *et al.* (2007) reportaron que se ha demostrado que algunas fuentes de nitrógeno, en particular el amonio, pueden actuar como activadores de las enzimas glucolíticas claves; las cuales conducen a un incremento importante del transporte de azúcares por activación de las permeasas implicadas (genes HXT).

En consecuencia de los resultados obtenidos con el incremento de nutrientes en el medio de cultivo, se evaluó el efecto del enriquecimiento del medio la concentración de de cultivo con sales y extracto de levaduras incrementando también la concentración de sustrato a 250 g/L, con la finalidad de observar si existía un efecto inhibitorio por el aumento de glucosa en el medio. El efecto que presenta sobre el consumo de glucosa, la producción de etanol y crecimiento celular, se puede apreciar en la Figura 16.

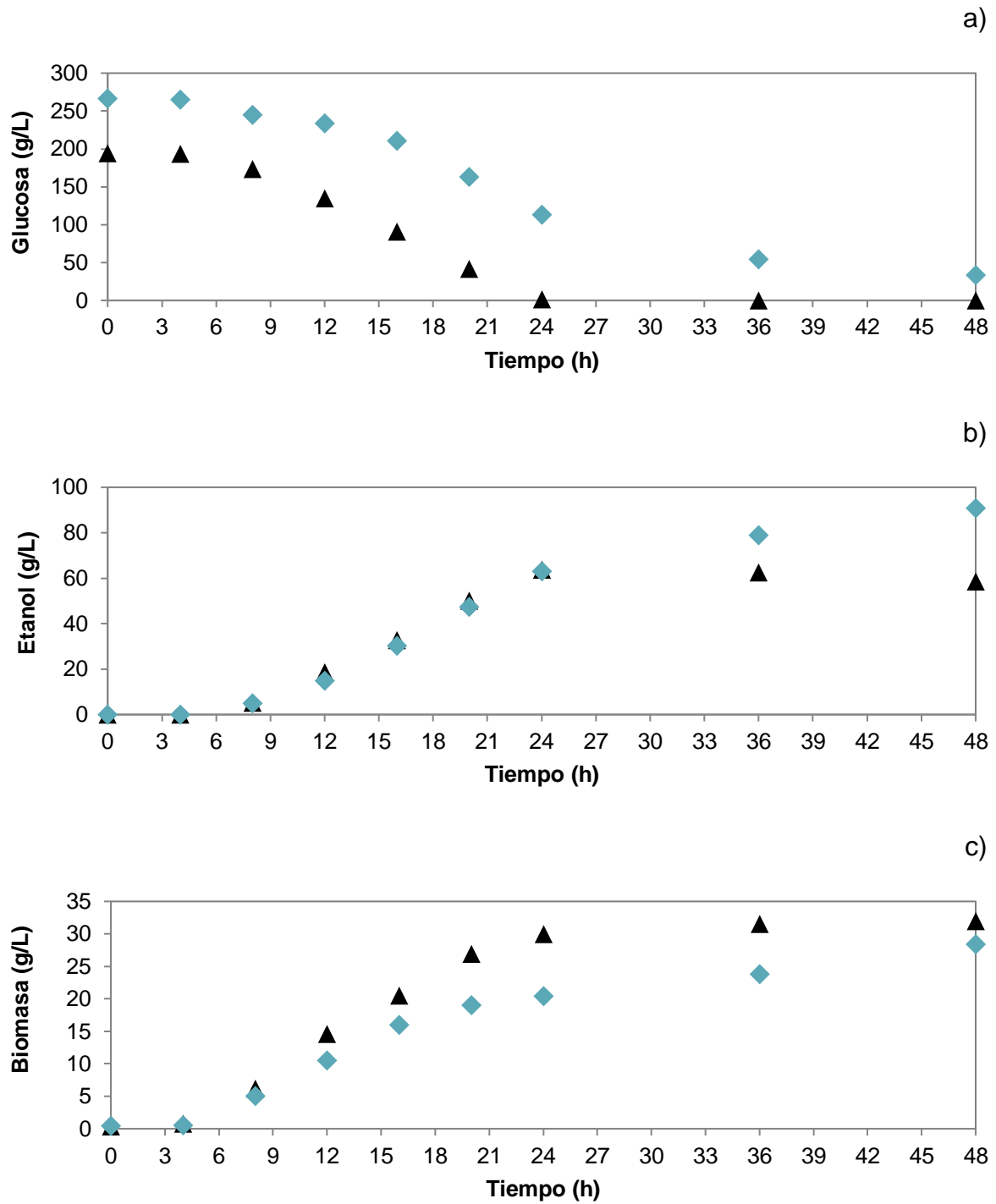


FIGURA 16. Efecto del enriquecimiento del medio de cultivo con nutrientes a diferentes concentración de sustrato (▲MSE2 y ◆ MSE3) sobre el consumo de glucosa (a) la producción de etanol (b) y el crecimiento celular (c).

Se observó que, aunque en el medio al cual se le aumentó la concentración de glucosa (MSE3), no presentó un consumo total de glucosa, aun hasta las 48 h, en comparación con el medio MSE2; sin embargo, la producción de etanol no se detuvo y *Pichia kudriavzevii* ITV-S42, logró una concentración máxima de etanol de 90.87 g/L, alrededor de 2.7 veces más que lo reportado como concentración máxima para género de *Pichia*. Obteniendo con esto un rendimiento de etanol de 0.39 g/g (Tabla 8).

TABLA 8. Parámetros cinéticos y estequiométricos de *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 en diferentes medios enriquecidos a las 12 h de fermentación

| | MS | MSE1 | MSE2 | MSE3 |
|-------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Yp/s (g/g) | 0.308 ± 0.003 ^c | 0.326 ± 0.004 ^b | 0.331 ± 0.002 ^b | 0.391 ± 0.001 ^a |
| Yx/s (g/g) | 0.125 ± 0.001 ^b | 0.131 ± 0.001 ^b | 0.162 ± 0.006 ^a | 0.120 ± 0.003 ^b |
| Qp (g/Lh) | 0.758 ± 0.012 ^d | 2.084 ± 0.022 ^b | 2.665 ± 0.034 ^a | 1.893 ± 0.025 ^c |
| Qx (g/Lh) | 0.305 ± 0.003 ^d | 1.197 ± 0.013 ^b | 1.498 ± 0.003 ^a | 0.598 ± 0.006 ^c |

*Rendimiento de etanol (Yp/s), rendimiento de biomasa (Yx/s), productividad de etanol (Qp), productividad de biomasa (Qx); medio no enriquecido (MS), medio enriquecido 1 (MSE1), medio enriquecido 2 (MSE2), medio enriquecido 3 (MSE 3)

Así mismo, el crecimiento celular no pareciera haberse detenido, ya que aun al final de la fermentación, este mostró una tendencia creciente en cuanto a la concentración celular, la cual fue de 28.33 g/L a las 48 h.

Es probable que, el efecto que se presenta en el medio MSE3, en relación a la concentración de glucosa residual en el medio de cultivo (33 g/L aproximadamente), este dado por algún tipo de inhibición, el cual pudiera darse por el sustrato o el producto mismo.

6.4. Evaluación del efecto del oxígeno y la concentración de sustrato sobre el crecimiento celular y la producción de etanol de *Pichia kudriavzevii* ITV-S42

Para determinar los efectos de represión catabólica que presenta esta levadura se evaluó el efecto del oxígeno y la concentración de sustrato sobre el metabolismo de *Pichia kudriavzevii* ITV-S42. El oxígeno es un sustrato importante empleado para el crecimiento y mantenimiento en otras rutas metabólicas; incluyendo la formación de productos en todos los procesos aerobios. Debido a la baja solubilidad del medio, que por lo general son medios acuosos, el oxígeno se debe proporcionar continuamente (García *et al.*,2010;Blanco y Rayo, 2008) .

La glucosa fue el sustrato utilizado para los experimentos realizados debido a que se tomó a consideración las características que presenta la levadura y las fuentes de carbono asimilables.

Se aseguró de que el fermentador operara bajo condiciones limitantes y no limitantes de oxígeno, por lo que, se midió el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio de cultivo durante toda la cinética; así pues, un medio limitado de oxígeno, el ambiente en el fermentador se encuentra en anaerobiosis, mientras que al proveer de oxígeno al medio este no disminuyó del 20%, porcentaje recomendado para satisfacer las necesidades metabólicas de las levaduras en el proceso (es recomendable mantener la concentración de oxígeno disuelto por arriba de 10% de saturación (García-Ochoa *et. al.*,2010).

Se observó que tanto en ausencia como en presencia de suministro de oxígeno al fermentador, el consumo de glucosa en el medio fue total a las 16 h manteniendo un comportamiento similar en cuanto al consumo de este sustrato, sin embargo en relación a la producción de etanol y biomasa no fue así, en ausencia de oxígeno la levadura alcanzó una concentración de 14 g/L comparada

con los 8 g/L obtenidos en un ambiente de aerobiosis; en tanto que, la producción de biomasa se vio favorecida por este ambiente alcanzando una concentración de casi 18 g/L comparada con los 6.5 g/L producidos en anaerobiosis (Figura 17).

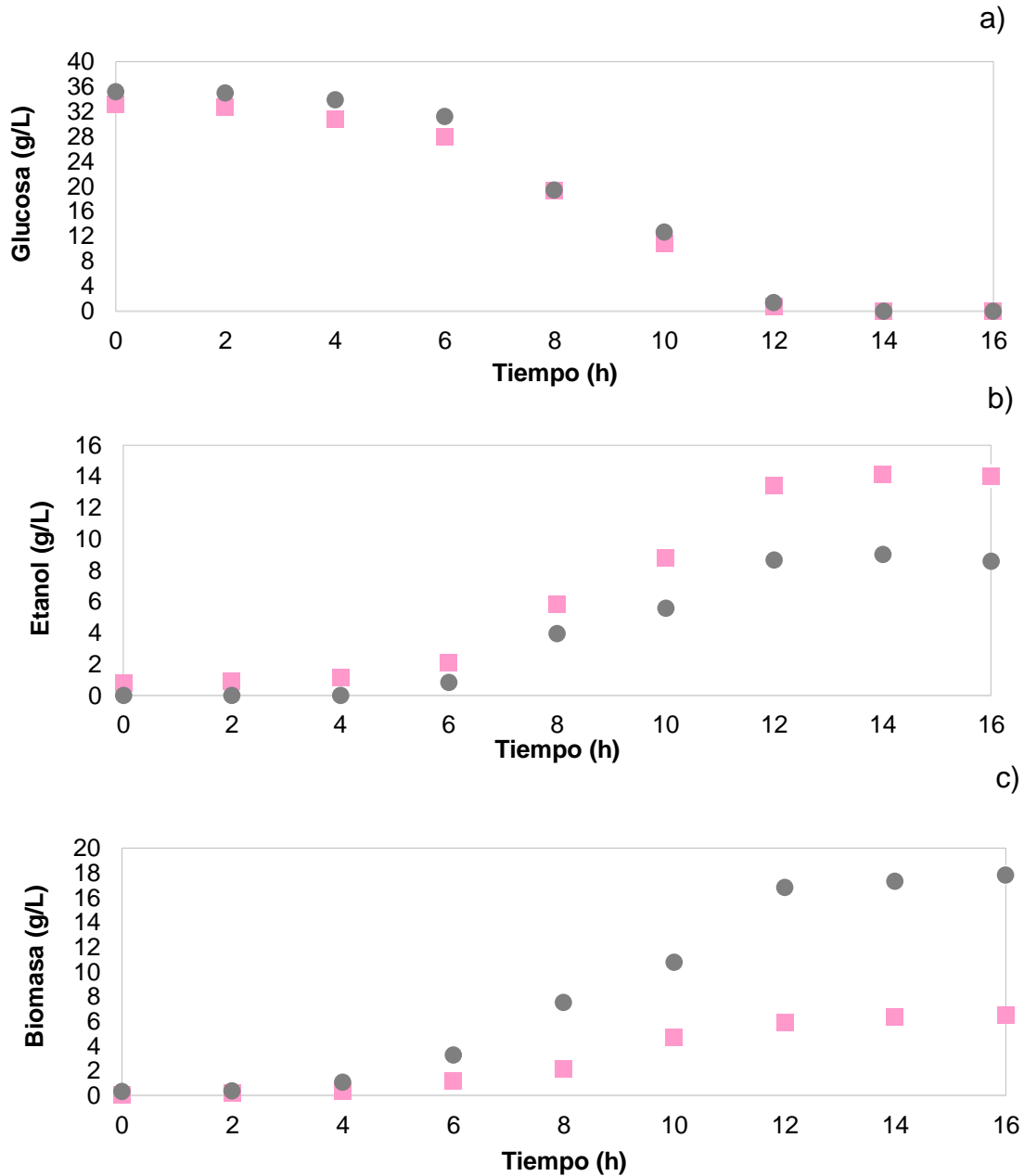


FIGURA 17. Efecto del oxígeno sobre el crecimiento celular, producción de etanol y ácido acético por la levadura *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 en un medio de cultivo aireado (●) y sin aireación (■) con 30 g/L de glucosa

Se observó un comportamiento similar cuando se evaluó una concentración de 50 g/L de glucosa inicial; de la misma forma se mantuvo un ambiente de aerobiosis y anaerobiosis en el medio, el consumo del sustrato fue total en ambos casos. La producción de etanol en un medio limitado de oxígeno, alcanzó una concentración máxima de alrededor 23 g/L en comparación con las 14 g/L producidos en presencia de oxígeno.

A diferencia de la producción de etanol, la producción de biomasa se vio favorecida en presencia de suministro de oxígeno al medio de cultivo, alcanzando los 25 g/L en comparación de los 11 g/L obtenidos en anaerobiosis. Cabe señalar que ningún otro metabolito fue producido en las fermentaciones en presencia y en limitación de oxígeno, esto fue corroborado realizando los balances de carbono, los cuales resultan ser una herramienta utilizada para demostrar que el sustrato empleado, el oxígeno y la fuente de nitrógeno son convertidos a biomasa y a los diferentes productos de la fermentación y CO₂.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos utilizando 30 g/L de glucosa inicial, se presenta en Figura 18, los balances de carbono y se observa que en presencia de oxígeno, la glucosa que representa la fuente de carbono es transformada principalmente a biomasa y que la fracción de carbono utilizada para la producción de etanol es menor.

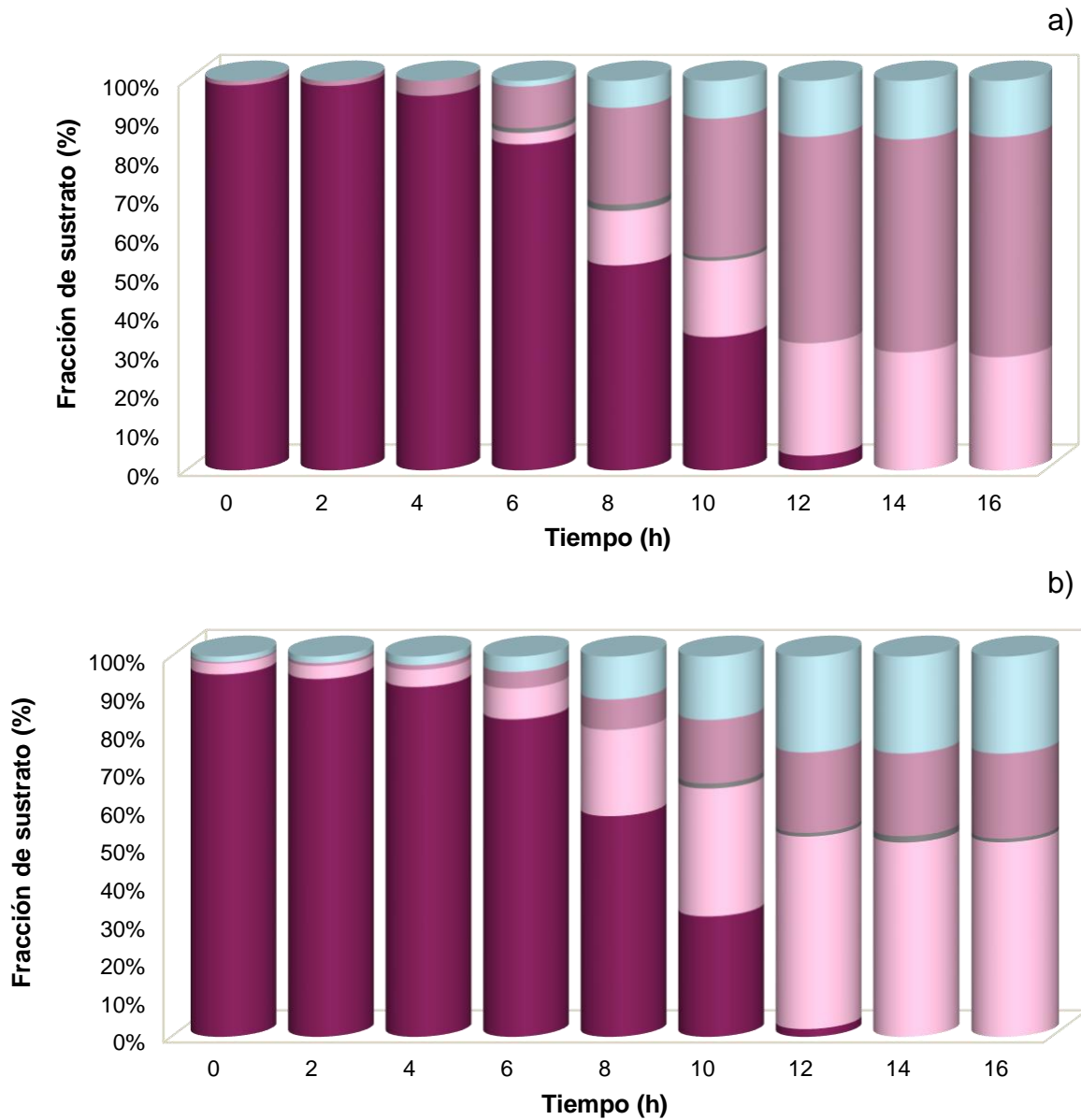


FIGURA 18. Balances de carbono a diferentes tiempos de fermentación para un cultivo aireado (a) y limitado de oxígeno (b) con 30 g/L de glucosa inicial. Glucosa residual (■), Etanol (■), Glicerol (■), Biomasa (■) y CO₂ (■)

Contrario a esto en ausencia de oxígeno, una pequeña fracción del sustrato es utilizada para la formación de biomasa y la mitad de la fracción de carbono de la glucosa es convertida a etanol.

Se presentan en la Tabla 9, los rendimientos de etanol y biomasa, así como las concentraciones máximas obtenidas en las fermentaciones limitadas y en presencia de oxígeno.

TABLA 9. Rendimientos y concentraciones máximas de etanol y biomasa de *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 en medios limitados y no limitados de oxígeno.

| [S] g/L | Sin O ₂ | | | | Con O ₂ | | | |
|---------|--------------------|------------|-----------------|------------|--------------------|------------|-----------------|------------|
| | [Etanol] (g/L) | Yp/s (g/g) | [Biomasa] (g/L) | Yx/s (g/g) | [Etanol] (g/L) | Yp/s (g/g) | [Biomasa] (g/L) | Yx/s (g/g) |
| 30 | 14.09 ± 0.56 | 0.4 | 6.52 ± 0.26 | 0.19 | 8.93 ± 0.34 | 0.25 | 17.82 ± 0.71 | 0.49 |
| 50 | 22.9 ± 0.68 | 0.41 | 11.28 ± 0.56 | 0.20 | 14.4 ± 0.55 | 0.26 | 24.8 ± 0.74 | 0.44 |

Se observa que en ausencia de oxígeno se ve favorecida la vía fermentativa alcanzando rendimiento alrededor de 0.4 g/L de etanol, pero en presencia de oxígeno la vía respiratoria es la que se encuentra activa, obteniendo rendimientos de biomasa elevados, mientras que las concentraciones de etanol disminuyen significativamente.

Cabe destacar, que el efecto que presenta la levadura, conduce a una activación de la glucólisis anaeróbica para satisfacer las demandas celulares de ATP debido a la menor eficacia de la producción de ATP por fermentación en comparación con la respiración, es decir, el consumo de glucosa es mejor en ausencia de oxígeno que en su presencia.

La regulación de este efecto, está dada principalmente por la enzima fosfofructoquinasa, la cual es considerada la enzima regulatoria de la glucólisis y del efecto Pasteur. Sin embargo existen otros factores intracelulares y extracelulares que han sido implicados en el control del flujo glucolítico sobre la expresión del efecto Pasteur, incluyendo: iones de amonio (Lloyd *et al.*, 1983), fosfato orgánico (Lagunas y Gancedo, 1983), intermediarios de la vía glucolítica

(Muller *et al.*, 1995), AMP (Dombek e Ingram, 1988) y pH intracelular (Rowe *et al.*, 1994).

Para la determinación del efecto Custer, se tomó en cuenta además de la producción de etanol, la síntesis de ácido acético en el medio, y se observó que en ambas concentraciones de sustrato inicial, se vio favorecida la producción de etanol pero no la de ácido acético.

Con el objetivo de determinar si *Pichia kudriavzevii* ITV S-42 presentaba el efecto Crabtree, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de sustrato en un medio aireado, y se establecieron diferentes concentraciones (1,5,10 g/L) en el medio de cultivo, debido a que generalmente concentraciones cercanas a 5 g/L de glucosa afectan no solo a las enzimas respiratorias sino también a la expresión de varios genes involucrados con el transporte y consumo de azúcares (Carlson, 1987), como GLU, SUC, MAL, GAL (genes utilizados para el metabolismo de glucosa, sacarosa, maltosa y galactosa, respectivamente).

Se muestra el comportamiento cinético de un proceso en un fermentador operado por lote alimentado con 1, 5 y 10 g/L de azúcares totales en la alimentación respectivamente, este tipo de operación es empleado en procesos en los que el crecimiento celular y/o la formación de producto son sensibles a la concentración del sustrato limitante. Este método se emplea cuando se quieren evitar fenómenos de inhibición por sustrato y se requiere alcanzar una alta concentración de biomasa (Zampraka y Damarola, 2008).

La alimentación se inició a las 12 horas, aunque a las 18 h se observó que el crecimiento celular se mantenía constante. Se observa en la Figura 19a, que al alimentarse 1 g/L de glucosa en el medio, la levadura lo utiliza para su crecimiento, ya que la producción de etanol no se ve favorecida

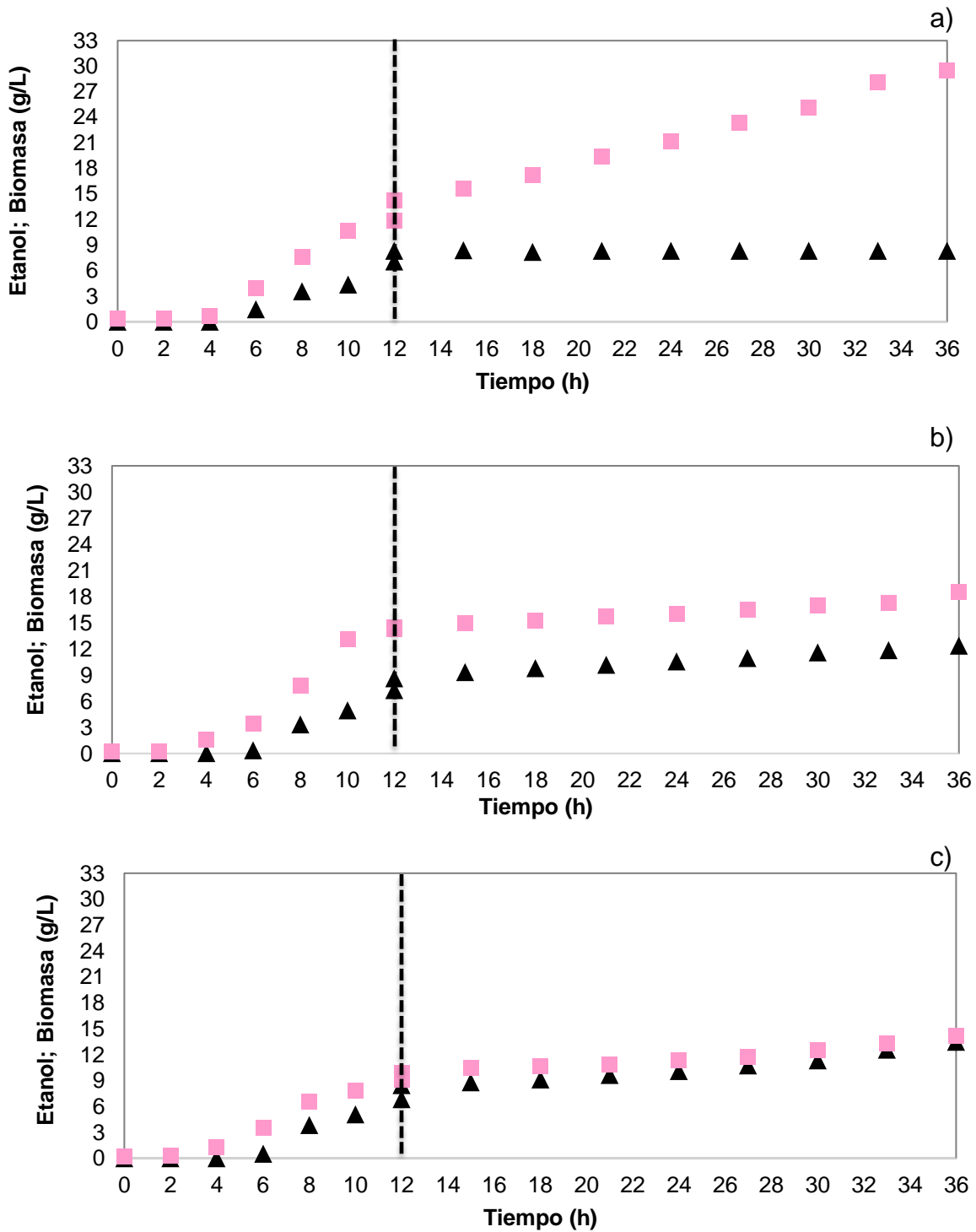


FIGURA 19. Efecto del oxígeno y diferentes concentraciones de sustrato (a) 1g/L; (b) 5 g/L; (c) 10 g/L sobre la producción de etanol (▲) y el crecimiento celular (■)

Sin embargo al incrementarse la concentración de azúcares al medio (5 y 10 g/L) (Figura 19b, 19c), esta tendencia desaparece y se ve reflejado el incremento tanto de biomasa como de etanol en el medio de cultivo.

En la Figura 20 se presentan las concentraciones y rendimientos alcanzados por la levadura al ser expuesta a diferentes concentraciones de sustrato y como su metabolismo se ve derivado hacia la fermentación o respiración.

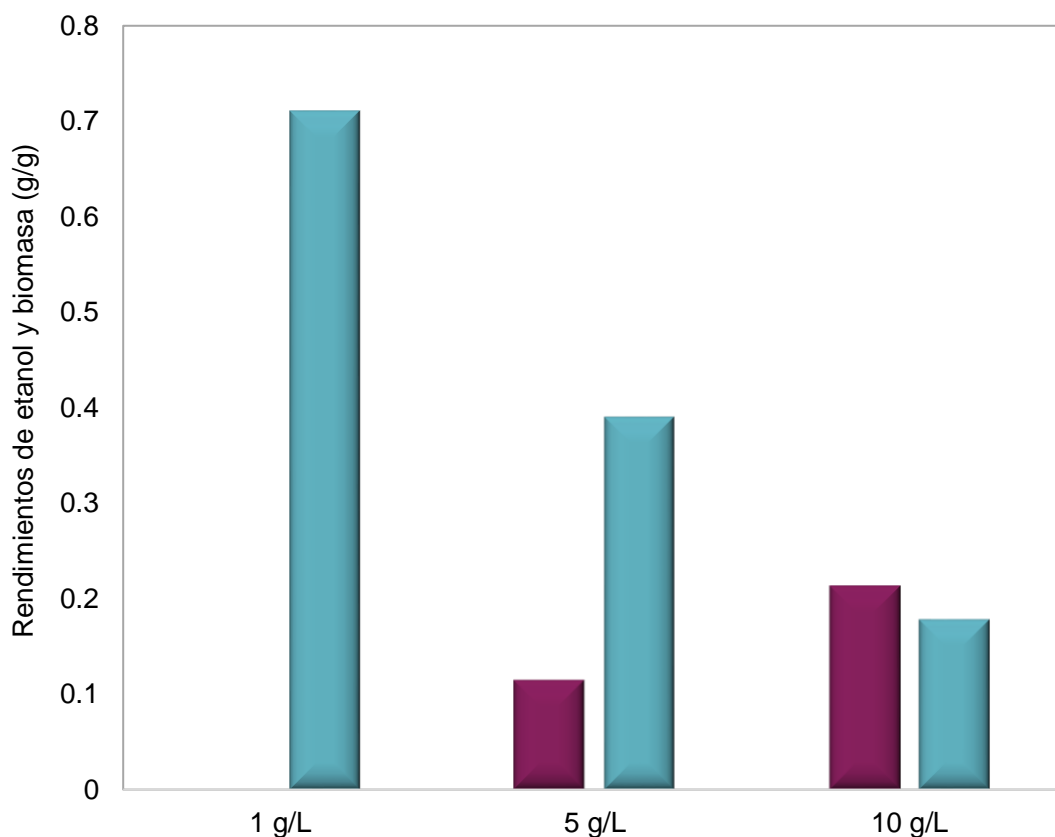


FIGURA 20. Rendimientos de etanol (■) y biomasa (■) alcanzados por *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 en fermentaciones aerobias a diferentes concentraciones de sustrato

El mecanismo propuesto para justificar este comportamiento es la acumulación de piruvato en la glucólisis, generando una saturación en el metabolismo respiratorio; dicha acumulación causa que el piruvato no sea metabolizado

mediante respiración celular y tenga que ser derivado hacia la producción de etanol (Kappeli y Sonnleitner, 1986; Blank and Sauer 2004).

Dichos resultados se corroboran los resultados obtenidos por los balances estequiométricos, presentados en la Figura 21, para las fermentaciones realizadas con 1 y 10 g/L de glucosa inicial.

Estos resultados, informan como la levadura es dependiente de la concentración de oxígeno y sustrato en el medio de cultivo, ya que cuando es expuesta a condiciones aerobias y bajas concentraciones de sustrato, la fuente de carbono es utilizada solo para el crecimiento celular, en tanto que a medida que las concentraciones de sustrato en el medio se elevan, dirige su metabolismo a la formación de etanol.

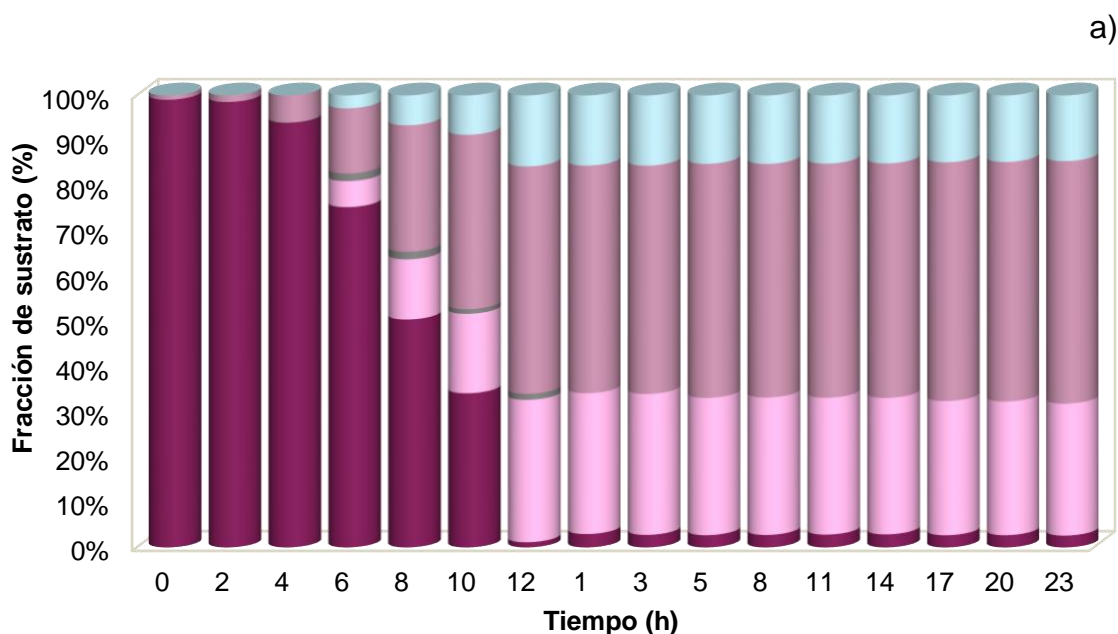


FIGURA 21. Balances de carbono a diferentes tiempos de fermentación para un cultivo aireado de *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 cultivado en 1 g/L (a) y 10 g/L (b) de glucosa

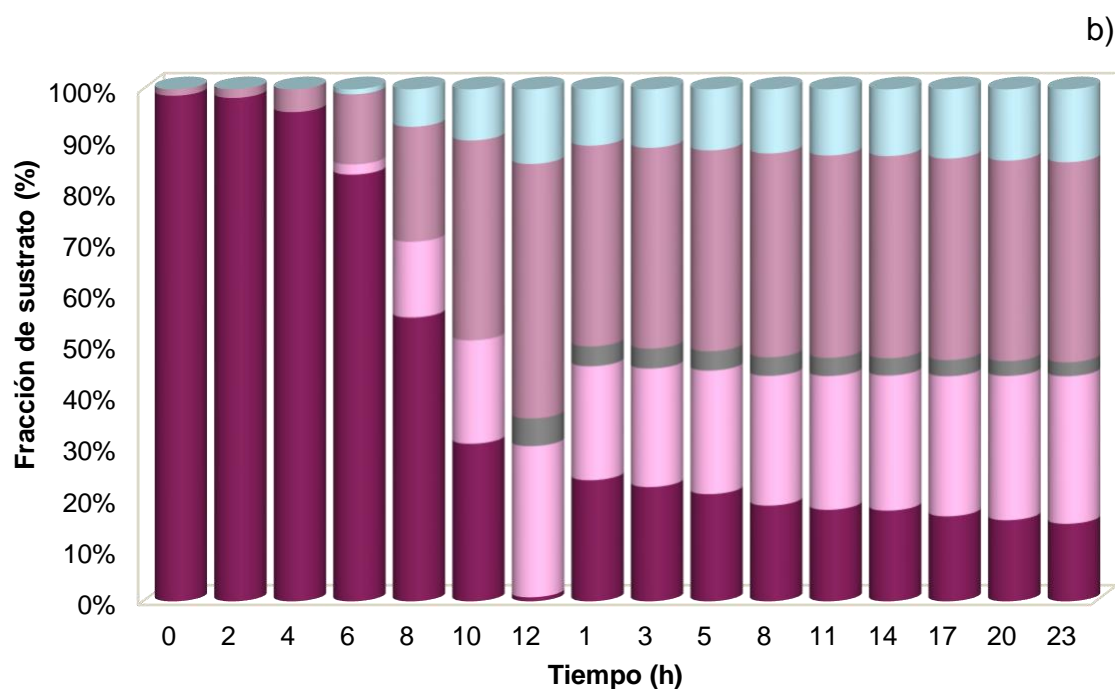


FIGURA 21. Continua

En una fermentación alcohólica el consumo total de la glucosa es mayor para levaduras que crecen en presencia de oxígeno y en altas concentraciones de glucosa. No obstante, cuando los niveles de glucosa disminuyen, las enzimas respiratorias ya no son reprimidas y se induce a su síntesis, resultando un consumo de etanol cuando las células inician una segunda fase de crecimiento conocida como diáuxica (Walker, 1998).

En *Saccharomyces cerevisiae*, altas concentraciones de glucosa inducen al incremento de 3-4 veces la actividad de piruvato descarboxilasa y disminuye la actividad de acetaldehído deshidrogenasa, favoreciéndose la fermentación alcohólica. Aunque en levaduras Crabtree negativas, una importante producción de etanol es generalmente ausente durante condiciones aeróbicas, debido a que estas no reprimen su respiración cuando se encuentran sometidas a altas concentraciones de glucosa y en aerobiosis.

Debido a que *Saccharomyces cerevisiae* también fermenta fructosa, este efecto no solo es aplicado a glucosa. De Deken (1966), reportó que *S. cerevisiae* respira y fermenta en presencia de manosa o galactosa.

6.5. Evaluación del efecto del oxígeno y del medio de cultivo sobre la producción de etanol y el crecimiento celular.

Se realizaron experimentos a nivel fermentador utilizando jugo de caña de azúcar y jugo de sorgo dulce, con la finalidad de evaluar el potencial de *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 como levadura productora de bioetanol o biomasa.

Se presentan a continuación los resultados obtenidos de las cinéticas realizadas con jugo de caña de azúcar y jugo de sorgo dulce, en un medio con aireación (AER) , limitado de oxígeno (ANA) y limitado de oxígeno con enriquecimiento de nutrientes (ANAE) (MSE2, medio enriquecido 2).

Los resultados obtenidos para los experimentos utilizando jugo de caña de azúcar, mostraron que *Pichia kudriavzevii* ITV-S42, fue capaz de fermentar en un medio con limitación de oxígeno pero enriquecido con nutrientes, de esta forma se logró obtener aproximadamente 8 g/L de etanol con un rendimiento de 0.288 g/g, comparado con los resultados obtenidos con los medios que no fueron enriquecidos en donde los cuales los rendimientos de etanol se encontraron alrededor de 0.01 g/g.

Sin embargo las concentraciones obtenidas de biomasa en un medio aireado, aunque, si bien no se encontraba enriquecido, logró alcanzar una concentración de 10.5 g/L y un rendimiento de biomasa de 0.342 g/g.

En el caso del jugo de sorgo dulce, *Pichia kudriavzevii* ITV-S42, logró producir 23 g/L de etanol en un medio con limitación de oxígeno y enriquecido con nutrientes, obteniendo con este resultado, un rendimiento de etanol de 0.41 g/g, el cual resulta ser similar a los obtenidos en fermentaciones a nivel industrial por *Saccharomyces cerevisiae*.

Además la concentración de biomasa en comparación con el jugo de caña de azúcar se incrementó 2.2 veces más utilizando jugo de sorgo dulce como medio de cultivo, bajo las mismas condiciones de fermentación, produciendo 23 g/L de biomasa con un rendimiento de 0.43 g/g.

Se observa en la Tabla 10, las concentraciones máximas obtenidas de etanol y biomasa utilizando jugo de caña de azúcar y el jugo de sorgo dulce bajo distintas condiciones de cultivo, así como parámetros cinéticos y estequiométricos, los cuales reflejan, que *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 tiene mayor afinidad por el jugo de sorgo dulce que por la caña de azúcar.

Cabe señalar que se logra observar un incremento en la productividad de etanol (0.77 g/Lh) y biomasa (0.4/g/Lh) con el jugo de sorgo dulce que la obtenida con el jugo de la caña de azúcar.

TABLA 10. Concentraciones máximas obtenidas de etanol y biomasa; rendimiento de etanol (Yp/s), rendimiento de biomasa (Yx/s) y productividad (Qp) utilizando jugo de caña de azúcar y jugo de sorgo dulce bajo distintas condiciones de cultivo

| | ANA | | ANAE | | AER | |
|----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | JCA | JSD | JCA | JSD | JCA | JSD |
| Etanol (g/L) | 1.4 ± 0.078 | 18.79 ± 0.067 | 8.13 ± 0.046 | 23.13 ± 0.037 | 1.39 ± 0.051 | 12.04 ± 0.019 |
| Biomasa (g/L) | 6.78 ± 0.175 | 9.1 ± 0.014 | 6.84 ± 0.112 | 11.2 ± 0.068 | 10.5 ± 0.014 | 23 ± 0.71 |
| Yp/s (g/g) | 0.015 ± 0.012 | 0.39 ± 0.005 | 0.288 ± 0.004 | 0.41 ± 0.016 | 0.011 ± 0.021 | 0.19 ± 0.008 |
| Yx/s (g/g) | 0.161 ± 0.023 | 0.13 ± 0.019 | 0.106 ± 0.018 | 0.18 ± 0.027 | 0.342 ± 0.009 | 0.43 ± 0.038 |
| Qp (g/Lh) | 0.05 ± 0.017 | 0.63 ± 0.039 | 0.029 ± 0.014 | 0.77 ± 0.022 | 0.05 ± 0.016 | 0.4 ± 0.029 |

Este comportamiento que presenta la levadura, corrobora el efecto Pasteur que presenta esta levadura, la cual resulta ser capaz de fermentar en medios limitados de oxígeno y dirigir su metabolismo hacia el crecimiento celular cuando se encuentra en un ambiente de aerobiosis.

Aunque la afinidad que presenta por el jugo de sorgo dulce como sustrato a diferencia del jugo de la caña de azúcar, puede estar dada por composición del medio de cultivo. Se ha reportado que el jugo de caña de azúcar contiene alrededor de 90% de sacarosa y 4 % de glucosa disponible, además de carecer de distintos nutrientes, sin embargo el jugo de sorgo dulce presenta un contenido de sacarosa de 53% aproximadamente, 33% de glucosa y 21% de fructosa disponible (Serna-Saldivar, 2010; Almodares 2008), siendo así un medio con mayor contenido de azúcares asimilables por *Pichia kudriavzevii* ITV-S42.

Conforme a los resultados anteriores y como parte de una alternativa para el aprovechamiento total del jugo de sorgo dulce, un medio de cultivo aun no reportado para ser utilizado por esta levadura en fermentaciones alcohólicas, se propuso utilizar a *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 en un co-cultivo con *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 una levadura autóctona capaz de fermentar sacarosa.

Estos experimentos fueron llevados a cabo inoculando a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01, la cual tiene la capacidad de utilizar sacarosa para la producción de etanol, a diferentes tiempos de fermentación (0, 12, 24 h).

Los resultados de estos experimentos se presentan en la Figura 22, se observa que cuando ambas levaduras se inocularon al inicio de la fermentación, el consumo de azúcares fue total, sin embargo se vio afectada la producción de etanol, mientras que el crecimiento celular se favoreció a lo largo de toda la cinética.

Mientras que cuando el inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 se realizó después de las 24 h el tiempo de fermentación se incrementó, logrando con esto disminuir la productividad del proceso, en comparación con el tiempo de inóculo que se realizó a las 12 h después de iniciada la fermentación; siendo este el tiempo en el cual se logró obtener un rendimiento de etanol de 0.343 g/g y una productividad de 0.86 g/Lh, logrando el aprovechamiento de la materia prima a fermentar; lo cual podría deberse a que los microorganismos no compiten por el sustrato para su crecimiento y solo se dedican a transformar los azúcares disponibles para la producción de etanol.

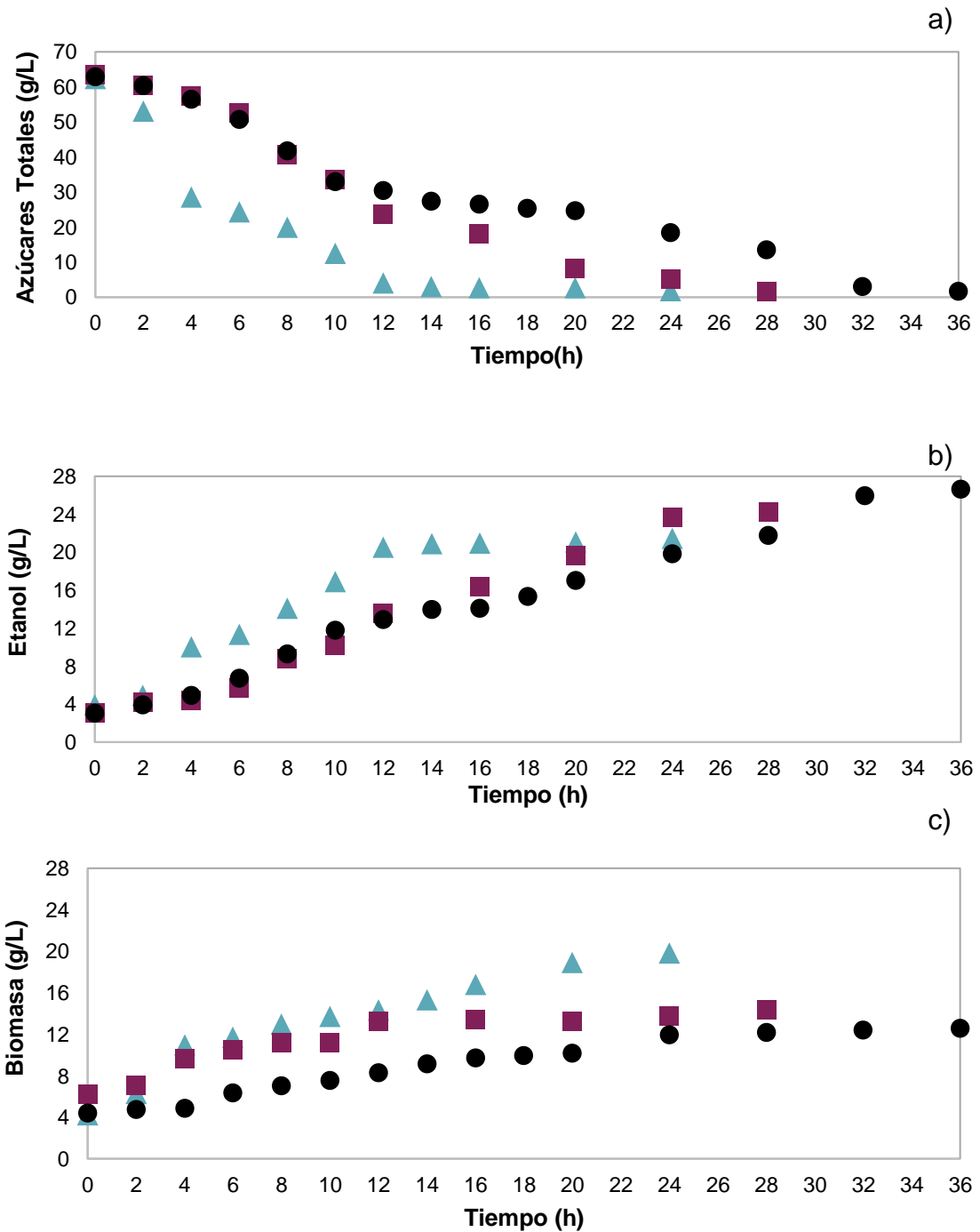


FIGURA 22. Evaluación del cocultivo de *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 y *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 en jugo de sorgo dulce sobre el consumo de azúcares fermentables (a), producción de etanol (b) y biomasa (c) a diferentes tiempos de fermentación. Tiempo de inóculo: T0 (▲), T12 (■) y T24 (●)

7. CONCLUSIONES

- Las fuentes de carbono asimilables y fermentables para la cepa de levadura *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 fueron: glucosa, fructosa; mientras que xilosa y sacarosa no fueron metabolizadas . El glicerol fue utilizado por la levadura solo para crecimiento celular.
- La Actividad Killer se mantuvo durante toda la fermentación en todas las fuentes de carbono utilizadas en el crecimiento de la levadura; incluyendo al glicerol aunque no es una fuente fermentable
- Al incrementar la concentración de sales se reduce casi 12 h el tiempo de fermentación, lo que conlleva al incremento de la productividad. Con el incremento de extracto de levadura y sales en el medio de cultivo, se logró mejorar la tolerancia a etanol de 35 g/L a 90 g/L, así como una disminución del tiempo de fermentación de 24 h.
- *Pichia kudriavzevii* ITV-S42, presenta el efecto Crabtree y el efecto Pasteur, considerado una ventaja de esta levadura, ya que se puede dirigir su metabolismo hacia procesos de fermentación o respiración según la aplicación industrial de la levadura.
- *Pichia kudriavzevii* ITV-S42, fue capaz de crecer y producir etanol en jugo de caña de azúcar y jugo de sorgo dulce, siendo este último el medio en el que mejor se adaptó la levadura; además de ser utilizada en cocultivos para el mejor aprovechamiento de este medio de cultivo industrial.

8. RECOMENDACIONES

- Evaluar la producción de etanol en hidrolizado enzimático de bagazo de sorgo dulce y caña de azúcar
- Escalar las cinéticas de producción de etanol en jugo de sorgo dulce a nivel planta piloto.
- Extraer y cuantificar lípidos de *Pichia kudriavzevii* ITV-S42 presentes en glucosa y glicerol.
- Caracterizar la cinética de producción de biodiesel por la levadura *Pichia kudriavzevii* ITV-S42

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar-Uscanga, M. G. (1998). Caractérisation cinétique et métabolique d' une souche de *Brettanomyces*. Tésis Doctoral. I. P. N. Toulouse, Francia.

Almodares, A., Hadi, M. R. y Ahmadpour, H. (2008). Sorghum Stem yield and soluble carbohydrates under different salinity levels. *Afr. J. Biotechnol.* Vol. 22 (7): 4051-4055.

Almodares A, Taheri R, Adeli S (2008b). Stalk yield and carbohydrate composition of sweet sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] cultivars and lines at different growth stages. *J. Malesian Appl. Biol.* 37: 31-36.

Almodares, A. y Hadi, M. R. (2009). Production of bioethanol from sweet sorghum: A review. *Afr. J. Biotechnol.* Vol. 9: 77-780.

Amore, R., Kotter, P., Kuster, C., Ciriacy, M., Hollenberg, C.P. (1991). Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of the NAD(P)H-dependent xylose reductase-encoding gene (XYL1) from the xylose-assimilating yeast *Pichia stipitis*. *Gene.* Vol. 109: 89–97.

Andreas, M. H., Annette A., Nils-Gunnar C., Ulf S. y Thomas A. A. (2012). Degradation of phytate by *Pichia kudriavzevii* TY13 and *Hanseniaspora guilliermondii* TY14 in Tanzanian togwa. *Int. J. Food Microbiol.* Vol. 153 : 73–77

Aristidou, A. y Penttilä, M. (2000). Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Curr Opin Biotechnol.* Vol. 11(2):187-98.

Ariyajarearnwong, P., Laopaiboon L., Jaisil P. y Laopaiboon P. (2001). Repeated-batch ethanol fermentation from sweet sorghum juice by free cells of *Saccharomyces cerevisiae* NP 01. *Afr. J. Biotechnol.* Vol. 10 (63): 13909-13918

Blanco, C.A. y Rayo, J. (2008). Improving Industrial Full-Scale production of Baker's yeast by optimizing aeration control. *J. AOAC Int.* 607-613.

Bonaly, R., Dari, L., Kubiak, C., Lejeune, C., Lematre J. y Poulain, D. (1985). Altération des parois de *Candida Albicans* cultivé en présence de doses sublétales de nystatine. *Ann. Inst. Pasteur/ Microbiol.* Vol. 136: 181-193.

Bijender, K.B., Sandeepu, R. y Satbir, S. (2012). Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *J. Basic Microbiol.* Vol. 52: 1–11.

Brown, S.W. y Oliver, S.G. (1982). The effect of temperature on the ethanol tolerance of yeast *Saccharomyces uvarum*. *Biotechnol Lett.* Vol 4: 269-274.

Brown D. E. y Minihane B. J. (1986). Fed-batch culture technology. *Biotechnology Adv.* Vol. 4, 207-218.

Bruinenberg, P. M., de Bot, P. H. M., van Dijken, J. P. y Scheffers, W. A. (1984). NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19, 256–260.

Bussey, H. (1981). Physiology of killer factor in yeast. *Adv. Microb. Physiol.* Vol. 22: 93-122.

Camargo, C. A. Ushima, A. H. Ribeiro, A. M. M., Souza, M. E. P. y Santos, N. F. 1990. Manual de recomendações: conservação de energia na indústria do açúcar e do álcool. Instituto de Pesquisas Tecnológicas. São Paulo. Brasil.

Campos-Pastelín, J. (2008). Establecimiento de un proceso de producción de etanol a partir de jugo de caña y miel intermedia B con *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 y *Saccharomyces cerevisiae* EDV-493. Tesis de maestría I.T.V.

Carlson, M, Osmond, B. C. y Botstein, D. (1981). Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics*. Vol. 98: 25-40.

Casey, G.P. y Ingledew, W.M. (1986). Ethanol tolerance in yeasts. *Crit. Rev. Microbiol.* Vol 13: .219-290.

Castrillo, J.I., Kalitena, J., Weusthuis, R.A., Van Dijken, J.P. y Pronk, J.T. (1996). High cell density cultivation of yeast on disaccharides in oxygen limited batch cultures. *Biotechnol. and Bioeng.* Vol.31: 621-628.

Colville, C.A., Seatter, M.J., Jess, T. J., Gould, G. W. y Thomas, H. M. (1993). Kinetic analysis of the liver-type (GLUT2) and brain-type (GLUTS) glucose transporters in *Xenopus* oocyte substrate specificities and effects of transport inhibitors. *Biochem. J.* Vol.290: 701-706.

De Deken, R.H. (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J. Gen. Microbiol.* Vol. 44:149-156

Díaz-Nava, L.E. (2014). Aislamiento y selección de levaduras para la producción de etanol durante la fermentación espontánea de jugo de sorgo dulce. Tesis de maestría. I.T.V.

Dickinson, J., Scweiser, M., Ed. (2003). *Metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*. London.

Dombek, K.M. e Ingram, L.O. (1988). Intracellular accumulation of AMP as a cause for the decline in the rate ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* during batch fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol.54: 98-104.

Evy, A. A., Jaseetha A. S. y Nilanjana D. (2013). Atrazine degradation in liquid culture and soil by a novel yeast *Pichia kudriavzevii* strain Atz-EN-01 and its potential application for bioremediation. *JAPS.* Vol. 3 (06): 035-043.

Fiechter, A., Fuhrmann, C.F. y Kippeli, O. (1981). Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Adv. Microbiol, Phys.* Vol. 22: 123-183.

Fleet, G.H. (2003) Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* Vol. 86: 11-22.

Flores, C.L. , Rodriguez, C., Petite, T. y Gancedo, C. (2000). Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeast. *FEMS Microbiol Rev.* Vol. 24: 507-529.

Folch, J., Lees, M. y Sloane, S.G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226. 497-509.

Gancedo, C. y Serrano, R. (1989). Energy-yielding metabolism, en: The Yeast. 2a edición. Londres. Vol. 3: 205-259.

García-Camús, J.R., García-Laborda, J.A. (2006). Biocarburantes líquidos: biodiesel y bioetanol. Informe de vigilancia tecnológica. Círculo de innovación en tecnologías medioambientales y energía (CITME). Dirección URL: <http://www.madrid.org/bvirtual/BVCM001698.pdf> (Consulta: 04 de junio 2015).

García-Cortes, V. (2004). Introducción a la Microbiología 2ª Edición. Editorial EUNED. 12-113.

García-Ochoa, F., Gomez, E., Santos V.E., Merchuck, J.C (2010). Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochem. Eng. J.* 49:289-307.

Gost, J. L. y Villa, I. (1993). Presente y futuro de los elementos traza. *Act. Ped. Esp.* Vol. 51: 227-233.

Guillaume, C., Delobel, P., Sablayrolles, J.M y Blondin, B. (2007). Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a mutated HXT3 allele enhances fructose fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 73(8):2432- 2439.

Harinder, S. O., Neha, B., Simranjeet, K. S., Sandeep, S. D., Ujjal, K. , Chadha, B. S. y Vinod K. B. (2012). Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 39:557–566.

Hernandez, A., Martin, A., Cordoba M.G. y Benito, M.J. (2008). Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Int. J. Food Microbiol.* Vol 121:178–188

Ingledeu, W.M. (1995). The Biochemistry of the alcohol roduction. En *The Alcohol Textbook* (Eds.Lyons, T., Kelsall,D. y Murtagh,J.) Noottingham University Press, 1995.

Ingram, L.O and Buttke, T.M. (1984). Efects of alcohols on microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* Vol 25: 256-300.

Jolly, N. P., Augustyn, O.P.H y Pretorius I.S. (2006). The Role and Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Wine Production. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* Vol. 27 (1).

Kalitena, J., Weusthuis, R.A., Castrillo, J.I., Van Dijken, J.P. y Pronk, J.T. (1995). Transient responses of *Candida utilis* to oxygen limitation: regulation of the Kluyver effect for maltose. *Yeast*. Vol.11: 317-325.

Kappeli, O. (1986). Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeast. *Adv. Microb. Physiol.* Vol. 28: 181-203.

Keeley, J.E. y Rundel, P.W. (2003). Evolution of CAM and C4 carbon-concentrating mechanisms, *Int. J. Plant. Sci.* Vol. 164 (3): 55-77.

Kruckeberg, A.L. (1996). The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cel. Biochem.* Vol. 27: 139-146.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W. y Boekhout, T. (2011). *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, Fifth edition. Vol 1.

Lagunas, R. (1979). Energetic irrelevance of aerobiosis for *S. cerevisiae* growing on sugars. *Mol. Cel. Biochem.* Vol. 27: 139-146.

Lagunas, R. (1981). Is *Saccharomyces cerevisiae* a typical facultative anaerobe?. *Trends Biochem Sci.* Vol.6:201-202.

Lagunas, R. (1993). Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbial.* Vol. 104: 229-242.

Lagunas, R. y Gancedo, C. (1983). Role of phosphate in the regulation of Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.* Vol. 137: 479-483.

Lehninger, A.L. (1993). Bioquímica. Ediciones Omega. Segunda Edición. Barcelona. 1117 p.

Lloyd, D., Krinstensen, B. y Degn, H. (1983). Glycolysis and respiration in yeast: the effect of ammonium ions studied by mass spectrometry. *J.G. Microbiol.* Vol. 129: 2125-2127.

Mamma, D., Koullas, D., Fountoukidis, G., Kekos, D., Macri, B.J. y Koukios, E. (1996). Bioethanol from sweet sorghum: simultaneous saccharification and fermentation of carbohydrates by a mixed microbial culture. *Process. Biochem.* Vol 31 (4): 377–381.

Manginot, C., Roustan, J., Sablayrolles, J. (1998). "Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation, importance of the stationary phase." *Enzyme and microbial technology* Vol. 23: 511-517.

Mariscal Moreno, J.P. (2011). Evaluación y selección de microorganismos para la producción de etanol a nivel industrial. Maestría Tesis. Universidad Nacional de Colombia.

Masoud, W., Cesar, L.B., Jespersen, L., Jakobsen, M. (2004). Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast.* Vol. 21:549-556.

Middelbeek, E. J., Hermans, J.M.H. y Stumm, C. (1979). Production, purification and properties of a *Pichia kluyveri* Killer toxin. *Antonie van Leeuwenhoek.* Vol.45: 437-450.

Montoya-Villafane, H.H. (2008). Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2ª edición. Universidad de Antioquia.

Moulin, G., Boze, H. y Galzy, P. (1984). Inhibition of alcoholic fermentation. *Biotechnol. Gen. Eng. Rev.* Vol. 2: 365-382.

Muller, S., Boles, E., May, M. y Zimmerman, F.K. (1995). Different internal metabolites trigger the induction of glycolytic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.* Vol. 177: 4517-4519.

Nagodawithana, T.W., Whitt, J.T. y Cutaia, A.J. (1977). Study of the feedback effect of ethanol on selected enzymes of the glycolytic pathway. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* Vol 35: 179-183.

Navarro, J.M. y Durand, G. (1978). Fermentation alcoolique: influence de la temperature sur l'accumulation d'alcool dans les cellules de levure. *Ann Microbiol.* Vol 129: 215-224.

Nielsen, J., Villadsen, J., Lidén, G. (2003). *Bioreaction engineering principles*. New York, Plenum Publishers.

Ortiz-Muñiz, B., Carvajal-Zarrabal, O., Torrestiana-Sánchez, B. y Aguilar-Uscanga, M.G. (2010). Kinetic study on ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 yeast isolated from sugar cane molasses. *J. Chem Tech. Biotechnol.* Vol 85: 1361-1367.

Ortiz-Zamora, O.C. 2006. Obtención de cepas autóctonas osmotolerantes, resistentes a altas concentraciones de etanol y con actividad killer. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz. México.

Owen, P.W. (1991). Biotecnología de la fermentación. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España.

Panchal, C.J. (1990). Yeast strain selection. *Biotechnology and Bioprocessing Series*. Marcel Dekker Inc.

Pfeiffer, P. y Radler, F. (1984). Comparison of the killer toxin of several yeast and the purification of a toxin of type K2. *Arch. Microbiol.* Vol. 137: 357-361.

Phowchinda, O., Delia-Dupuy, M.L. y Strehaiano, P. (1997). Alcoholic fermentation from sweet sorghum: some operating problems. 9th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, Bangkok, Thailand.

Pronk, J.T., Steensma, H.Y y Van Dijken, J.P. (1996). Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* Vol.12: 1607-1633.

Querol, A. y Fleet, G. (2006). The yeast handbook volume 2. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Ramon-Portugal, F. (1995). Interaction de type Killer entre levures: Analyse cinétique, co-culture et modélisation. Tesis Doctoral. I. P. N. Toulouse, Francia.

Riballo- Fernández, M.E. (1995). Mecanismo de inactivación catabólica de las proteínas de membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Doctorado. Madrid, España.

Rodrigues, F. Ludovico, P. y Leão, C. (2006). Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Cap.6: 101-121.

Rosini, G. (1983). The occurrence of Killer characters in yeast. *Can. J. Microbiol.* Vol.29:1462-1464.

Rowe, S.M, Simpson, W.J. y Hammond, J.R.M. (1994). Intracellular pH of yeast during brewery fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.* Vol. 18: 135-137.

Sánchez, O.J y Cardona C.A. (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. INCI. Vol. 30 (11): 671-678.

Sablayrolles, J., Dubois, C., Manginot, C., Barre, P. (1996). "Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations." Journal of Fermentation and Bioengineering Vol. 82 (4): 377-381.

Sandeep, S. D., Harinder, S. O., Simranjeet, K. S., Dhiraj, N., Dinesh, K. y Satinder K. U. (2011). Enhanced ethanol production from sugarcane juice by galactose adaptation of a newly isolated thermotolerant strain of *Pichia kudriavzevii*. Bioresour Technol. Vol. 102. 5968–5975

Santosh, S., Meikandhan, T., Saurabh, S. y Vidhya, R. (2013). Biodiesel production from a newly isolated *Pichia kudriavzevii* strain. Fuel. Vol.106: 690–696.

Scheffers, W.A. (1987). Alcoholic fermentation. Studies in Micology. Vol.30: 321-332.

Scheffers, W.A. y Wiken, T.O. (1969). The Custer effect (negative Pasteur effect) as a diagnostic criterion for the genus *Brettanomyces*. Antonie Van Leeuwenhock. Vol.35: A31-32-

Serna-Saldivar, S. (2010). Cereal Grains: Properties, Processing, and Nutritional Attributes CRC Press. Food Preservation Technology.

Sims, A.P. y Barnett, J.A. (1978). The requirement of oxygen for the utilization of maltose, cellobiose and D-galactose by certain anerobically fermenting yeast (Kluyver effect). J.G. Microbiol. Vol.106: 277-288.

Singh, A. y Mishra, P. (1995). Microbial pentose utilization. Current applications in biotechnology. Progress in Industrial Microbiology. Vol. 33.

Smith, C.W. y Frederiksen, R.A. (2000). Sorghum: Origin, history, technology, and production, John Wiley and Sons, New York.

Stark, J.M.R. y Boyd, A. (1986). The Killer toxin of *Kluyveromyces lactis*: characterization of the toxins subunits and identification of the genes which encode them. EMBDO J. Vol. 5: 1995-2002.

Strehaiano, P. (1984). Phénomènes d' inhibition et fermentation alcoolique. Tesis Doctoral. I. P. N. Toulouse, Francia.

Thailandier, P., Ramon Portugal F., Fuster, A. y Strehaiano P.(2007).Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content. Food Microbiology 24: 95-100.

Theobald, U., Mohns, J. y Rizzi, M. (1996). Determination of *in vivo* cytoplasmatic orthophosphate concentration in yeast. Biotechnol. Tec. Vol. 10: 297-302.

van Vuuren, H.J.J. y Wingfield, B. D. (1986). Killer yeast-cause of stuck fermentations in a wine cellar. S. Afr. J. Enol. Vitic. Vol. 7: 113-118.

Vázquez, H.J. y Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. Ingeniería Investigación y Tecnología. Vol. 8 (4): 249-259.

Walker, M. G. (1998). Yeast physiology and biotechnology. John Wiley and Sons. England.

Weusthius, R.A., Visser, W., Pronk, J.T., Scheffers, W.A. y Van Dijken, J.P. (1994). Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeast: a continuous culture study of the Kluver effect. *Microbiology (UK)*. Vol. 140: 703-715.

Wolf, K. (1996). No conventional Yeast in Biotechnology. A Handbook. Berlin. Springer Verlag. 618 p.

Xiao, H., Shao, Z., Jiang, Y., Dole, S. y Zhao, H. (2014). Exploiting *Issatchenkia orientalis* SD108 for succinic acid production. *Microb Cell Fact.* Vol. 13:121.

Yazdani, S.S. y Gonzalez, R. (2007). Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* Vol. 18: 213-219.

Zampraka, L. y Damarola, M. O. (2008). Experimental study of the production of biomass by *Saccharomyces cerevisiae* in a fed-batch fermentor. *Afr. J. Biotechnol.* 1107-1114.