

**ESTUDIO DE LA DINÁMICA POBLACIONAL DE
MICROORGANISMOS SILVESTRES DEGRADADORES
Y/O FERMENTADORES DE CARBOHIDRATOS PARA
LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO
ACADÉMICO DE**

DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

**EN LA ESPECIALIDAD DE
PROCESOS AGROINDUSTRIALES**

PRESENTA

M.C.T.A. TANIA GONZÁLEZ FLORES



CIENCIA Y TECNOLOGIA

Guadalajara, Jalisco a 23 de Noviembre de 2017

CONSEJO GENERAL DEL POSGRADO
INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial de la estudiante **Tania González Flores**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “ESTUDIO DE LA DINÁMICA POBLACIONAL DE MICROORGANISMOS SILVESTRES DEGRADADORES Y/O FERMENTADORES DE CARBOHIDRATOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por /la estudiante para aspirar al grado de Doctor en Ciencia y Tecnología en la opción terminal de Procesos Agroindustriales durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 23 del mes de Noviembre el año dos mil diecisiete.

Dra. Ingrid Mayanín Rodríguez Buenfil

Tutor

Dra. María de los Ángeles Sánchez Contreras

Tutor en planta

Dr. Juan Carlos Mateos Díaz

Asesor



CIENCIA Y TECNOLOGIA

Mérida, Yucatán a 11 de Diciembre de 2017

CONSEJO GENERAL DEL POSGRADO
INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del Jurado del Examen de Grado de la estudiante **Tania González Flores**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “ESTUDIO DE LA DINÁMICA POBLACIONAL DE MICROORGANISMOS SILVESTRES DEGRADADORES Y/O FERMENTADORES DE CARBOHIDRATOS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la estudiante para aspirar al grado de Doctor en Ciencia y Tecnología en la opción terminal de Procesos Agroindustriales durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 11 del mes de Diciembre del año dos mil diecisiete.


Dr. Luis Felipe Barahona Pérez

Presidente


Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez

Secretario


Dra. Teresa del Rosario Ayora Talavera

Vocal

Dra. Ingrid Mayanín Rodríguez Buenfil

Vocal


Dr. Max Mizraim Apolinar Hernández

Vocal 3

TÍTULO

**ESTUDIO DE LA DINÁMICA POBLACIONAL DE
MICROORGANISMOS SILVESTRES DEGRADADORES Y/O
FERMENTADORES DE CARBOHIDRATOS PARA LA
PRODUCCIÓN DE BIOETANOL**

Presenta: M. C. Tania González Flores

Directora de tesis: Dra. Ingrid Mayanín Rodríguez Buenfil

Co-Directora de tesis: Dra. María de los Ángeles Sánchez Contreras

Asesor: Dr. Juan Carlos Mateos Díaz

RESUMEN

Se determinaron las condiciones medioambientales para el crecimiento y producción alcohólica de seis cepas de levaduras silvestres, determinando los factores como el pH del medio de cultivo, la temperatura y la agitación, así como las interacciones que tienen efecto sobre las respuestas evaluadas: velocidad máxima de crecimiento (μ_{max} , h⁻¹), tiempo de duplicación (T_d), cantidad de biomasa producida (Δx , g/L), población (ΔP_{ob} , cel/ml), producción neta de alcohol (ΔP , g/L), productividad máxima (P_{max} g/L.h), productividad total (P_{total} , g/L.h), velocidad de producción de etanol (r_P , g/L.h) y, velocidad de consumo de sustrato (r_S , g/L.h). Al analizar la producción de biomasa y de etanol a las mejores condiciones para cada cepa se encontró que existe diferencia estadísticamente significativa entre ellas, siendo mejor en cuanto a producción de biomasa la cepa *Candida glabrata* N1, mientras que en producción alcohólica lo fue la cepa *Kluyveromyces marxianus* HY1. También se establecieron las mejores condiciones para el crecimiento de cuatro bacterias ruminales, evaluando como factores el pH y la temperatura; se encontró que dichos factores, así como sus interacciones, tienen influencia sobre los parámetros cinéticos de crecimiento de las bacterias ruminales estudiadas, siendo particular para cada una de ellas las condiciones de cultivo que les permitan crecer de manera más eficiente. A continuación se determinó la capacidad de producción de etanol de las levaduras silvestres en medio mínimo adicionado con diferentes fuentes de carbono. Para ello se efectuó un diseño factorial 4 x 5 en el que los factores evaluados fueron la cepa (L4B, API-1, N1 y HY1) y la fuente de carbono (glucosa, fructosa, galactosa, sacarosa y xilosa). La cepa que produjo la mayor cantidad de etanol fue *Kluyveromyces marxianus* L4B, alcanzando 16.31 ± 0.77 g/L en medio YNB adicionado de fructosa. Las cepas *K. marxianus* L4B y HY1 destacan por ser las únicas que pueden crecer y producir etanol a partir de galactosa. Aunque la cepa L4B tuvo la capacidad de crecer escasamente en medio YNB adicionado de xilosa, no fue capaz de producir etanol a partir de esta fuente de carbono. El análisis estadístico realizado indicó que existe diferencia estadísticamente significativa tanto para los parámetros de crecimiento como de producción alcohólica obtenidos, en función de la fuente de carbono y la cepa utilizada, siendo la cepa *K. marxianus* L4B la que presenta el mejor desempeño, seguida de la cepa *K. marxianus* HY1. Se determinó la influencia de carbohidratos complejos como fuente de carbono, sobre el crecimiento y producción de enzimas en las bacterias ruminales, encontrándose que la cepa *Bacillus* sp. (Xer-19) presentó mayor actividad hidrolítica, específicamente en cuanto a xilanasas, celulasas y β -glucosidasas. Para verificar la dinámica poblacional se realizó un cultivo mixto secuencial con las cepas *K. marxianus* HY1 y *Bacillus* sp. Xer-19 en un medio sintético similar en composición a la harina de limón persa; sin embargo, aun cuando sí se presentó crecimiento, no fue posible la detección de alcohol. Por lo que se evaluó la producción de alcohol nuevamente en un cultivo mixto, utilizando como sustrato harina de limón persa y variando las proporciones del microorganismo hidrolítico y el fermentador, encontrándose una mejor producción de alcohol cuando creció la levadura HY1 sola. La fermentación de hidrolizado de este sustrato rindió menos alcohol que cuando se usó la harina como parte del medio de cultivo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Página

RESUMEN.....	II
ÍNDICE DE CONTENIDO	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	XI
Abreviaturas empleadas.....	XII
DEDICATORIA	XIII
AGRADECIMIENTOS.....	XIV
1. ANTECEDENTES.....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	4
3. HIPÓTESIS.....	6
4. OBJETIVOS.....	6
4.1 Objetivo general.....	6
4.2 Objetivos particulares.....	6
5. FUNDAMENTACIÓN	7
5.1 Biocombustibles	7
5.2 Composición de la biomasa vegetal.....	9
5.3 Biomasa cítrica	12
5.4 Microorganismos celulolíticos.....	13
5.5 Microorganismos fermentadores	16

5.6	Cultivos mixtos	17
6	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	20
7	MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
7.1	Microorganismos.....	21
7.1.1	Levaduras	21
7.1.2	Bacterias ruminales.....	21
7.1.3	Morfología macro y microscópica.....	21
7.1.4	Identificación microbiana.....	22
7.1.5	Medios de cultivo.....	22
7.2	Evaluación de la respuesta del crecimiento de levaduras bajo diferentes condiciones medioambientales.....	23
7.2.1	Pre-inóculo	23
7.2.2	Factores evaluados.....	23
7.3	Determinación de las condiciones medioambientales para el crecimiento de bacterias ruminales en medio de cultivo sintético	25
7.3.1	Pre-inóculo	25
7.3.2	Factores evaluados.....	25
7.4	Perfil de asimilación y fermentación de azúcares por las levaduras silvestres en medio sintético	26
7.4.1	Perfil preliminar de asimilación.....	26
7.4.2	Fermentación de diferentes fuentes de carbono	27
7.5	Caracterización de la producción de enzimas celulolíticas de las bacterias ruminales	27
7.5.1	Fuente de carbono	27
7.5.2	Determinación preliminar de actividades hidrolíticas	27
7.5.3	Caracterización de la producción de enzimas celulolíticas en diferentes fuentes de carbono	28
Figura 7.	Producción celulasas por bacterias ruminales.....	29
7.5.4	Determinación de actividad CMCasas, pectinasas, xilanasas	29
7.5.5	Determinación de actividad β -piranosidasa	30
7.5.6	Determinación de actividad proteasa	30

7.6 Cultivos mixtos.....	31
7.6.1 Pruebas de inhibición	31
.....	31
7.6.2 Fermentación en hidrolizado enzimático de HLP.....	32
7.7 Métodos analíticos.....	32
7.7.1 Determinación de la población celular	32
7.7.2 Determinación de peso seco de la biomasa.....	32
7.7.3 Determinación de azúcares reductores directos liberados	33
7.7.4 Determinación de azúcares por HPLC.....	33
7.7.5 Determinación contenido de etanol	33
7.7.6 Cuantificación del contenido de proteína en sobrenadantes bacterianos.....	33
7.8 Cálculo de parámetros cinéticos de crecimiento y producción	34
7.8.1 Determinación Velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{max} h^{-1}$).....	34
7.8.2 Determinación tiempo de duplicación (TD, h).....	34
7.8.3 Productividad total.....	35
7.8.4 Productividad máxima.....	35
7.8.5 Velocidad de producción.....	35
7.8.6 Velocidad de consumo de sustrato.....	35
8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
CAPITULO I.....	36
Identificación de los microorganismos.....	36
8.1 Levaduras	36
8.2 Bacterias ruminales.....	39
CAPITULO II.....	41
Establecimiento de las condiciones medioambientales adecuadas para el crecimiento y producción alcohólica de levaduras silvestres en medio de cultivo sintético.....	41
8.3 Crecimiento.....	42
8.3.1 Población.....	42
8.3.2 Peso seco.....	45

8.3.3 Velocidad máxima de crecimiento y tiempo de duplicación	49
8.4 Producción de alcohol	55
8.4.1 Productividad máxima y productividad total	57
8.4.1 Velocidad producción y velocidad de consumo de sustrato.....	62
CAPÍTULO III	68
8.5 Determinación de las condiciones medioambientales para el crecimiento de bacterias ruminales en medio de cultivo sintético	68
8.5.1 Cepa Bacillus subtilis Xer-15.....	68
8.5.2 Cepa Bacillus subtilis Xer-18.....	70
8.5.3 Cepa Bacillus sp. Xer-19	73
8.5.4 Cepa Bacillus subtilis Xer-28.....	75
8.6 Obtención del perfil de asimilación y fermentación de mono y disacáridos de las levaduras silvestres en medio sintético	80
8.6.1 Perfil preliminar	80
8.6.2 Producción alcohólica por levaduras silvestres en diferentes fuentes de carbono... 87	87
CAPITULO V.....	105
8.7. Caracterización de la producción de enzimas lignocelulolíticas de las bacterias ruminales.	105
8.7.1. Asimilación de carbohidratos complejos en medio sólido.....	105
8.7.2. Caracterización de la producción de enzimas celulolíticas en diferentes fuentes de carbono	108
CAPITULO VI.....	120
8.8. Establecimiento de los cultivos mixtos con los microorganismos seleccionados en medio sintético y complejo a base de cítricos.	120
8.1.1 Cultivo mixto en medio sintético	120
8.1.2 Cultivo mixto en HLP	122
8.1.3 Fermentación de HLP hidrolizada enzimáticamente	125
9. CONCLUSIONES.....	127

10.	RECOMENDACIONES	129
11.	ANEXO 1. Análisis estadístico	130
12.	ENTREGABLES	147
13.	BIBLIOGRAFÍA	150

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Producción de energía en México (Gracida-Rodríguez y Pérez Díaz, 2014)	2
Figura 2. Potencial de la bioenergía en México (García-Bustamante y Masera-Cerutti, 2016)	2
Figura 3. Componentes principales y estructura de la lignocelulosa. “Fer” representa esterificación con ácido ferúlico (Modificado de Isikgor y Becer, 2015).	11
Figura 4. Estrategia experimental.....	20
Figura 5. Esquema de propagación y cinética de crecimiento en medio YPG.....	24
Figura 6. Esquema de propagación y cinética de crecimiento de bacterias ruminales en medio celobiosa.	26
Figura 7. Producción celulasas por bacterias ruminales.....	29
Figura 8. Actividad bacterias ruminales vs. levaduras.....	31
Figura 9. Relación filogenética de las cepas de levaduras silvestres	38
Figura 10. Relación filogenética de las bacterias ruminales	40
Figura 11. Cinética de crecimiento para la cepa <i>C. glabrata</i> N1 en medio YPG a) 30°C, pH 5.5, 250 rpm y b) 40°C, pH 4.5, 0 rpm	41
Figura 12. Diagramas de pareto para la variable respuesta población de cada una de las cepas de levaduras silvestres.	45
Figura 13. Peso seco obtenido para cada una de las cepas de levaduras silvestres bajo diferentes condiciones de cultivo.	46
Figura 14. Diagramas de pareto para la variable respuesta peso seco de cada una de las cepas de levaduras silvestres.	49
Figura 15. Diagrama de Pareto para la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) de las cepas silvestres.....	53
Figura 16. Diagrama de Pareto para el tiempo de duplicación (TD) de las cepas silvestres.	53
Figura 17. Producción neta de alcohol durante 24 h por levaduras silvestres inoculadas en medio de cultivo sintético.	55
Figura 18. Diagrama de Pareto para la productividad máxima de las levaduras silvestres.	61
Figura 19. Diagrama de Pareto para productividad total de las levaduras silvestres.	61
Figura 20. Diagrama de Pareto para la velocidad de producción de las cepas de levadura.	65
Figura 21. Diagrama de Pareto para la velocidad de consumo de diferentes cepas de levadura.....	65
Figura 22. Cinética de crecimiento de la cepa Xer-15 en medio celobiosa, 35°C, pH 7.0.	68
Figura 23. Gráfico de interacción para las respuestas: población (a), la biomasa (b) y rs (c) de la cepa Xer-15....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 24. Cinética de crecimiento de la cepa Xer-18 a 40°C y pH 6.0, en medio celobiosa.	71
Figura 25. Gráfico de interacción para las respuestas: población (a) y rs (b) para la cepa Xer-18.....	72
Figura 26. Gráfico de medias para la variable respuesta peso seco para la cepa Xer-18.....	73
Figura 27. Cinética de crecimiento de la cepa Xer-19 en cultivo en medio celobiosa a 40°C y pH 5.0.	74
Figura 28. Gráfico de interacción para las respuestas: población (a), ΔX (b) y rs (c) para la cepa Xer-19.	75
Figura 29. Cinética de crecimiento de la cepa Xer-28 en medio celobiosa a 40°C y pH 6.0 (tratamiento 5).	76
Figura 30. Gráfico de interacción para las respuestas: población (a), ΔX (b) y rs (c) para la cepa Xer-28.	77
Figura 31. Perfil de asimilación de fuentes de carbono de las levaduras HY1, L4B, MG y API-2.....	81
Figura 32. Gráfico de medias para el cambio de densidad óptica de las cepas HY1, L4B, MG y API-2 en distinta fuente de carbono.	82
Figura 33. Perfil de asimilación de fuentes de carbono de la levadura N1.	83
Figura 34. Gráfico de medias para el cambio de densidad óptica de la cepa N1 en distinta fuente de carbono. .	84
Figura 35. Perfil de asimilación de fuentes de carbono de la levadura API-1.	85
Figura 36. Gráfico de medias para el cambio de densidad óptica de la cepa API-1 en distinta fuente de carbono.	85
Figura 37. Población promedio de las cepas de levadura silvestre en diferentes fuentes de carbono: L4B (a), API-1 (b), N1 (c), HY1 (d), API-2(e) y MG (f).....	89
Figura 38. Peso seco promedio de las cepas de levadura silvestres en diferentes fuentes de carbono: L4B (a), API-1 (b), N1 (c), HY1 (d), API-2 (e) y Mg (d).	93
Figura 39. Gráfico de medias y de interacción obtenido para el parámetro ΔX	98
Figura 40. Producción de etanol promedio de las cepa L4B (a), API-1 (b) N1 (c) , HY1 (d), API-2 (e) y MG (f) en medio YNB adicionado con diferentes fuentes de carbono (condiciones de cultivo: 40°C, 0 rpm)	99
Figura 41. Producción de etanol en diferente fuente de carbono	101
Figura 42. Gráfico de medias y de interacción obtenidos para el parámetro de producción de alcohol.....	101
Figura 43 Gráfico de medias obtenido para el parámetro de productividad máxima.	104
Figura 44. Búsqueda inicial de actividades hidrolíticas en diferentes sustratos al 0.5%, harina de limón persa (a), harina de limón italiano (b), xilano de abedul (c), xilano de haya (d), celulosa (e), celobiosa (f), carboximetilcelulosa CMC (g), pectina cítrica (h) y almidón (i).	106
Figura 45. Población promedio de la cepa Xer-15 en diferentes sustratos. Condiciones de cultivo: 40°C, pH 6.0, 100 rpm.....	109
Figura 46. Variaciones en el peso seco de la cepa <i>Bacillus subtilis</i> Xer-15 en diferentes sustratos a lo largo de 8 días de crecimiento a pH 6.0, 100 rpm y 40°C.	111
Figura 47. Cambio del pH en el medio de cultivo a lo largo de la cinética de la cepa <i>Bacillus subtilis</i> Xer-15 en diferentes sustratos.	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 48. Cuantificación del contenido de proteína en sobrenadantes de la cepa Xer-15 crecida en diferente fuente de carbono.	114
Figura 49. Actividad enzimática de los sobrenadantes de la cepa Xer-15 creciendo en harina de limón persa (pH 6.0, 40°C, 100 rpm)	115
Figura 50. Actividad celulasa y xilanasas de sobrenadantes de bacterias ruminales creciendo en harina de limón persa.	117
Figura 51. Electroforesis en gel de acrilamida SDS 12% de sobrenadantes concentrados: A) Revelado con azul de Coomassie y B) Zimograma actividad β -glucosidasa 2 μ g proteína/ μ l sobrenadante.	118
Figura 52. Cultivos secuenciales en harina cítrica sintética.....	121
Figura 53. Población y producción de alcohol durante la fermentación de HLP, condiciones de cultivo: 40°C, 100 rpm, pH 6.0	123
Figura 54. Consumo de glucosa durante la fermentación de HLP con diferentes proporciones de microorganismos.	125
Figura 55. Cinética de fermentación de hidrolizado de HLP.....	125

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Ventajas y desventajas del bioetanol de segunda generación	9
Tabla 2. Microorganismos celulolíticos	14
Tabla 3. Utilización de carbohidratos por bacterias ruminales celulolíticas y no celulolíticas	15
Tabla 4. Levaduras silvestres a caracterizar y origen de aislamiento.	21
Tabla 5. Diseño experimental 2 ³ de la caracterización fisiológica de las levaduras silvestres.....	24
Tabla 6. Diseño experimental empleado en la caracterización de bacterias ruminales.	25
Tabla 7. Carbohidratos utilizados para establecer el perfil preliminar de asimilación de las levaduras silvestres.	26
Tabla 8. Caracterización morfológica de las levaduras silvestres.....	37
Tabla 9. Caracterización morfológica de las bacterias ruminales.....	39
Tabla 10. Población máxima alcanzada por las levaduras silvestres en cada uno de los tratamientos evaluados.	43
Tabla 11. Factores que influyen sobre la cantidad de biomasa como peso seco producida por cada cepa.	48
Tabla 12. Velocidad máxima de crecimiento en medio sintético para las cepas de levadura silvestres.....	51
Tabla 13. Tiempo de duplicación en medio sintético para las cepas de levadura silvestres.....	51
Tabla 14. Condiciones de cultivo establecidas para las levaduras silvestres	54
Tabla 15. Factores que influyen sobre la cantidad de alcohol producida por cada cepa.....	56
Tabla 16. Productividad máxima alcanzada en medio sintético por las cepas de levadura silvestres.	60
Tabla 17. Productividad total en medio YPG por las cepas de levadura silvestres.	60
Tabla 18. Velocidad de producción de alcohol en medio YPG para las cepas de levadura silvestres.	64
Tabla 19. Velocidad de consumo de glucosa en medio YPG para las cepas de levadura silvestres.	64
Tabla 20. Mejores condiciones para la producción de alcohol en medio sintético para las levaduras silvestres ..	66
Tabla 21. Prueba de rangos múltiples para la producción biomasa como peso seco y de alcohol a las mejores condiciones para cada cepa.	67
Tabla 22. Parámetros cinéticos de crecimiento obtenidos para la cepa <i>B. subtilis</i> Xer-15*	69
Tabla 23. Parámetros cinéticos de crecimiento obtenidos para la cepa Xer-18*	71
Tabla 24. Parámetros cinéticos de crecimiento para la cepa Xer-19 en medio de cultivo celobiosa*	74
Tabla 25. Parámetros cinéticos de crecimiento para la cepa Xer-28 en medio de cultivo celobiosa*	76
Tabla 26. Mejores condiciones de crecimiento para las bacterias ruminales en medio de cultivo celobiosa	78
Tabla 27. Nivel de preferencia de las fuentes de azúcar por las diferentes levaduras silvestres, basados en los promedios de densidad óptica.	86
Tabla 28. Parámetros cinéticos de crecimiento de las cepas silvestres en diferentes fuentes de carbono.....	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 29. Parámetros cinéticos de producción de alcohol de las cepas de levadura silvestres en diferentes fuentes de carbono.....	102
Tabla 30. Halos de hidrólisis observados en carboximetilcelulosa (tinción con rojo congo)	107
Tabla 31. Parámetros cinéticos de la cepa Xer-15 en diferentes fuentes de carbono.....	112
Tabla 32. Actividades hidrolíticas determinadas en los sobrenadantes de la cepa Xer-15 creciendo en distintas fuentes de carbono.....	115

Abreviaturas empleadas

Abreviación	Descripción
YPG	Yeast Peptone Glucose
CMC	Carboximetil celulosa
HLP	Harina de Limón Persa
EtOH	Etanol

DEDICATORIA

A todos aquellos tangibles e intangibles que forman parte de
mi proyecto de vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ) Unidad Sureste, por facilitar el uso de las instalaciones y equipos para la realización de este trabajo de investigación.

Al Fondo Mixto CONACYT-Gobierno del Estado de Yucatán, Convocatoria 2011-C09, Folio 169165, por el financiamiento al proyecto de investigación “Aprovechamiento integral de los subproductos de la industria citrícola del Estado de Yucatán para la obtención de metabolitos de alto valor agregado”, del cual deriva esta tesis.

A mis directoras de tesis, Dra. Ingrid Mayanín Rodríguez Buenfil y Dra. María de los Ángeles Sánchez Contreras, por sus consejos, conocimientos y apoyo brindados durante este trabajo doctoral, y a mi Asesor el Dr. Juan Carlos Mateos por transmitirme sus conocimientos para la medición de las actividades celulolíticas.

A mi comité sinodal integrado por las Dras. Elizabeth Ortiz y Teresa Ayora y los Drs. Felipe Barahona, y Manuel Ramírez por sus comentarios que permitieron enriquecer el contenido de esta tesis.

A la Dra. AnaLuisa Ramos por su invaluable apoyo para la identificación molecular de los microorganismos estudiados.

A Vicente, Emanuel y Jesús “Chucho”.

1. ANTECEDENTES

Debido al inminente agotamiento de las reservas petroleras, aunado a la problemática mundial de emisiones a la atmósfera de gases de efecto invernadero y el consecuente calentamiento global, las tendencias actuales están enfocadas hacia la producción de etanol y otros alcoholes combustibles a través de procesos fermentativos, empleando preferentemente biomasa vegetal; el etanol así obtenido es el biocombustible más ampliamente utilizado en mezclas con gasolina.

Los procesos convencionales para lograr la bioconversión a etanol incluyen generalmente hidrólisis ácida o enzimática de la celulosa y hemicelulosa presentes en la biomasa seguida de la fermentación de los azúcares solubles resultantes. No obstante, para que los biocombustibles de origen agrícola sean una alternativa energética efectiva se necesita que estos productos, no sólo presenten características equivalentes a los de procedencia fósil, sino también que en los procesos de obtención, se consigan balances energéticos positivos y que lleguen al mercado con un costo similar o mejor al que tienen actualmente los derivados del petróleo.

El incremento en los rendimientos de la producción de alcohol por fermentación depende tanto del empleo de cepas microbianas adecuadas, como de un sustrato apropiado para la fermentación. Adicionalmente, la mayoría de los microorganismos de uso industrial están patentados y no están disponibles para su uso fuera de su país de origen, lo que dificulta la rápida expansión de los procesos de fermentación. Por lo tanto, existe una necesidad real de disponer de cepas microbianas silvestres, aisladas preferentemente de sustratos regionales, que tengan una amplia capacidad hidrolítica o fermentadora para la producción de etanol a partir de biomasa vegetal.

En México, la producción de energía primaria en el año 2011 fue de más de 9 mil PetaJoules (PJ) y solo el 4% provenía de energía obtenida de biomasa (Figura 1). Sin embargo, en nuestro país existe un gran potencial de recursos biomásicos para producir biocombustibles líquidos, sólidos y biogás (Figura 2) siendo la principal fuente la biomasa procedente de bosques y selvas seguida de residuos agroindustriales (García-Bustamante y Masera-Cerutti, 2016).

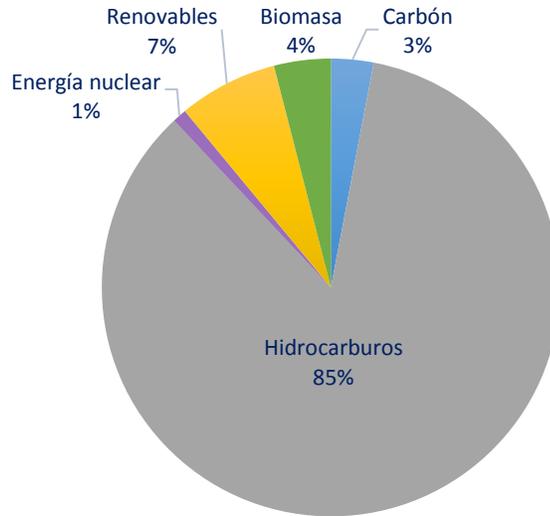


Figura 1. Producción de energía en México (Gracida-Rodríguez y Pérez Díaz, 2014)

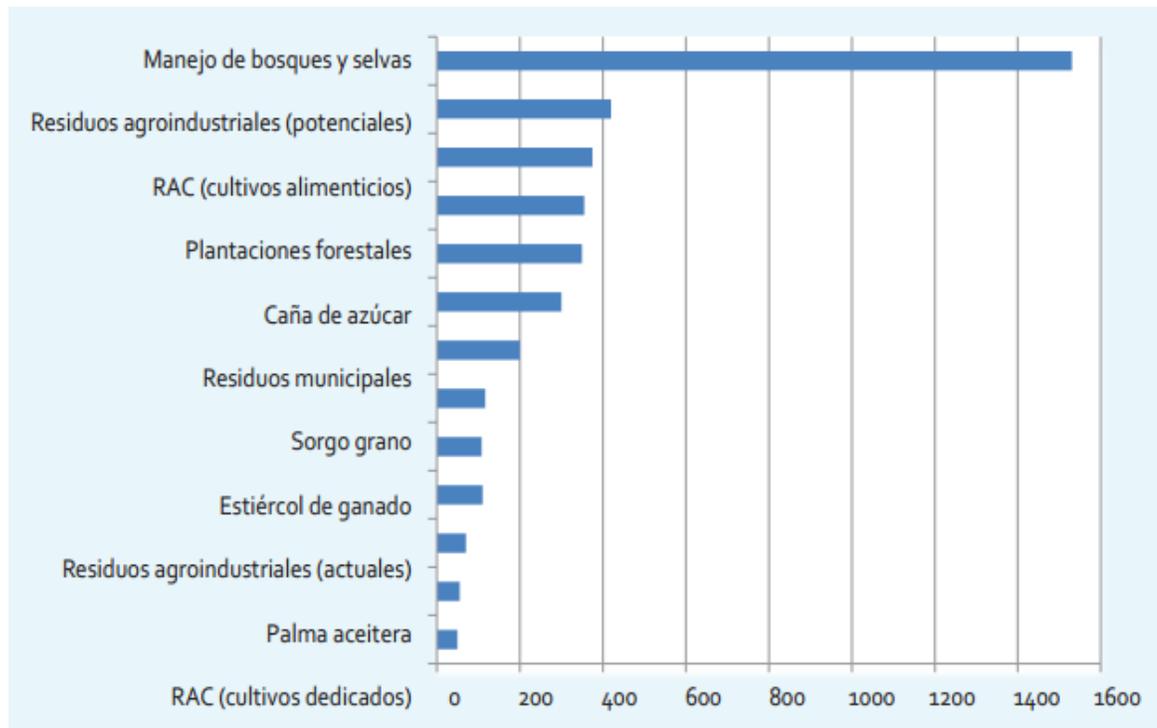


Figura 2. Potencial de la bioenergía en México (García-Bustamante y Masera-Cerutti, 2016)

La biomasa de residuos agroindustriales es una de las alternativas más atractivas entre las fuentes de combustibles, además de ser una fuente renovable de energía. Dentro de las materias primas que podrían emplearse para la obtención de biocombustibles líquidos como el

etanol, se puede mencionar los residuos de cítricos (cáscaras, semillas y bagazo), estos no son aprovechados totalmente puesto que en algunas regiones se dejan en el campo para su degradación natural, lo que genera grandes cantidades de residuos sólidos ricos en carbohidratos que podrían utilizarse para la fermentación alcohólica a través de cultivos mixtos que involucren tanto microorganismos celulolíticos como fermentadores.

2. JUSTIFICACIÓN

La celulosa es uno de los materiales más ampliamente utilizados para la obtención de energía, desde tiempos remotos se ha realizado la combustión de la madera para mover diferentes máquinas. En épocas más recientes se ha efectuado la conversión de material lignocelulósico en biocombustibles, de tal forma que no se compita con la alimentación humana, pues anteriormente se han utilizado almidones procedentes de granos alimenticios. Para la liberación de los diferentes azúcares monoméricos que se encuentran constituyendo la pared celular es necesario realizar algún pretratamiento enzimático para la conversión directa de los azúcares presentes en la celulosa y hemicelulosa, de tal forma que los hidrolizados así obtenidos puedan ser bioconvertidos a etanol, empleando los microorganismos fermentadores adecuados, ya sea de forma individual o como cultivos mixtos, pues en los hidrolizados pueden estar presentes tanto hexosas como pentosas, con el fin de que puedan ser empleados como biocombustibles.

El conocimiento disponible sobre la microbiota distribuida en un ambiente dado inicia sustentando la función que desempeñan en ese ámbito, para ello es necesario tener una caracterización plena de sus capacidades asimilativas o de su repertorio biocatalítico. Para una degradación eficiente de los polímeros constituyentes de la biomasa vegetal, (la celulosa, hemicelulosa y pectina), se requieren diferentes actividades enzimáticas, incluyendo aquellas que rompan los enlaces glucosídicos y eliminen los grupos sustituyentes, además de la coutilización de las hexosas y pentosas liberadas. Los microorganismos que tienen un amplio rango de sustratos para su crecimiento son interesantes debido a que un metabolismo rápido y eficiente de los azúcares que incluya tanto las fracciones de celulosa como de hemicelulosa es crítico para una conversión eficiente de la biomasa lignocelulósica.

Es de gran importancia identificar y caracterizar microorganismos que puedan asimilar una gran variedad de carbohidratos, como los presentes en la biomasa vegetal, para que las pentosas y hexosas así liberadas puedan ser aprovechadas por microorganismos fermentadores. Lo anterior puede contribuir grandemente a tener mejores eficiencias de conversión enzimática de polímeros de celulosa, hemicelulosa y pectina a azúcares

fermentables. La caracterización de los microorganismos hidrolíticos y de los fermentadores tanto de pentosas como de hexosas, permitirá contribuir al conocimiento de organismos de rápido crecimiento, que tengan una mayor resistencia y que logren asimilar múltiples carbohidratos. En este sentido, es interesante considerar la fuente de carbono y energía que será utilizada por los microorganismos específicos como inicios de la caracterización de su maquinaria enzimática, lo cual permita incrementar el conocimiento sobre su fisiología y su posible aplicación biotecnológica. Por lo anterior, en este trabajo se ha planteado estudiar los patrones de crecimiento de microorganismos ruminales nativos y levaduras silvestres, en diferentes condiciones medioambientales para establecer los patrones de asimilación de carbohidratos en medios sintéticos, y posteriormente evaluar sus interacciones en cultivo mixto empleando sustratos agroindustriales, con el fin de obtener bioetanol.

3. HIPÓTESIS

El empleo de cultivos mixtos con microorganismos hidrolíticos y fermentadores permitirá obtener altos rendimientos de etanol a partir de fuentes complejas como la biomasa cítrica.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estudiar la dinámica poblacional de cultivos mixtos de microorganismos silvestres degradadores y/o fermentadores de carbohidratos para la obtención de bioetanol en medio sintético y en medio complejo.

4.2 Objetivos particulares

- Establecer las condiciones medioambientales adecuadas para el crecimiento y producción alcohólica de levaduras silvestres en medio de cultivo sintético.
- Determinar las condiciones medioambientales apropiadas para el crecimiento de bacterias ruminales en medio de cultivo sintético.
- Obtener el perfil de asimilación y fermentación de mono y disacáridos de las levaduras silvestres en medio sintético.
- Caracterizar la producción de enzimas lignocelulolíticas de las bacterias ruminales, utilizando como sustrato medio sintético adicionado con carbohidratos complejos.
- Establecer los cultivos mixtos con los microorganismos seleccionados en medio sintético y complejo a base de cítricos, considerando diferentes proporciones y tiempos de inóculo.

5. FUNDAMENTACIÓN

5.1 Biocombustibles

El incremento de la demanda energética se asocia principalmente al crecimiento y avance de las naciones, especialmente en las áreas de transporte automotor y, dado que su desarrollo tecnológico está hoy relacionado con el uso del petróleo, la energética mundial está compuesta en su mayor parte de derivados de combustibles fósiles, en particular la gasolina y el diesel, productos que ocasionan evidentes efectos ambientales negativos. Por otra parte, muchos países presentan una tendencia creciente en el consumo de energéticos que supera su capacidad de autosuficiencia, lo que genera una dependencia de los países productores de petróleo. Para romper dicha dependencia y contrarrestar los efectos ambientales en el uso de derivados del petróleo, los biocombustibles aparecen como elementos esenciales de las políticas energéticas a nivel mundial.

Con las crisis recurrentes en los precios del petróleo a nivel internacional y las consecuentes repercusiones en las economías de los países en vía de desarrollo, la búsqueda de productos capaces de reducir la dependencia del petróleo es una tarea importante y urgente. Las investigaciones para promover la energía renovable se han incrementado en varios países, como alternativas a los combustibles fósiles, cuya expectativa de utilización es finita y su agotamiento está cada vez más próximo (Antoni et al., 2007).

La demanda global de los biocombustibles líquidos se ha triplicado entre 2000 y 2007, lo cual indiscutiblemente muestra el incremento en la tendencia hacia el uso de biocombustibles derivados de plantas alimenticias. En la Unión Europea se ha decretado que el bioetanol representen el 10% del uso en transporte en el 2020, adicionalmente se ha propuesto sustituir para el 2030 el 30% de la gasolina por biocombustibles (Ferreira-Leitão y col. 2010).

El bioetanol producido de una manera eficiente y sostenible puede ofrecer numerosas ventajas ambientales y sociales, en comparación con los combustibles fósiles. Es una de las fuentes potenciales que pueden reducir el consumo de gasolina y la contaminación ambiental, por ejemplo, en Brazil, el bioetanol reemplaza aproximadamente el 40% de la gasolina,

mientras que en el resto del mundo representa un 3% (Ferreira-Leitao y col., 2010). El bioetanol obtenido a partir de azúcares y almidón es llamado de primera generación mientras que el alcohol obtenido a partir de material lignocelulósico (también denominado biomasa) es llamado de segunda generación. La celulosa, hemicelulosa y pectinas se han vuelto muy atractivos desde el punto de vista energético, pues pueden ser degradadas para la obtención de glucosa y su posterior fermentación etanólica (Baig et al., 2004, Sainz, 2009).

El bioetanol mezclado con la gasolina produce un biocombustible de alto poder energético con características muy similares a la gasolina, pero con una importante reducción de las emisiones contaminantes en los motores tradicionales de combustión. El etanol puede mezclarse en cualquier proporción con gasolina convencional, así las mezclas comerciales más comunes incluyen E10 (10% etanol y 90% gasolina) y E85 (85% etanol y 15% del producto convencional de petróleo) (Balan et al., 2009).

Existe además otra alternativa para su uso, en forma de aditivo de la gasolina, como etil-terbutil éter (ETBE). La gasolina necesita de aditivos que aumenten su octanaje y así disminuya su capacidad autodetonante, incrementando su resistencia a la compresión. La adición de oxigenantes a la gasolina empezó en 1979 con el uso del metil ter-butil éter (MTBE), el cual permite la reducción en la emisión de compuestos aromáticos como el benceno y el tolueno y de monóxido de carbono al realizarse una combustión más completa hasta CO₂. Sin embargo, el MTBE es poco biodegradable y se ha prohibido su uso como aditivo oxigenante de la gasolina. El bioetanol se considera la siguiente mejor opción, pues presenta ventajas entre las que se pueden mencionar mayor contenido de oxígeno (por lo tanto, se requiere menor cantidad de aditivo), mayor octanaje, no es tóxico, reduce las emisiones de monóxido de carbono y no contamina las fuentes de agua (Sánchez y Cardona, 2005).

Este combustible se ha obtenido de fuentes agrícolas como maíz, arroz, trigo, caña de azúcar, remolacha y sorgo dulce (Nguyen et al., 2009), es decir, productos previamente destinados a la alimentación ahora se están canalizando para la producción de energéticos, lo que genera especulaciones en los precios de la materia prima y escasez de alimentos básicos (Canto-Canché, 2007). Por lo que la alternativa para evitar esta dependencia a fuentes alimenticias lo constituye la biomasa agroindustrial residual, considerada muchas veces como

un desecho, lo que ha conducido al desarrollo de nuevas tecnologías de bioconversión de residuos para la producción de bioetanol. En la tabla 1 se muestran algunas características favorables y desfavorables que presenta el etanol obtenido de biomasa vegetal de segunda generación con respecto al de primera generación (Keeney, 2009).

Tabla 1. Ventajas y desventajas del bioetanol de segunda generación

Ventajas	Desventajas
Menor nivel de impacto ambiental, pues presenta bajo nivel de emisiones.	La necesidad de inversiones de varios miles de millones de dólares para una planta procesadora.
Un mayor rendimiento en combustible o energía por hectárea, debido a que es posible aprovechar el total de la biomasa	Los problemas logísticos relacionados con el abastecimiento de materias primas para las plantas.
El potencial encerrado en el aprovechamiento de una gran diversidad de materia prima, y en particular, de residuos o desechos.	Competencia con otros usos como son la agricultura, el desarrollo urbano, usos forestales o hábitats naturales.
No compete por el suelo destinado a alimentos	La posible utilización de organismos genéticamente modificados

Fuente: Keeney, 2009

5.2 Composición de la biomasa vegetal

Los materiales lignocelulósicos tienen tres componentes fundamentales, los polisacáridos, la lignina y otras sustancias. En dependencia del tipo de biomasa lignocelulósica, los polímeros que la constituyen están organizados en estructuras complejas tri-dimensionales no uniformes y con composición relativamente variable. Los polisacáridos comprenden carbohidratos de alto peso molecular (celulosa y hemicelulosa), que representan entre el 60-80% del total de los materiales lignocelulósicos.

Celulosa

La celulosa es el compuesto orgánico más abundante en la naturaleza ya que constituye el componente mayoritario de las paredes celulares de las fibras. Químicamente es un polímero lineal de β -D-Glucosa (Figura 3) con un peso molecular de aproximadamente 500,000. Las moléculas individuales de glucosa están unidas por enlaces β -(1,4) formando al disacárido celobiosa, y el número de azúcares en la cadena (grado de polimerización), varía en los diferentes materiales celulósicos (Lynd y col., 2002).

El anillo de piranosa está en conformación $4C_1$, es decir, que los grupos $-\text{CH}_2\text{OH}$ y $-\text{OH}$, así como los enlaces glucosídicos, están en posición ecuatorial con respecto al plano medio del anillo, y los átomos de hidrógeno en posición axial (Lehninger, 2005). Cuando la molécula de celulosa está completamente extendida y toma forma de cinta aplanada, con los grupos $-\text{OH}$ sobresaliendo lateralmente, se pueden formar puentes de hidrógeno inter e intramoleculares; disposición que la hace estable y le confiere sus propiedades como material estructural de la pared celular (Lynd et al., 2002).

Si los enlaces de hidrógeno son pocos la celulosa se considera amorfa, mientras que una disposición especial de estos enlaces genera diferentes formas cristalinas. Así, la celulosa puede presentarse en cuatro macroestructuras cristalinas denominadas celulosa I, II, III, y IV (Imai et al., 2003). La celulosa más ordenada y cristalina es menos soluble y menos degradable (Tomás-Pejó et al., 2008).

Hemicelulosas

La hemicelulosa es el segundo polímero más abundante (Figura 3). Son carbohidratos que forman una estructura polimérica compleja, ramificada que consiste en la unión de diferentes unidades de azúcares: pentosas, hexosas y ácidos de estos azúcares, por lo que está compuesta de diferentes heteropolímeros entre los que se pueden mencionar el xilano, galactomanano, glucuronoxilano, arabinoxilano, glucomanano y xilomanano (Isikgor y Becer, 2015). Su papel es suministrar la unión entre la lignina y la celulosa, pues forma una red

compleja que proporciona fuerza estructural y permite el entrecruzamiento de estos dos polímeros. En estado natural existe en forma predominantemente amorfa con un grado de polimerización que no excede de 200 unidades, lo que la hace más fácilmente hidrolizable.

Lignina

Es la tercera fracción mayoritaria de la biomasa lignocelulósica. Se trata de un polímero tridimensional amorfo formado por la polimerización deshidrogenativa de unidades de fenilpropano ligadas por diferentes tipos de enlaces que se alternan de manera desordenada (Figura 3). Los monómeros que forman la lignina son los denominados alcoholes cinamílicos, diferenciados entre sí por las diferentes sustituciones que presenta el anillo aromático. Proporciona rigidez a la pared celular y resistencia contra insectos y patógenos (Rubin, 2008; Isikgor y Becer, 2015).

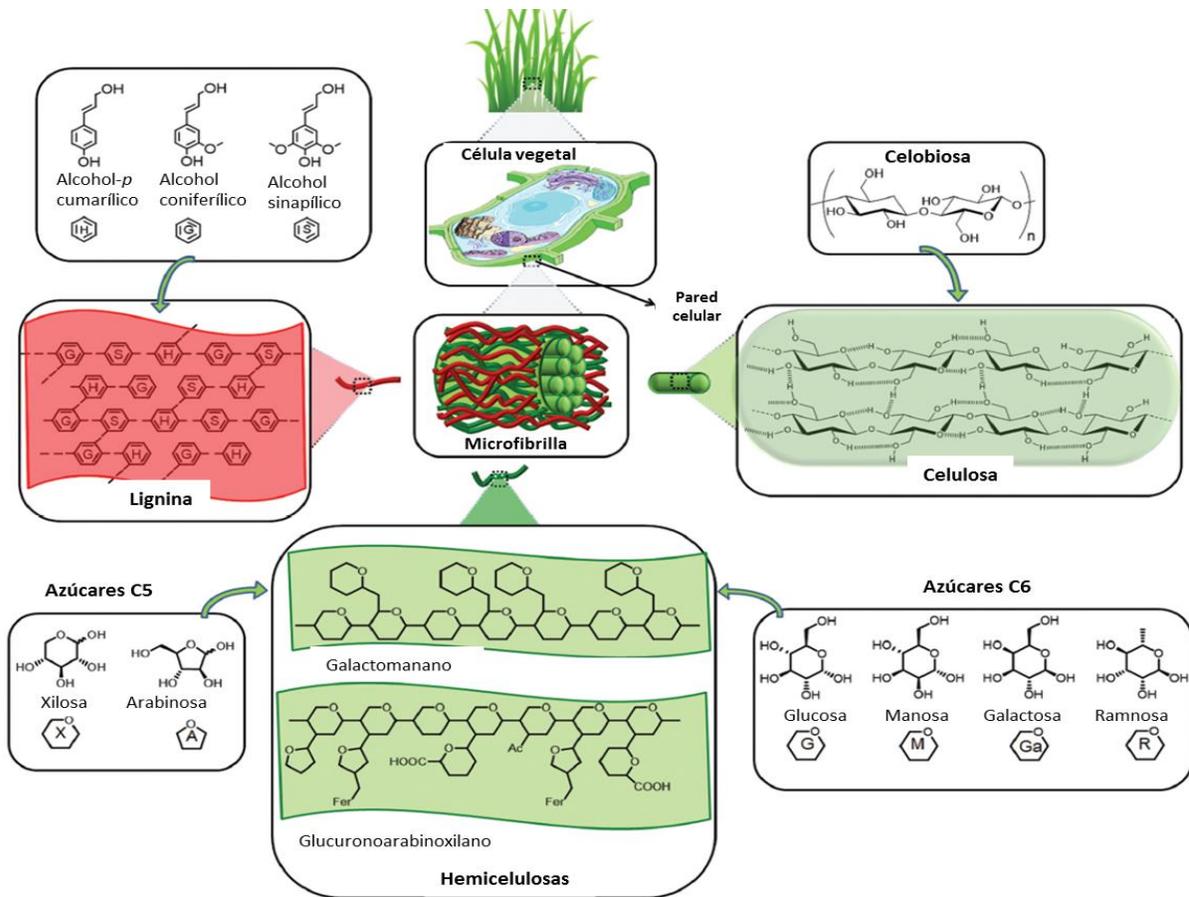


Figura 3. Componentes principales y estructura de la lignocelulosa. “Fer” representa esterificación con ácido ferúlico (Modificado de Isikgor y Becer, 2015).

La proporción de las tres unidades que forman la lignina y el tipo de enlace difiere según el tipo de planta, así como del grupo taxonómico, tejido o capa de la pared celular, estado de desarrollo y condiciones ambientales.

Otras sustancias

No forman parte de la estructura de la pared vegetal, y la mayoría son solubles en solventes neutros. Hay una gran variedad de compuestos orgánicos, grasas, ceras, alcaloides, proteínas, fenoles simples y complejos, azúcares simples, pectinas, mucílagos, gomas, resinas, terpenos, etc. Actúan como intermediarios metabólicos, reserva de energía o parte de los mecanismos de defensa contra los ataques microbianos. Contribuyen al color, olor y resistencia al marchitamiento.

La utilización de los azúcares contenidos en los polisacáridos constituyentes de las paredes vegetales se ve restringida pues la acción de las enzimas está limitada por el grado de ordenamiento cristalino del polímero y la severidad del tratamiento extractivo desde alguna biomasa en particular (Lynd y col. 2002).

5.3 Biomasa cítrica

Los residuos cítricos pueden ser una fuente de biomasa para la obtención de etanol. A modo de ejemplo, en el estado de Florida (EUA) el procesamiento de cítricos para la obtención de jugos genera, aproximadamente, 5 millones de toneladas de residuos sólidos por año (Wilkins et al., 2005). Este desecho está constituido principalmente por cáscaras, semillas y membranas del fruto. La biomasa obtenida es convertida en pulpa de cítricos para alimentación animal o utilizada como materia prima para la extracción de pectina, sin embargo un gran porcentaje de este residuo agroindustrial permanece sin aprovechar (Pourbrafani et al., 2010). Las investigaciones se han enfocado en la conversión de este desecho en azúcares fermentables empleando hidrólisis química o enzimática.

Wilkins y col. (2005) estudiaron como afectaba la temporada en la obtención de azúcares fermentables en las cáscaras de naranja. Concluyen que los azúcares que principalmente se

obtienen de los residuos de la naranja son: arabinosa, fructosa, galactosa, glucosa, rhamnosa, sacarosa y xilosa, aumentando en porcentaje con el paso de la temporada, es decir, al final de la temporada de la naranja se tiene la mayor cantidad de azúcares en el fruto. Con base en los porcentajes de azúcares presentes durante la temporada calcularon el rendimiento de azúcares fermentables obteniendo un 40.7 % para la cepa *S. cerevisiae* y para la *E. coli*, un 59.03 % de azúcares fermentables. Con estos porcentajes calcularon el etanol teórico obteniendo de 5.07 a 5.46 % y 6.43 a 6.76 % en peso, respectivamente.

En relación a este tema, Zhou y col. (2008) plantean otra vía para el aprovechamiento integral de las cáscaras de cítricos. Plantea un proceso utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, donde la hidrólisis y la fermentación es simultánea con agitación continua, a un pH de 4.2 - 4.8, dicho estudio se realizó en planta piloto. Se recuperaron subproductos como el D-limoneno y los residuos finales fueron utilizados como alimento para rumiantes. Como resultado obtienen de la cáscara de cítricos un 4 % de etanol (w/v) y afirman que esta nueva tecnología ofrece una alternativa para el aprovechamientos de las cáscaras del sector cítrica usando diversos microorganismos fermentadores.

5.4 Microorganismos celulolíticos.

Una gran variedad de organismos han evolucionado para tomar ventaja de esta fuente de nutrientes, incluyendo los organismos invariablemente presentes en ambientes ricos en biomasa. Los microorganismos degradadores de celulosa proceden de diversas fuentes, la gran mayoría de ellos han sido aislados del suelo, materia vegetal en descomposición, efluentes industriales, residuos municipales, estiércol y rumen (Ten et al., 2004).

Existe una diversidad de microorganismos degradadores, entre los que se incluyen bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos (ver Tabla 2) distribuidos en una gran variedad de hábitats y que producen un sistema complejo de enzimas que es denominado en forma general celulasas (Miyamoto, 1997; el Varma et al., 1994). Cuando están involucrados carbohidratos complejos, como es el caso de la biomasa vegetal, las hidrolasas extracelulares despolimerizan los sustratos potenciales para el crecimiento,

produciendo oligosacáridos y monosacáridos que pueden ser asimilados por el mismo microorganismo o por otro.

Tabla 2. Microorganismos celulolíticos

GRUPO		ESPECIES
Hongos aeróbicos		<i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Penicillium pinophilum</i> , <i>Sporotrichum pulverulentum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Talaromyces emersonii</i> y <i>Trichoderma koningii</i> .
Hongos termófilos	aeróbicos	<i>Sporotrichum thermophile</i> , <i>Thermoascus aurantiacus</i> y <i>Humicola insolens</i> .
Hongos mesofílicos	anaeróbicos	<i>Neocallimastix frontalis</i> , <i>Piromonas communis</i> , <i>Sphaeromonas communis</i>
Bacterias mesofílicas y termófilas	aeróbicas	<i>Cellulomonas sp.</i> , <i>Cellvibrio sp.</i> , <i>Microbispora bispora</i> y <i>Thermomonospora sp.</i>
Bacterias mesofílicas y termófilas	anaeróbicas	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> , <i>Bacteroides succinogenes</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens</i> y <i>Clostridium thermocellum</i> .

Fuente: Lynd et al., 2002

La importancia de encontrar nuevas especies de microorganismos celulolíticos altamente productores reside en el hecho de que aunque se han aislado una gran variedad de bacterias y hongos capaces de utilizar la celulosa, no todos pueden producir altos niveles de enzimas extracelulares que permitan degradar "in vitro" la celulosa insoluble. Al respecto se tienen dos opciones: 1) Búsqueda de nuevos productores activos en condiciones naturales, 2) Obtención de nuevas cepas, por medio de la selección de los cultivos ya conocidos, luego de mejorar su producción de celulasas por optimización de las condiciones de cultivo o el mejoramiento genético.

La diversidad de microorganismos del rumen es importante porque la presencia de especies distintas aporta un conjunto mayor de genes y complemento de enzimas, así como reacciones bioquímicas precisas para una conversión máxima de productos alimenticios en células microbianas y productos de fermentación. Las bacterias ruminales pueden hidrolizar la celulosa y metabolizar los azúcares solubles producidos. Las especies de bacterias más

importantes que degradan la celulosa son: *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Bacteroides succinogenes* y *Butyrivibrio fibrisolvens*. Las principales bacterias hemicelulolíticas en el rumen son: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteroides ruminicola* y *Ruminococcus* spp. Mientras que las principales degradadoras de la pectina son *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteroides ruminicola* y *Lachnospira multiparus*. Otras bacterias pectinolíticas incluyen *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Treponema* spp. y *Streptococcus bovis* (Kamra, 2005).

En el rumen los microorganismos con mayor actividad hidrolítica son las bacterias, estas pueden degradar tanto celulosa, hemicelulosa o pectina (Tabla 3).

Tabla 3. Utilización de carbohidratos por bacterias ruminales celulólicas y no celulólicas

Especie bacteriana	Polisacáridos	Mono y disacáridos
Celulólicas:		
<i>Fifrobacter succinogenes</i>	Celulosa, ciclodextrinas	G, C
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Celulosa, xilano, pectina	C
Celulólicas secundarias:		
<i>Butyrivibro fibrisolvens</i>	Celulosa, xilano, dextrina, pectina	G, Ga, Mn, F, M, X, L, C
<i>Clostridium logisporrum</i>	Celulosa	G, Ga, F, C, M, L, S
<i>Clostridium loheadii</i>	Celulosa dextrina	G, M, S

No celulolítica:

<i>Prevotella ruminicola</i>	Pectina, almidón, dextrina	G, Ga, F, L, C, X, A, R, M
<i>Selenomonas ruminantium</i>	Almidón, dextrina, ciclodextrina	G, Ga, F, X, A, C M, L
<i>Streptococcus bovis</i>	Almidón, ciclodextrina	G, Ga, F, Mn, C, M, L, S
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	Dextrina, pectina	G, Ga, Mn, X, M, A, F, S

Abreviaturas: A: arabinosa, C: celobiosa, F: fructosa, G: glucose, Ga: galactosa, L: Lactosa, M: maltose, Mn: manosa, R: Ramnosa, S: sacarosa y X: xilosa.

5.5 Microorganismos fermentadores

Levadura es un nombre genérico que agrupa a una variedad de especies tanto patógenas para plantas y animales, como especies no solamente inocuas sino de gran utilidad. De hecho, las levaduras constituyen el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad. Algunas especies de levaduras del género *Saccharomyces* son capaces de llevar a cabo el proceso de fermentación, propiedad que se ha explotado desde hace muchos años en la producción de pan y de bebidas alcohólicas (González y Valenzuela, 2009).

Las levaduras son los microorganismos más utilizados para la producción de etanol por la vía fermentativa, debido a su alta productividad en la conversión de azúcares a bioetanol y a que se separan mejor después de la fermentación. Entre las especies más utilizadas están: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. ellipsoideus*, *S. anamensis*, *Candida seudotropicalis*, *S. carlsbergensis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida bytyrii*, *Pichia stipatis*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Pichia membranaefaciens*.

Diferentes investigadores han realizado evaluaciones de cepas de levadura productoras de alcohol atendiendo a varios aspectos tales como:

- tolerancia al etanol,
- tolerancia a las altas temperaturas
- tolerancia a altas concentraciones de azúcar,
- rendimiento alcohólico,
- eficiencia en la fermentación y productividad

5.6 Cultivos mixtos

El sinergismo o antagonismo entre los diferentes grupos de microorganismos o incluso entre los diferentes géneros de un mismo grupo, es muy diverso y complicado, por ejemplo, en el rumen el resultado neto de estas interacciones es la de bioconversión de alimento en tal forma que pueda utilizarse por el animal como fuente de energía a través de los ácidos grasos volátiles (Kamra, 2005). Otros estudios del sinergismo entre levaduras y bacterias están enfocados a la inoculación concurrente de vinos de uva con una levadura de vino y una bacteria ácido láctica (BAL) a fin de inducir la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica simultáneas. En este sentido, Nehme et al. (2010) consideran que la estrategia de co-cultivo fue efectiva para la fermentación maloláctica por *Saccharomyces cerevisiae* y *Oenococcus oeni*, comparada con la fermentación tradicional que se realiza por cultivo secuencial (la fermentación maloláctica inicia cuando ya se ha realizado la fermentación alcohólica).

En términos ambientales, la sobrevivencia microbiana puede basarse en la capacidad de utilizar una gran diversidad de carbohidratos disponibles como fuente de carbono y energía (VanFossen et al., 2009). Así, la celulosa, con un estimado de velocidad de síntesis de 4×10^7 - 4×10^{10} ton/año (Singh y Hayashi, 1995), constituye una abundante fuente de carbono que es usada como tal por muchos microorganismos, así los microorganismos celulolíticos (que degradan celulosa) desempeñan un papel importante en la biosfera reciclando este polímero. En general, las levaduras muestran un perfil de aprovechamiento de fuentes de carbono más

amplio que otros microorganismos, proporcionándoles mayor versatilidad y ventaja competitiva sobre otros organismos.

Para una degradación eficiente de la celulosa, hemicelulosa y pectina, todos ellos polímeros constituyentes de la biomasa vegetal, se necesitan diferentes actividades enzimáticas, incluyendo aquellas que rompan los enlaces glucosídicos y eliminen los grupos sustituyentes, además de la coutilización de las hexosas y pentosas liberadas (Han y col. 2004). No siempre se presentan estas actividades de forma natural en un solo microorganismo, por lo que se ha recurrido tanto a la ingeniería genética, como a los cultivos mixtos, en donde crezcan simultáneamente dos o más cepas, de tal forma que sus efectos sinérgicos se vean reflejados en una mejor perspectiva de degradación de sustratos con mezclas complejas de carbohidratos. Los microorganismos que tienen un amplio rango de sustratos para su crecimiento son interesantes debido a que un metabolismo rápido y eficiente de los azúcares que incluya tanto las fracciones de celulosa como de hemicelulosa es crítico para una conversión eficiente de la biomasa lignocelulósica para la obtención de biocombustibles.

La caracterización de los microorganismos hidrolíticos y de los fermentadores tanto de pentosas como de hexosas, permitirá contribuir al conocimiento de organismos de rápido crecimiento, que tengan una mayor resistencia y que logren asimilar múltiples carbohidratos. En este sentido, es interesante considerar la fuente de carbono y energía que será utilizada por los microorganismos específicos como inicios de la caracterización de su maquinaria enzimática, lo cual permita incrementar el conocimiento sobre su fisiología y su posible aplicación biotecnológica.

La biodegradación de la biomasa celulósica y su conversión a productos de valor agregado, mediante el uso de co-cultivos microbianos o de comunidades complejas se ha propuesto como un método eficiente para su aplicación biotecnológica (Wongwilaiwalin et al., 2010), tal es el caso del co-cultivo de clostridios celulolíticos con microorganismos fermentadores para la producción de etanol a partir de sustratos lignocelulósicos (Demain et al., 2005). Lo anterior ha llevado al desarrollo del concepto de conversión microbiana directa (CMD), en donde se busca emplear las habilidades hidrolíticas y fermentadoras de los distintos microorganismos involucrados en el proceso, ya que con esto se evita el empleo de

pre-tratamientos agresivos para romper las estructuras poliméricas de las plantas que pueden generar compuestos inhibidores para las células y se tienen mayores oportunidades de utilización de las pentosas y hexosas que constituyen la biomasa vegetal.

6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El presente trabajo se desarrolló en cuatro etapas, las cuales se presentan en el siguiente diagrama experimental (Figura 4). La experimentación fue realizada en las instalaciones de la Unidad Sureste del CIATEJ como parte del proyecto de investigación “Aprovechamiento integral de los subproductos de la industria citrícola del Estado de Yucatán para la obtención de metabolitos de alto valor agregado” con clave YUC-2011-C09-0169165, apoyado con recursos del Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACYT-Gobierno Del Estado de Yucatán.

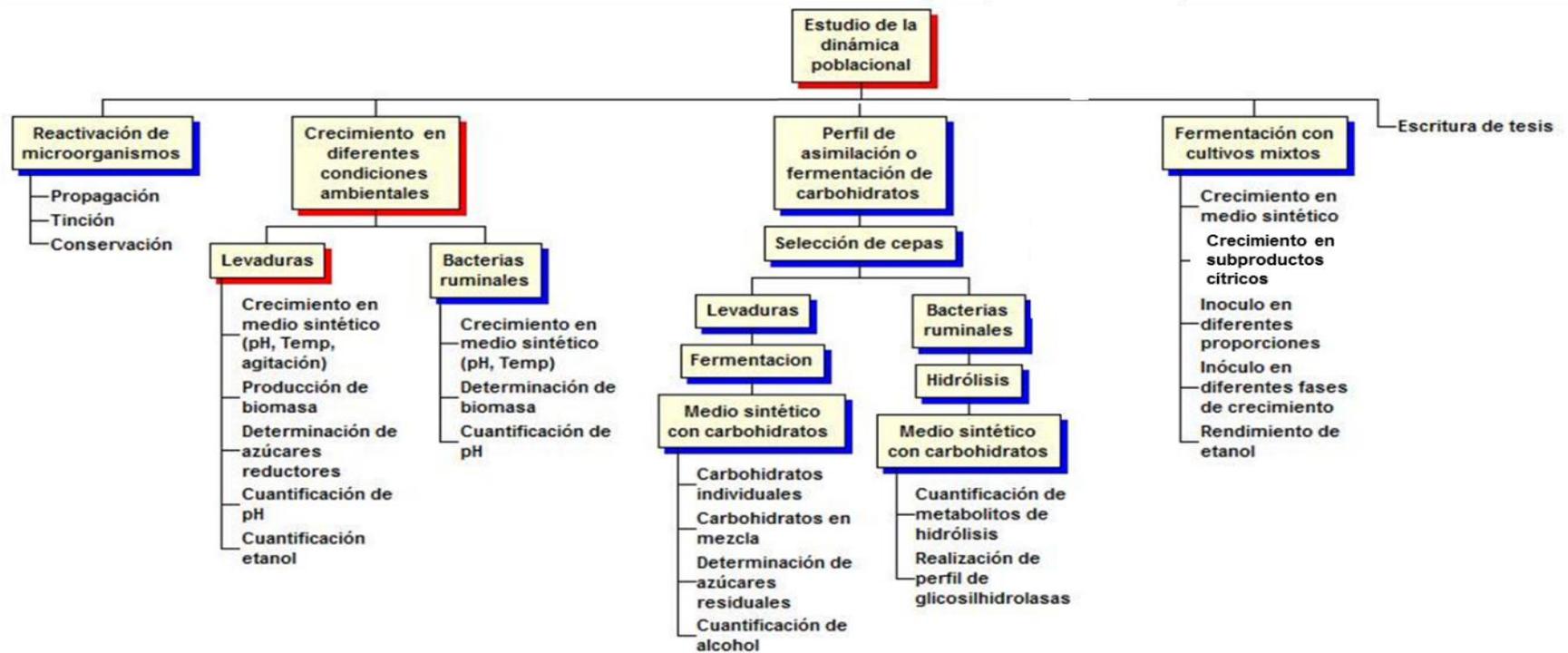


Figura 4. Estrategia experimental

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Microorganismos

7.1.1 Levaduras

Se utilizaron seis levaduras aisladas de diferentes orígenes, todas ellas pertenecientes a la colección de la Unidad Sureste del CIATEJ, las claves asignadas así como el origen se presentan a continuación (Tabla 4).

Tabla 4. Levaduras silvestres a caracterizar y origen de aislamiento.

Clave	Origen de aislamiento
HY1	Bagazo de henequén en descomposición, Estado de Yucatán
L4B	Tequilera, del Estado de Jalisco, México
N-1	Jugo de naranja dulce en descomposición, Estado de Yucatán
MG	Tequilera del Estado de Jalisco, México
API-1	Residuos cítricos en descomposición, Estado de Yucatán
API-2	Residuos cítricos en descomposición, Estado de Yucatán

7.1.2 Bacterias ruminales

Se utilizaron cuatro bacterias aisladas de líquido ruminal de bovino fistulado de raza cebuína (*Bos indicus*) del Estado de Yucatán, todas ellas pertenecientes a la colección de la Unidad Sureste del CIATEJ, las claves asignadas arbitrariamente fueron Xer-15, Xer 18, Xer, 19 y Xer-28.

7.1.3 Morfología macro y microscópica

Se realizó una siembra en estría en agar YPG y se incubó 24 horas a temperatura ambiente. Las colonias se observaron con un estereoscopio, utilizando un aumento de 8X. Para la observación microscópica se efectuó tinción de Gram a frotis fijados con calor, una vez teñidas las preparaciones se observaron con el microscopio óptico, empleando aceite de inmersión y el objetivo de 100 X.

7.1.4 Identificación microbiana

El ADN de las levaduras fue aislado a partir de un cultivo de 24 h, siguiendo el protocolo Gentra Puregene Handbook (Qiagen). La amplificación de la región del ITS se realizó, utilizando los primers ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) que incluye la región 5.8 ARNr (White et al, 1990). Los amplificados fueron visualizados en geles de electroforesis de agarosa 1% y teñidos con bromuro de etidio. Las bandas fueron purificadas y lavadas con etanol al 75%, antes de resuspender en agua estéril bidestilada. Los fragmentos amplificados fueron enviados para su secuenciación a la compañía Macrogen con el objetivo de obtener la secuencia forward y reverse. De cada cepa se obtuvo por lo menos cuatro secuencias que fueron analizadas y alineadas entre sí, para probar la repetitividad y dar confiabilidad a la secuenciación. La secuencia consenso fue comparada con las reportadas en la base de datos del NCBI, donde se determinó el relativo cercano reportado.

Las cepas de bacterias fueron identificadas con la amplificación de gen de ARNr 16S, usando los primers universales fD1 y rD1 (Weisburg, et al. 1991). Las secuencias fueron comparadas en la base de datos de NCBI, alineadas y se generaron las distancias para la obtención de un cladograma para determinar la relación entre los microorganismos identificados.

7.1.5 Medios de cultivo

a. Determinación de los parámetros de crecimiento de las levaduras silvestres: Se utilizó el caldo Yeast Peptone Glucose (YPG), el cual está constituido por glucosa (20 g/L), extracto de levadura (10 g/L) y peptona de caseína (20 g/L).

b. Determinación de los parámetros de crecimiento de las bacterias ruminales: Se utilizó el caldo celobiosa, el cual está constituido por celobiosa (1 g/L), extracto de levadura (1 g/L), peptona de caseína (5 g/L), NaHCO₃ (5 g/L) y solución mineral I y II (150 ml/L c/u). Las soluciones minerales estuvieron conformadas de las siguientes sales: Solución mineral I = K₂HPO₄ 0.6%; Solución mineral II = NaCl; 1.2 %, (NH₄)₂SO₄, 1.2 %; KH₂PO₄, 0.6 %; CaCl₂, 0.12 %; MgSO₄ 7H₂O, 0.25 %

c. *Determinación de la producción de alcohol por las levaduras silvestres en diferentes fuentes de carbono:* El medio empleado fue Yeast Nitrogen Base (YNB), considerando en su elaboración las siguientes sales (para un litro): sulfato de amonio (5 g), fosfato de potasio dibásico (1 g), sulfato de magnesio heptahidratado (0.5 g), cloruro de sodio (0.1 g), cloruro de calcio (0.1 g), inositol (2 mg), yoduro de potasio (1 mg), ácido bórico (0.5 mg), sulfato de zinc (0.4 mg), sulfato de manganeso (0.4 mg), cloruro férrico (0.2 mg), molibdato de sodio (0.2 mg) y sulfato cúprico (0.04 mg), al cual se le agregaron glucosa, fructosa, galactosa, xilosa o sacarosa (de manera individual).

d. *Caracterización de la producción de glicosilhidrolasas en diferentes fuentes de carbono:* consistió en una mezcla de solución mineral I (0.3 g K_2HPO_4 en 100 ml de agua destilada) y solución mineral II (0.6 g NaCl, 0.3 g $(NH_4)_2SO_4$, 0.3 g KH_2PO_4 , 0.03 g $CaCl_2$, 0.03 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ en 100 ml de agua destilada), empleándose 150 ml de cada una y completando el volumen a un litro con agua destilada. Ésta solución fue adicionada con 5.0 g/L del polisacárido y el pH del medio fue ajustado a los requerimientos de cada bacteria.

7.2 Evaluación de la respuesta del crecimiento de levaduras bajo diferentes condiciones medioambientales

7.2.1 Pre-inóculo

El pre- inóculo de las levaduras (500 μ l de glicerol) fue cultivado en 125 ml de caldo YPG y crecido 24 h a $30 \pm 2^\circ C$ y 250 r.p.m. Se ajustó la población para iniciar las fermentaciones con 20×10^6 cel/ml en matraces Erlenmeyer de 500 ml con 200 ml de medio YPG.

7.2.2 Factores evaluados

Como parte de la caracterización fisiológica de las levaduras silvestres se planteó un diseño factorial 2^3 , se realizaron dos réplicas del diseño y los ensayos se hicieron en orden aleatorio. Los factores evaluados fueron la temperatura (30 y 40 $^\circ C$), el pH de crecimiento (4.5 y 5.5) y la velocidad de agitación (0 y 250 rpm). A continuación (Tabla 5) se presenta el diseño factorial utilizado y el esquema realizado se ilustra en la Figura 5.

Tabla 5. Diseño experimental 2³ de la caracterización fisiológica de las levaduras silvestres.

NÚMERO DE CORRIDA	FACTORES CODIFICADOS			FACTORES SIN CODIFICAR		
	A	B	C	TEMPERATURA (°C)	pH	AGITACIÓN (rpm)
1	-	-	-	30	4.5	0
2	+	-	-	40	4.5	0
3	-	+	-	30	5.5	0
4	+	+	-	40	5.5	0
5	-	-	+	30	4.5	250
6	+	-	+	40	4.5	250
7	-	+	+	30	5.5	250
8	+	+	+	40	5.5	250

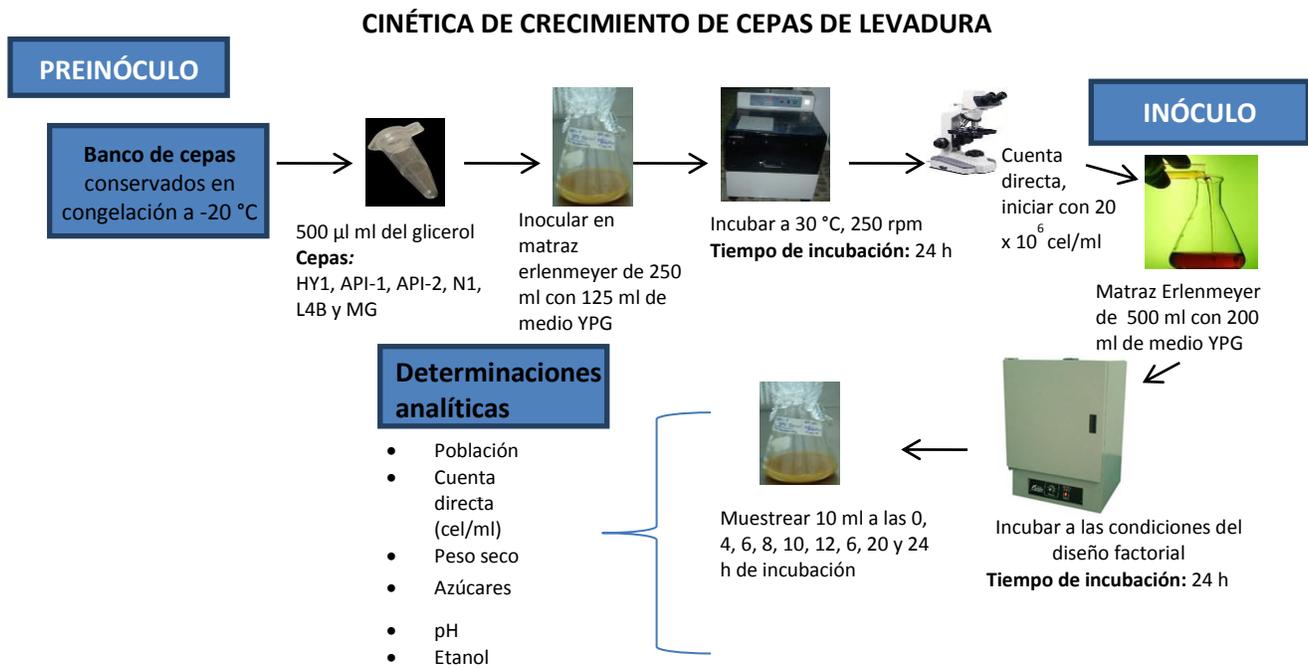


Figura 5. Esquema de propagación y cinética de crecimiento en medio YPG.

7.3 Determinación de las condiciones medioambientales para el crecimiento de bacterias ruminales en medio de cultivo sintético

7.3.1 Pre-inóculo

El pre- inóculo de las bacterias ruminales (500 µl de glicerol) fue cultivado en 125 ml de caldo celobiosa y crecido 24 h a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ y 100 r.p.m. Se ajustó la población para iniciar las fermentaciones con 20×10^6 cel/ml en matraces Erlenmeyer de 500 ml con 200 ml de medio celobiosa fresco.

7.3.2 Factores evaluados

Como parte de la caracterización fisiológica de las bacterias ruminales se planteó un diseño factorial 2 x 3, se realizaron dos réplicas del diseño y los ensayos se hicieron en orden aleatorio. Los factores evaluados fueron la temperatura (35 y 40 °C) y el pH de crecimiento (5.0, 6.0 y 7.0), manteniendo fija la velocidad de agitación (100 rpm). En la tabla 6 se presenta el diseño factorial utilizado.

Tabla 6. Diseño experimental empleado en la caracterización de bacterias ruminales.

NÚMERO DE TRATAMIENTO	FACTORES CODIFICADOS		FACTORES SIN CODIFICAR	
	A	B	TEMPERATURA (°C)	pH
1	-	-	35	5.0
2	-	0	35	6.0
3	-	+	35	7.0
4	+	-	40	5.0
5	+	0	40	6.0
6	+	+	40	7.0

En la Figura 6 se presentan el diagrama de las actividades realizadas para el establecimiento de las condiciones adecuadas para el crecimiento de bacterias ruminales.

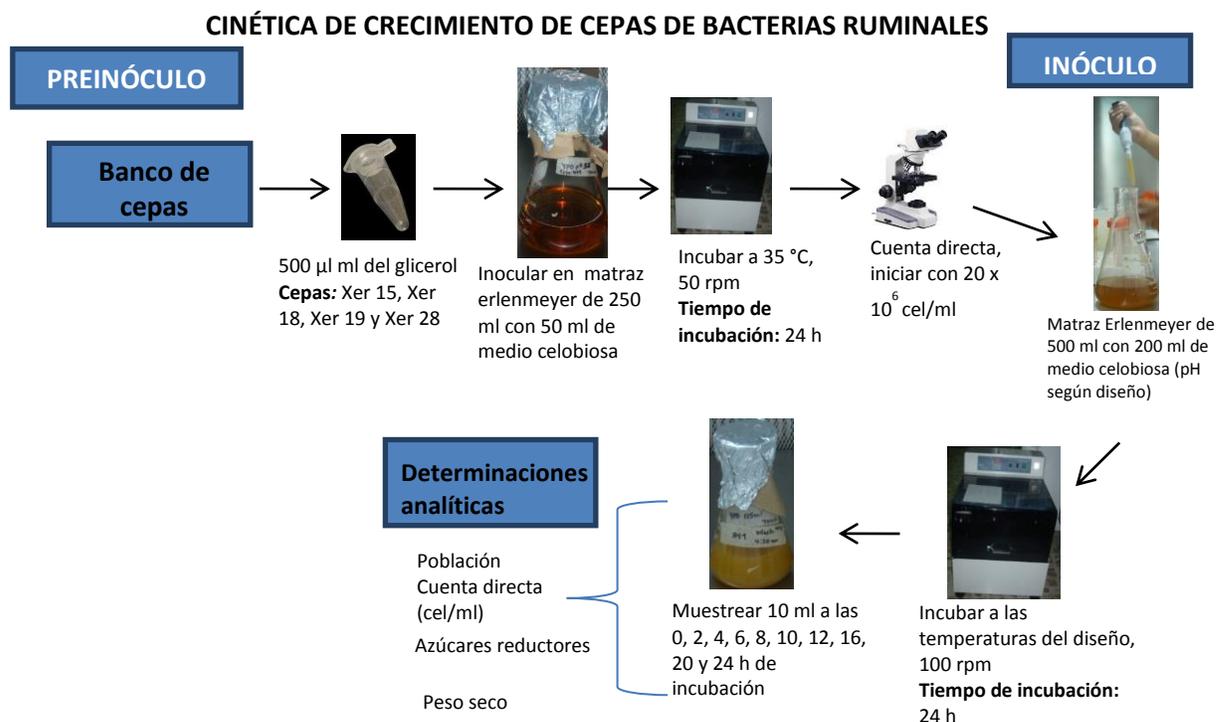


Figura 6. Esquema de propagación y cinética de crecimiento de bacterias ruminales en medio celobiosa.

7.4 Perfil de asimilación y fermentación de azúcares por las levaduras silvestres en medio sintético

7.4.1 Perfil preliminar de asimilación

Se analizó la asimilación de 9 fuentes de carbono, entre las que se incluyen, mono- y di- sacáridos. Los carbohidratos empleados se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Carbohidratos utilizados para establecer el perfil preliminar de asimilación de las levaduras silvestres.

Monosacárido (Hexosa)		Monosacárido (Pentosa)	Disacárido
Glucosa	Fructosa	Xilosa	Sacarosa
Manosa	Galactosa	Arabinosa	Celobiosa
Rhamnosa			

Se preparó una solución de cada carbohidrato, agregando 0.5 g del azúcar en 100 ml de agua destilada, se mezcló y se esterilizó por filtración. En condiciones asepticas se

transfirieron 0.5 ml de la solución concentrada (10x) del medio YNB a 4.5 ml de la solución filtrada de carbohidrato. Las condiciones de cultivo fueron las establecidas con anterioridad para cada cepa (ver punto 7.2)

7.4.2 Fermentación de diferentes fuentes de carbono

Con la finalidad de seleccionar las levaduras que se utilizarán en los cultivos mixtos para la obtención de etanol, se realizaron cinéticas de crecimiento y producción de alcohol en los monosacáridos glucosa, fructosa, galactosa y xilosa, y en el disacárido sacarosa, utilizando las condiciones de cultivo previamente establecidas. Estas fermentaciones se realizaron utilizando medio YNB adicionado de manera individual con los diferentes carbohidratos como única fuente de carbono. Los dos factores que se consideraron fueron la cepa y la fuente de carbono evaluada.

7.5 Caracterización de la producción de enzimas celulolíticas de las bacterias ruminales

7.5.1 Fuente de carbono

Para establecer el perfil preliminar se analizó la asimilación en medio sólido de 9 fuentes de carbono, entre las que se incluyen: pectina cítrica, almidón, xilano de haya, xilano de abedul, celulosa (polvo), carboximetilcelulosa, celobiosa, harina integral de limón persa y harina integral de limón italiano (ambas sin extracción de polifenoles y pectina). Para la evaluación de la producción de enzimas en medio líquido se seleccionaron 7 de estas fuentes de carbono.

7.5.2 Determinación preliminar de actividades hidrolíticas

Las cepas crecidas durante 48 h en medio celobiosa fueron centrifugadas a 6000 rpm, 15 min, 4°C. El paquete celular se lavó con solución salina (0.9%) estéril y se resuspendió. Se perforaron pocillos sobre la superficie del agar adicionado con las distintas fuentes de carbono y a cada uno se inocularon 30 µl del sobrenadante o de la suspensión celular. Como control negativo se empleó agua destilada estéril y como control positivo se utilizó una enzima

comercial (Viscozyme L, Sigma), que es un complejo multienzimático de *Aspergillus* sp. con actividades arabinasa, celulasa, β -glucanasa, hemicelulasa y xilanasas.

Las muestras se dejaron incubar durante 72 h, al término del período de incubación, los halos de hidrólisis fueron revelados con rojo congo al 1% durante 15 min y posterior lavado con una solución de cloruro de sodio 0.1 M. Este colorante se empleó para celulosa y xilano. Para el sustrato pectina se utilizó azul de bromotimol al 0.1% y yodo-lugol para el almidón.

7.5.3. Caracterización de la producción de enzimas celulolíticas en diferentes fuentes de carbono

Las cepas de bacterias se dejaron en crecimiento en medio celobiosa durante 16h a 40°C y al cabo de este tiempo se centrifugó el medio de cultivo a 6000 rpm, 4°C durante 15 minutos. Las células se lavaron 2 veces con solución salina fisiológica estéril para eliminar los restos de medio de cultivo y se inocularon en medio mineral adicionado con distintas fuentes de carbono, iniciando con una población de 20 millones de células (Figura 7). La fermentación se realizó durante 10 días, efectuando muestreos periódicos.

Como parte de la caracterización de las bacterias ruminales se planteó un diseño factorial 4 x7, siendo los factores evaluados la cepa (Xer-15, Xer18, Xer-19 y Xer 28) y la fuente de carbono (xilano, celulosa, pectina, carboximetil celulosa, celobiosa, harina integral de limón persa y de limón italiano).

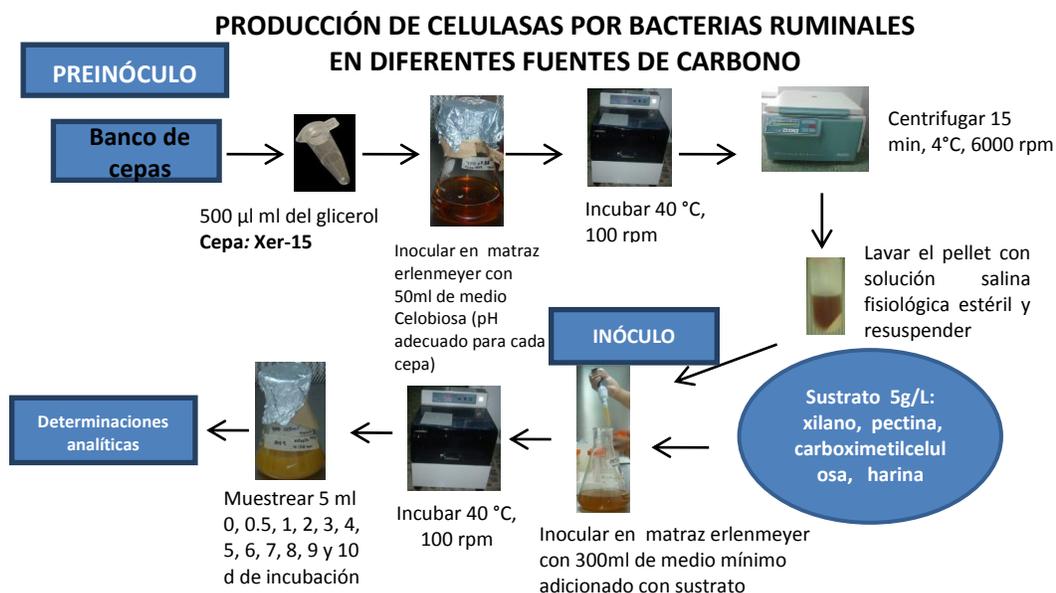


Figura 7. Producción celulasas por bacterias ruminales.

7.5.4. Determinación de actividad CMCasas, pectinasas, xilanasas

Para determinar las actividades de celulasa, pectinasa y xilanasas se colocaron 50 µl de solución de sustrato en tubos Eppendorf de 1.5 ml, los sustratos consisten en soluciones al 1% de carboximetilcelulosa, pectina cítrica y xilano de abedul, respectivamente, preparadas en buffer de fosfato de potasio 50 mM (pH 7.0). Se adicionaron 50 µl del preparado enzimático a evaluar diluido convenientemente. Se dejaron reaccionar durante 24 horas en un baño a temperatura controlada a 50°C y 500 rpm. Al término de la reacción se agregaron 100 µl de reactivo DNS, se agitó y se colocó en un baño María por 5 min (95-100°C). Se dejó enfriar en un baño de hielo y se agregaron 300 µl de agua destilada, se mezcló y finalmente se depositaron 200 µL de la mezcla final en una microplaca y se leyó la absorbancia a 540 nm.

Para cada muestra se realizó un blanco enzimático, para lo cual se incubó el sustrato sin adición de enzima, se le agregó el DNS y finalmente la enzima diluida.

7.5.5. Determinación de actividad β -piranosidasa

Como sustratos se utilizaron p-nitrofenil- β -d-glucopiranosido (Sigma N-7006) y p-nitrofenil- β -d-xilopiranosido (Sigma N-2132), de manera independiente, a una concentración de 10 mM en DMSO. Se realizó una mezcla de un volumen del sustrato con 18 volúmenes de buffer fosfatos 50 mM (pH 7.0) con 0.5% de triton X100. Se tomaron 10 μ l de la solución enzimática, se colocaron en una placa de micropozos y se agregaron 190 μ l de la emulsión, y se monitoreó el incremento en la absorbancia a 410 nm a 30°C, cada 25 seg comparando contra un blanco sin enzima. Los datos se colectaron durante 20 min.

7.5.6. Determinación de actividad proteasa

El sustrato a utilizar en esta determinación fue una solución de caseína al 0.65% en buffer de fosfato de potasio dibásico 50 mM (pH 7.0). La hidrólisis enzimática de las muestras se realizó preparando las diluciones de la enzima proteasa en buffer de fosfato (pH 7.0) inmediatamente antes del ensayo. En tubos Eppendorf de 1.5 mL se colocaron 500 μ L de la solución de caseína y se adicionaron 100 μ L de la enzima proteasa diluida convenientemente. Incubar a 30°C durante un tiempo determinado (e.g. 60 min) a 350 rpm. Al término de la incubación se agregó inmediatamente 500 μ L de ácido tricloroacético (TCA), se mezcló e incubó a 50°C por 15 minutos. Se centrifugó 5 minutos a 13,000 rpm.

El desarrollo del color se realizó transfiriendo 200 μ l del sobrenadante de las muestras problemas a un tubo de 1.5 ml nuevo. Se adicionaron 500 μ l de la solución de carbonato de Sodio 500 mM (Na_2CO_3) y 100 μ l de la solución de Folin-Ciocalteau. Se agitó y se incubó a 50°C por 15 min, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 13000 rpm por 5 min. Se transfirieron 200 μ l de la solución del sobrenadante a una microplaca de pozos y se leyó la absorbancia a 690 nm Se construyó una curva de calibración utilizando L-tirosina en concentraciones de 0 a 0.066 μ moles.

Para cada muestra problema fue necesario preparar un blanco enzimático, el cual fue el sustrato incubado el mismo tiempo sin la enzima, se le agregó la solución de TCA y posteriormente la enzima diluida (con el mismo factor de dilución que en el ensayo

7.6.2 Fermentación en hidrolizado enzimático de HLP

El hidrolizado de limón se obtuvo mediante un proceso de sacarificación enzimática, empleado la enzima comercial celluclast 1.5, la cual fue adicionada en un reactor de 3 L ajustando la cantidad para obtener una actividad enzimática equivalente a 10 UPF. El reactor se llenó a la mitad del volumen con HLP en buffer citrato (pH 4.8; relación 1:20) y se adicionó con la enzima. La hidrólisis se realizó durante 2 días a 46-50°C y 250 rpm.

Para la preparación del inóculo se utilizaron células de la levadura HY1 conservadas en congelación con glicerol, estas fueron descongeladas, agitadas y vertidas en matraces erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de medio YPD, para posteriormente ser incubados a 40°C por un tiempo de 48 horas, se realizó el conteo celular y se centrifugó el medio para obtener un paquete celular con el cual se inoculó el reactor para ajustar la población a 20×10^6 células/ml en un volumen total de 2 L.

7.7 Métodos analíticos

7.7.1 Determinación de la población celular

Se realizó por el método de cuenta directa al microscopio, con el objetivo 40X. Para calcular el número de células se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células (cel/ml)} = \frac{\text{No.células contadas}}{\text{No.cuadros contados}} (D)(F) \quad (1)$$

Donde: D: Dilución efectuada para el conteo; F: Factor de la cámara (bacterias: 6.25×10^5

Levaduras: 0.25×10^6)

7.7.2 Determinación de peso seco de la biomasa

La biomasa se determinó por gravimetría. Las muestras tomadas durante la cinética se centrifugaron a 5,300 rpm durante 15 min a 4°C. El pellet lavado (2 veces) se secó en estufa a 60°C hasta obtener un peso constante.

7.7.3 Determinación de azúcares reductores directos liberados

Se efectuó de acuerdo a la técnica de Miller (1959), la cual emplea ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS). La curva de calibración se realizó con glucosa (o celobiosa) como estándar, en concentraciones de 0.1 a 1 g/L

7.7.4 Determinación de azúcares por HPLC

Se efectuó utilizando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Thermo Scientific Finnigan Surveyor. El sistema consistió en una bomba Surveyor LC Plus, automuestreador Surveyor Plus y detector de IR Surveyor Plus. La separación se llevó a cabo utilizando una columna Phenomenex Rezex RPM-Monosaccharide PB⁺2 (8%) de 300 x 7.8 mm. La temperatura de la columna se mantuvo a 85°C, con un flujo de 0.5 ml/min empleando como fase móvil agua destilada. La temperatura del detector fue de 42°C. Las muestras fueron previamente filtradas utilizando acrodiscos de PTFE Millex Millipore de 25 mm de diámetro y 0.45 µm de poro.

7.7.5 Determinación contenido de etanol

Las muestras libres de células (5 ml) fueron diluidas con agua destilada y destiladas en un microdestilador de vidrio. Para la determinación de etanol se emplearon muestras destiladas y la reacción se realizó con solución de dicromato de potasio acidificado durante 10 min y lectura espectrofotométrica a 585 nm. Para la curva de calibración se utilizó etanol grado reactivo como estándar, en concentraciones de 2 a 16 g/L (Bohringer y Jacob, 1964).

7.7.6 Cuantificación del contenido de proteína en sobrenadantes bacterianos

Se cuantificó el contenido de proteína con el método Bradford en los sobrenadantes de la cepa Xer-15 crecida en los distintos sustratos. Se obtuvo la curva de calibración empleando albúmina sérica bovina como estándar, la ecuación de la recta fue $X = (Y - 0.4537) / 1.4789$ y es aplicable en un rango de absorbancias de 0.463 a 1.4.

7.8 Cálculo de parámetros cinéticos de crecimiento y producción

7.8.1 Determinación Velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{max} h^{-1}$).

Para calcular la velocidad de crecimiento (o tasa de crecimiento), se considera el incremento en el número de células (dx) en un intervalo de tiempo (dt). En este caso, la ecuación que describe la cinética es la siguiente: $dx/dt = \mu x$

Resolviendo la ecuación anterior por el método de separación de variables, e integrando, se obtiene:

$$\frac{1}{x} dx = \mu dt \qquad \int \frac{1}{x} dx = \int \mu dt$$

Como la velocidad de crecimiento μ permanece constante a lo largo de la fase exponencial, entonces $\int \frac{1}{x} dx = \mu \int dt$, la cual da lugar a $\int_{x_0}^{x_f} \frac{1}{x} dx = \mu t$, finalmente se integra y se obtiene $\ln x = \mu t$ (evaluada de la biomasa final a la biomasa inicial), despejando μ :

$$\mu = \frac{\ln x_f - \ln x_0}{t}$$

La μ_{max} se calculó introduciendo la fórmula en una hoja de base de datos Excel (Office 2013), donde se graficó μ vs. tiempo, en donde el valor más alto correspondió a la velocidad máxima de crecimiento.

7.8.2 Determinación tiempo de duplicación (TD, h).

El tiempo de duplicación de las células se calculó con la siguiente fórmula:

$$Td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

7.8.3 *Productividad total.*

$$\text{Productividad total} = \frac{Pf}{t}$$

Donde: Pf= cantidad de etanol producida (g/L) al tiempo final de la fermentación.

t = tiempo total de la fermentación (en horas)

7.8.4 *Productividad máxima.*

$$\text{Productividad máxima} = \frac{P_{max}}{t}$$

Donde: P_{max}= máxima cantidad de etanol producida (g/L)

t = tiempo en que se obtuvo la máxima producción de etanol (en horas)

7.8.5 *Velocidad de producción.*

La ecuación que describe la cinética es la siguiente: $\frac{dP}{dt} = rP$

7.8.6 *Velocidad de consumo de sustrato.*

La ecuación que describe la cinética es la siguiente: $\frac{dS}{dt} = rS$

7.6.4 *Análisis estadísticos*

Los datos obtenidos de los parámetros cinéticos de crecimiento y producción se analizaron utilizando el programa computacional Statgraphics Centurion XV para Windows (StatPoint, Inc.), mediante análisis de varianza multifactorial.

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO I

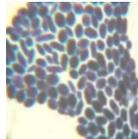
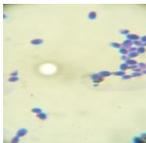
Identificación de los microorganismos

En este capítulo se presenta la caracterización morfológica y la identificación microbiana de las cepas de levadura, aisladas de residuos agroindustriales, así como de las bacterias ruminales, aisladas de bovinos fistulados (Yucatán).

8.1 Levaduras

En la Tabla 8 se presenta la caracterización macro y microscópica de las levaduras silvestres. Con excepción de la cepa API-1 *W. anomalus*, todas las otras levaduras silvestres presentan colonias redondeadas con bordes lisos y color blanco cremoso. Mientras que las colonias de la cepa API-1 se aprecian con borde ligeramente irregular y superficie rugosa. Por otro lado, la cepa N1 *C. glabrata* fue la que presenta menor tamaño de colonia en el agar YPG, comparada con las demás levaduras. A nivel microscópico se observaron formas ovoides para las cepas de *K. marxianus* y para *W. anomalus*, y células más redondeadas para la cepa de *C. glabrata*.

Tabla 8. Caracterización morfológica de las levaduras silvestres.

Clave	Identificación	Morfología macroscópica	Morfología microscópica
HY1	<i>K. marxianus</i>		
L4B	<i>K. marxianus</i>		
N1	<i>Candida glabrata</i>		
MG	<i>K. marxianus</i>		
API-1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (<i>Pichia anomala</i>)		
API-2	<i>K. marxianus</i>		

Las secuencias amplificadas⁰ de las cepas API-2, HY1, L4B y MG tuvieron como relativo más cercano a *Kluyveromyces marxianus*, con identidades superiores o iguales al 99%. La cepa API-1 fue identificada molecularmente como *Wickerhamomyces anomalus* (conocida anteriormente como *Pichia anomala*) y la cepa N1 como *Candida glabrata*. Las secuencias de las levaduras N1, API-1, API-2 y HY1 fueron depositadas en la base de datos GenBank, con los siguientes números de acceso: KP710192, KP710194, KP710193 y

^φ La extracción de ADN y posterior secuenciación de los microorganismos utilizados fue realizada por la Dra. Ana Luisa Ramos, como parte de su colaboración en el proyecto del cual se desprende esta tesis.

KP682505, respectivamente. Adicionalmente, las cepas API-1 y API-2 también cuentan con registro en el NRRL (Agricultural Research Service Culture Collection, los números que les fueron asignados son Y-67076 y Y-67077, respectivamente.

En el alineamiento de múltiples secuencias ninguna de las *Kluyveromyces marxianus* alineo al 100% con las otras, por lo tanto se asume que las secuencias amplificadas son diferentes entre sí. Para conocer el grado de similitud entre ellas sería necesario amplificar otras regiones o genes específicos de la especie.

En el siguiente cladograma (Figura 9) se muestra la presencia de tres clados y se puede apreciar que las cepas HY1 y L4B tienen bastante similitud entre sí. Sin embargo, se partió del supuesto que todas las levaduras son diferentes entre sí por la diferencia en el origen del aislamiento.



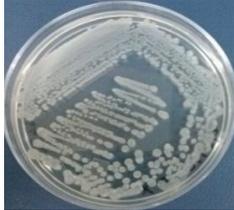
Figura 9. Relación filogenética de las cepas de levaduras silvestres

Durante las últimas 3 décadas, tanto levaduras Ascomycetous como Basidiomycetous pertenecientes a los géneros *Candida*, *Pichia*, *Clavispora*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Kloeckera*, *Torulaspota*, *Geotrichum*, *Cryptococcus* etc., han sido identificadas por su habilidad de producir etanol a partir de d-xilosa. Por lo tanto, es probable que las levaduras pertenecientes a estos géneros y con la capacidad de asimilar hexosas y (o) pentosas puedan ser candidatos factibles para la producción de etanol (Rao et al., 2008). De acuerdo con Cadete et al. (2012), la mejora en el proceso de fermentación alcohólica de biomasa lignocelulósica parte del aislamiento de levaduras con diferentes capacidades de asimilación y fermentación de azúcares hemicelulósicos, pudiendo aislarse de ambientes tan distintos como insectos que se alimentan de madera (Ali et al., 2017) hasta frutas o árboles en descomposición (Rao et al., 2008). De tal forma, que las levaduras silvestres a evaluar en el presente trabajo son candidatos idóneos, tanto por su origen como por su identidad.

8.2 Bacterias ruminales

En la Tabla 9 se presenta la caracterización macro y microscópica de las bacterias ruminales. En todos los casos se observaron colonias planas de bordes irregulares, de color blanquecino. En el análisis microscópico se encontró que todas las bacterias analizadas presentaban morfología bacilar y reacción Gram positiva.

Tabla 9. Caracterización morfológica de las bacterias ruminales.

Clave	Identificación	Morfología macroscópica	Morfología microscópica
Xer-15	<i>Bacillus subtilis</i>		
Xer-18	<i>Bacillus subtilis</i>		
Xer-19	<i>Bacillus</i> sp.		
Xer-28	<i>Bacillus subtilis</i>		

Las secuencias de los fragmentos amplificados de las cepas Xer15, Xer 18 y Xer 28 presentaron una gran similitud con *Bacillus subtilis* (99% de identidad)[‡], mientras que la cepa Xer 19 no alinea totalmente con ninguna cepa reportada previamente, siendo el relativo más cercano *Bacillus* sp.

En el siguiente cladograma (Figura 10) se puede observar como la cepa Xer19 se encuentra en un grupo independiente de las otras cepas, mientras que Xer 18 y Xer 15 son los más cercanos filogenéticamente. Al lado derecho de la imagen se presentan las distancias generadas por el algoritmo del software Clustalw. Fan et al. (2017) señalan que el análisis de las secuencias 16S rRNA no son suficientes para discriminar a los representantes de las especies de *B. subtilis* y se requiere de otros análisis como por ejemplo, el perfil de ácidos grasos para poder discernir entre especies.

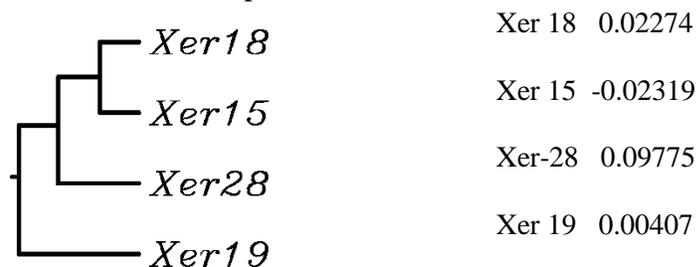


Figura 10. Relación filogenética de las bacterias ruminales

Muchas especies de *Bacillus* han sido estudiadas en su capacidad y eficiencia para utilizar biomasa lignocelulósica, así como para la producción de enzimas ligninolíticas (Adhyaru et al., 2014). Por ejemplo, la bacteria aislada de ambiente marino *Bacillus* sp. JS-1 se empleó para la sacarificación del alga *Saccharina japonica* en procesos de sacarificación y fermentación simultánea (Jang et al., 2011), o como la cepa *Bacillus* sp. SAMRC-UFH1 aislada de aserrín que se utilizó para producir celulasas y xilanasas (Nkohla et al., 2017). La eficiencia hidrolítica que ha mostrado este género ha llevado a su búsqueda y aislamiento para su utilización en procesos de sacarificación para la liberación de azúcares a partir de biomasa vegetal, es por ello que se requiere el aislamiento de microorganismos específicos para utilizar durante el proceso de sacarificación.

[‡] La extracción de ADN y posterior secuenciación de los microorganismos utilizados fue realizada por la Dra. Ana Luisa Ramos, como parte de su colaboración en el proyecto del cual se desprende esta tesis.

CAPITULO II

Establecimiento de las condiciones medioambientales adecuadas para el crecimiento y producción alcohólica de levaduras silvestres en medio de cultivo sintético

La finalidad de este capítulo es describir como se establecieron las condiciones medioambientales más adecuadas para el crecimiento y producción alcohólica para cada una de las seis levaduras silvestres estudiadas, en esta etapa se evaluaron diferentes condiciones de cultivo, variando factores como la temperatura, el pH del medio y la velocidad de agitación.

A modo de ejemplo se presentan dos cinéticas (Figura 11) en donde se puede observar el comportamiento de la población de la cepa *C. glabrata* N1 a lo largo del tiempo, en dos diferentes condiciones medioambientales. En la Figura 11a se presentan los resultados obtenidos con esta cepa a 30°C, pH 4.5 y 250 rpm (tratamiento 7), mientras que en la Figura 11b se presenta la dinámica de la población durante el crecimiento a 40°C, pH 4.5 y 0 rpm (tratamiento 2).

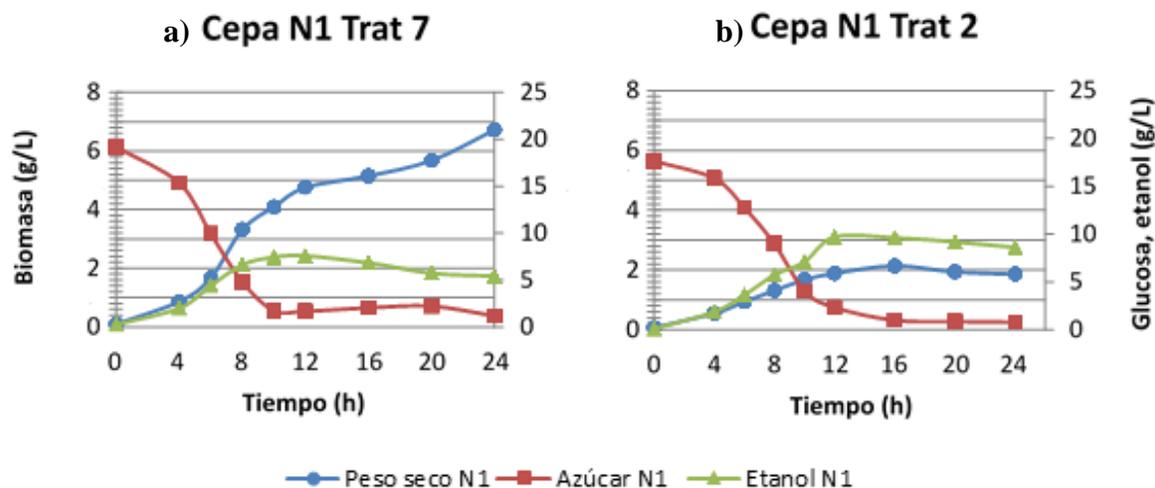


Figura 11. Cinética de crecimiento para la cepa *C. glabrata* N1 en medio YPG a) 30°C, pH 5.5, 250 rpm y b) 40°C, pH 4.5, 0 rpm

En ambas condiciones, para la cepa *C. glabrata* N1 no se observó fase lag, y la fase de crecimiento exponencial se prolongó hasta las 12 horas de cultivo. En el medio con agitación

(Figura 11a) se presentó un repunte en la cantidad de biomasa obtenida a las 20 h de cultivo, alcanzándose el mayor peso seco ($7.307 \pm 0.57 \text{ g/l}$) en estas condiciones (30°C , pH 5.5, 250 rpm) mientras que en el cultivo estático (Figura 11b, 40°C , pH 4.5, 0 rpm) se obtuvieron $1.783 \pm 0.15 \text{ g/L}$. Con respecto al consumo de glucosa por la cepa *C. glabrata* N1 se encontró que la agitación también favorece la disminución en el contenido de este monosacárido en el medio a menores tiempos de cultivo puesto que las células activas están utilizando esta fuente de carbono para la realización de sus actividades metabólicas que conducen a la síntesis de biomasa celular. Las cantidades producidas de etanol en las dos condiciones ambientales mostradas fueron diferentes entre sí, produciendo hasta 9.61 g/L en condiciones de anaerobiosis (tratamiento 2).

Con los datos generados durante las cinéticas bajo diferentes condiciones medioambientales se calcularon los distintos parámetros cinéticos, mismos que se presentan a continuación en las siguientes secciones.

8.3 Crecimiento.

En esta sección se presentan los parámetros cinéticos de crecimiento: población, peso seco neto, velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) y tiempo de duplicación (TD) calculados para cada una de las cepas silvestres estudiadas.

8.3.1 Población

La fluctuación de las poblaciones de las levaduras silvestres durante el cultivo bajo distintas condiciones mediambientales se determinó mediante cuenta directa al microscopio y los resultados se presentan en la Tabla 10.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 10. Población máxima alcanzada por las levaduras silvestres en cada uno de los tratamientos evaluados.

Trat	Población x 10 ⁶ (cel/ml)					
	MG	HY1	N1	API-1	API-2	L4B
1	102.5±2.12 ^{bc}	193.5±7.78 ^a	267.5±6.36 ^{ab}	97±1.41 ^a	125.5±0.71 ^b	77±7.07 ^a
2	50±1.41 ^a	195.5±10.61 ^a	208±12.73 ^a	33.5±2.12 ^a	70±4.24 ^a	50.5±3.54 ^a
3	143±8.48 ^d	217±1.41 ^a	443±14.14 ^b	153±8.48 ^{ab}	115.5±7.78 ^b	158.5±6.36 ^b
4	40±2.83 ^a	188.5±9.19 ^a	192.5±24.75 ^a	39.5±4.95 ^a	89±9.89 ^{ab}	101±1.41 ^{ab}
5	244±2.88 ^e	638±38.18 ^c	815.5±21.92 ^c	465.5±13.43 ^c	414.5±19.09 ^e	389.5±3.53 ^d
6	118.5±6.26 ^c	936±76.37 ^d	1307.5±218.5 ^d	258 ±21.45 ^{bc}	463±33.94 ^f	316±26.87 ^c
7	324.5±3.53 ^f	654.5±24.75 ^c	755.5±13.43 ^c	404.5±10.61 ^c	353±21.21 ^d	382.5±10.61 ^d
8	89±4.24 ^b	547±5.66 ^b	888.5±16.26 ^c	153 ± 11.34 ^b	256±14.14 ^c	359±66.47 ^{cd}

*Letras diferentes en una misma columna indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ($p < 0.05$). Condiciones tratamientos: **Trat 1:** 30°C, pH 4.5, 0 rpm; **Trat 2:** 40°C, pH 4.5, 0 rpm; **Trat 3:** 30°C, pH 5.5, 0 rpm; **Trat 4:** 40°C, pH 5.5, 0 rpm; **Trat 5:** 30°C, pH 4.5, 250 rpm; **Trat 6:** 40°C, pH 4.5, 250 rpm; **Trat 7:** 30°C, pH 5.5, 250 rpm y **Trat 8:** 40°C, pH 5.5, 250 rpm.

De manera general, se pudo establecer que el número de células en el medio de cultivo sintético (YPG) se vio influenciado tanto por las condiciones de crecimiento como por la cepa de levadura en estudio. Así, se obtuvieron poblaciones que fluctuaron entre 40×10^6 cel/ml para la cepa *K. marxianus* MG crecida a las condiciones de 40°C, pH 5.5 y 0 rpm (Tratamiento 4), hasta $1,307 \times 10^6$ cel/ml para la cepa *Candida glabrata* N1 al crecer a 40°C, pH 4.5 y 250 rpm (Tratamiento 6).

En el hipotético caso de seleccionar las condiciones para el cultivo de las levaduras silvestres, basados únicamente en un parámetro de crecimiento como lo es el conteo poblacional, se tendría que las mejores condiciones para obtener la máxima población para las cepas *K. marxianus* HY1, *K. marxianus* API-2 y *C. glabrata* N1 serían: 40°C, pH 4.5 y 250 rpm (Tratamiento 6); mientras que para la cepa *K. marxianus* MG el cultivo a 30°C, pH 5.5 y 250 rpm (Tratamiento 7) favorecería el mayor crecimiento celular; finalmente, para las cepas *W. anomalus* API-1 y *K. marxianus* LAB podría utilizarse 30°C, pH 4.5, 250 rpm (Tratamiento

5) o bien 30 °C, pH 5.5, 250 rpm (Tratamiento 7), pues ambos tratamientos son estadísticamente iguales y no existe diferencia significativa entre ambos.

De manera general se pudo establecer que el mayor número de células para todas las levaduras silvestres en medio YPG (Tabla 10) se obtuvieron bajo condiciones de cultivo con agitación (250 rpm), en los tratamientos del 5 al 8. La levadura que tuvo mayor capacidad de crecimiento en todos los tratamientos evaluados fue la cepa *C. glabrata* N1, seguida por la cepa *K. marxianus* HY1.

Los resultados obtenidos para la población microbiana de la cepa *C. glabrata* N1 fueron mayores a los reportados por Estrada (2013), quien para cepas de *C. glabrata* y *C. tropicalis* aisladas de líquido ruminal y estómago de termita y crecidas en medio YPG a 40°C y 200 rpm se obtuvieron poblaciones celulares en el rango de 124 a 205 x 10⁶ cel/ml, mientras que en esta experimentación los valores obtenidos se encontraron entre 192 y 1307 x 10⁶ cel/ml, estas variaciones pueden deberse a una mayor adaptación metabólica de la cepa N1, así como a las condiciones de cultivo empleadas.

El análisis de varianza efectuado para el parámetro población (ANEXO 1a) mostró que para cada cepa se tuvo influencia de los distintos factores o sus interacciones, de tal forma que fueron estadísticamente significativos a un nivel de confianza del 95%

El gráfico de Pareto Estandarizado para población (Figura 12) mostró que, para todas las cepas, excepto *K. marxianus* MG, la agitación es el principal factor que influye sobre la población. Para la cepa MG el principal factor que afectó la población es la temperatura, seguido de la agitación (Figura 12a). Lo encontrado en razón a la agitación no coincide con lo reportado por Carrillo (2003) quien señala que uno de los factores más importantes para la sobrevivencia y el crecimiento de las levaduras es el pH, sin embargo se encontró que este factor como poco significativo para la población de las levaduras silvestres estudiadas.

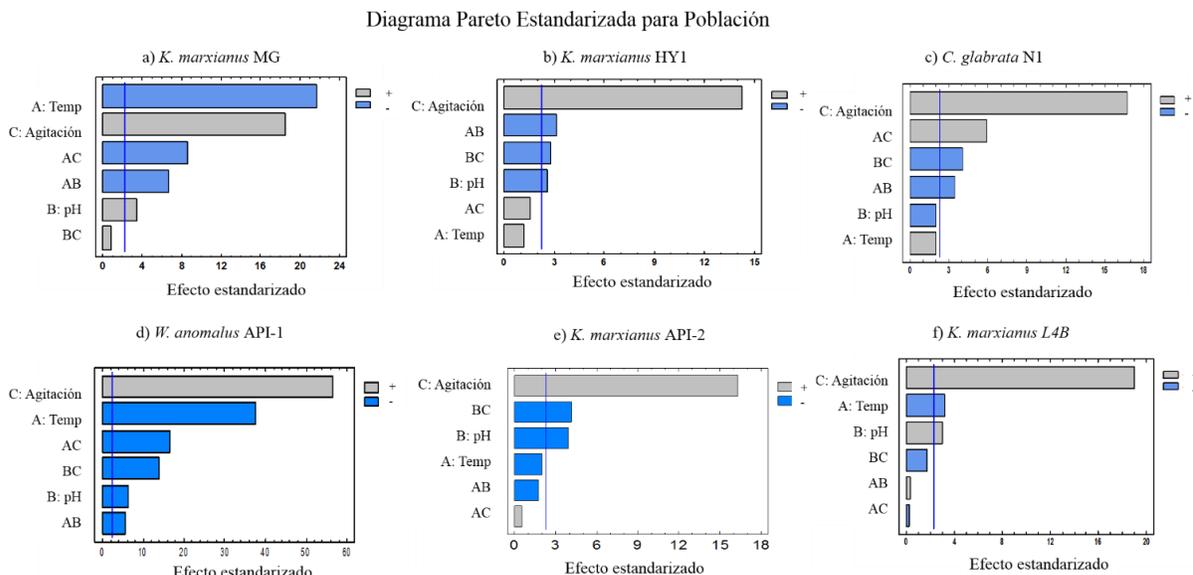
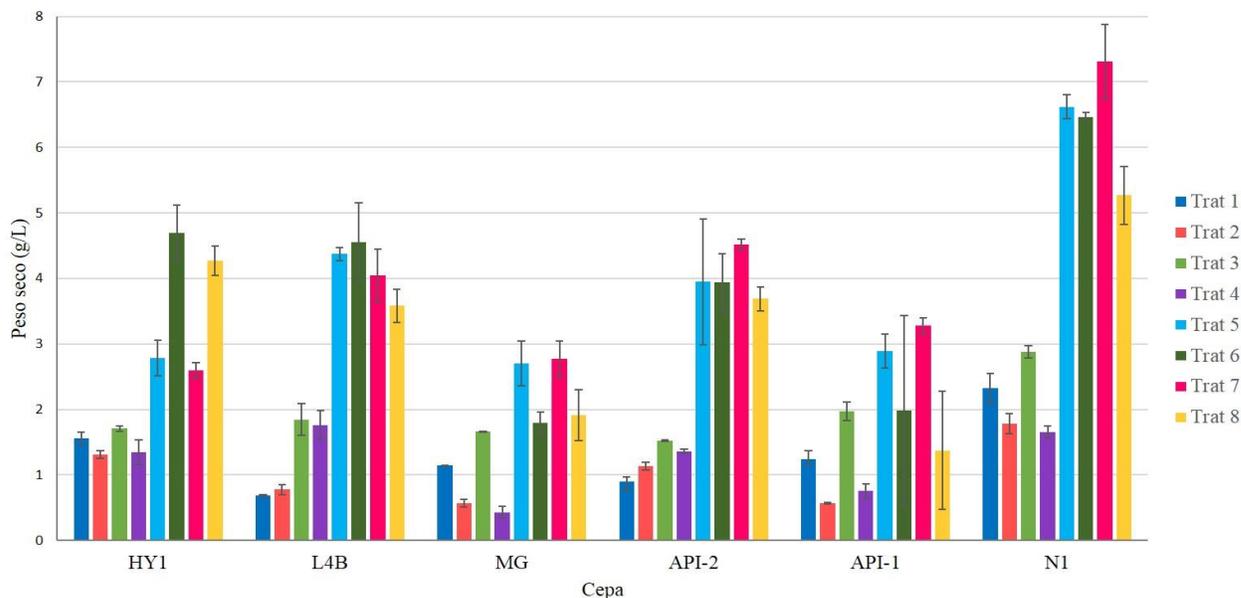


Figura 12. Diagramas de pareto para la variable respuesta población de cada una de las cepas de levaduras silvestres.

Como pudo apreciarse en los resultados obtenidos, los diferentes factores, principalmente físicos y su interacción con factores químicos pueden afectar el curso de la fermentación al influir sobre la ecología y la adaptación de la microbiota presente (Arroyo-López, et al., 2009). El comportamiento de un microorganismo en crecimiento es el resultado de la interacción que se produce entre el microorganismo y el medio ambiente en el reactor, y que en rigor es el resultado de los llamados efectores intra y extra celulares (Arellano et al., 2008).

8.3.2 *Peso seco*

En la Figura 13 se presenta el mayor peso seco obtenido en el cultivo de las levaduras silvestres en caldo YPG bajo distintos valores de temperatura, pH y agitación. Se puede observar, en congruencia con la mayor población, que el mayor peso seco correspondió a la cepa *C. glabrata* N1 en aquellos tratamientos que implican agitación (5 al 8).



Condiciones tratamientos: **Trat 1:** 30°C, pH 4.5, 0 rpm; **Trat 2:** 40°C, pH 4.5, 0 rpm; **Trat 3:** 30°C, pH 5.5, 0 rpm; **Trat 4:** 40°C, pH 5.5, 0 rpm; **Trat 5:** 30°C, pH, 4.5, 250 rpm; **Trat 6:** 40°C, pH 4.5, 250 rpm; **Trat 7:** 30°C, pH, 5.5, 250 rpm y **Trat 8:** 40°C, pH 5.5, 250 rpm.

Figura 13. Peso seco obtenido para cada una de las cepas de levaduras silvestres bajo diferentes condiciones de cultivo.

El mayor peso seco alcanzado por la cepa *K. marxianus* HY1 fue de 4.69 g/L, el cual se obtuvo al crecer esta levadura silvestre a 40°C, pH 4.5 y 250 rpm (Tratamiento 6), sin embargo, también en las condiciones de cultivo a 40°C, pH 5.5 y 250 rpm (Tratamiento 8) se puede alcanzar un buen peso seco, considerando que estos dos tratamientos son iguales estadísticamente hablando. Es decir, esta levadura es preferentemente termófila y aerobia, no afectándole el pH del medio del cultivo en el rango evaluado. Al igual que la anterior, la cepa *K. marxianus* L4B alcanzó el mayor peso seco (4.55 g/L) al crecer el microorganismo bajo las condiciones de 40°C, pH 4.5 y 250 rpm (Tratamiento 6) aunque este formó un grupo homogéneo con el Tratamiento 5 y Tratamiento 7 (30°C, pH 4.5, 250 rpm y 30°C, pH 5.5, 250 rpm, respectivamente), por lo que cualquiera de ellos podría utilizarse en el primer paso del proceso fermentativo a nivel industrial, donde se requiere obtener una mayor cantidad de biomasa para inocular el medio de fermentación.

También para la cepa *K. marxianus* API-2, la agitación favoreció la obtención de mayor cantidad de biomasa en peso seco puesto que se alcanzaron 4.52 g/L cuando creció en las condiciones de 30°C, pH 5.5 y 250 rpm (Tratamiento 7), aunque los Tratamientos 5 al 8

fueron estadísticamente iguales. Finalmente, la cepa *K. marxianus* MG fue la que obtuvo el menor peso seco de entre el grupo de *Kluyveromyces* alcanzado únicamente 2.77 g/L que se obtuvieron al emplear las condiciones de 30°C, pH 5.5 y 250 rpm (Tratamiento 7), aunque el tratamiento 5 (30°C, pH 4.5 y 250 rpm) es estadísticamente igual al anterior y se produjeron 2.70 g/L.

Con respecto a la levadura *W. anomalus* API-1 se alcanzó el mayor peso seco durante el cultivo a 30 °C, pH 5.5 y 250 rpm (Tratamiento 7), al cual correspondió a 3.28 g/L de biomasa celular. Finalmente, de entre todas las cepas caracterizadas, la cepa *C. glabrata* N1 fue la que alcanzó el mayor peso seco, logrando obtenerse hasta 7.31 g/L al crecer en las condiciones del tratamiento 7 (30°C, pH 5.5 y 250 rpm) (Fig 13).

La cantidad de biomasa obtenida para las cepas HY1, L4B y API-2 es similar a la reportada por Morán-Marroquín *et al.* (2009) para la cepa *S. cerevisiae* S2 crecida a pH 5 en jugo de agave enriquecido con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y NH_4PO_4 , al producir 4.73 g/L de biomasa como peso seco. Aunque, en este caso iniciaron la fermentación en cultivo continuo con 100 g/L de azúcares reductores, mientras que en este trabajo se partió de 20g/L de glucosa como sustrato en un cultivo por lote. De igual forma, Ortíz-Muñiz *et al.* (2010) indicaron que la cepa *S. cerevisiae* ITV-01 produjo un peso seco de 4.5 g/L durante su crecimiento en medio de cultivo con 100 g/L de glucosa, pH 4.5 y 30°C, valor similar al encontrado para las mencionadas cepas de *K. marxianus* HY1, L4B y API-2; estos autores también señalan la obtención de un peso seco de 1.2 g/L cuando se inocula a la levadura ITV-01 en un medio sintético con 250 g/L de glucosa, dicho peso seco es mucho menor al obtenido con las cepas MG y API-1 estudiadas y esa variación puede deberse tanto a la especie de levadura empleada como a una inhibición metabólica ocasionada por el exceso de sustrato.

Después de efectuar el análisis de varianza (ANEXO 1b), se establecieron los factores o sus interacciones que presentaron un efecto estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95% sobre el peso seco de las levaduras silvestres, encontrándose que para cada cepa se tienen diferentes factores, mismos que se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11. Factores que influyen sobre la cantidad de biomasa como peso seco producida por cada cepa.

Cepa	Temperatura	pH	Agitación	Interacción
<i>K. marxianus</i> MG	*		*	
<i>K. marxianus</i> HY1	*		*	* Temperatura-Agitación
<i>K. marxianus</i> API-2			*	
<i>K. marxianus</i> L4B			*	*pH-Agitación
<i>W. anomalous</i> API-1		*	*	* Temperatura-Agitación * pH-Agitación
<i>C. glabrata</i> N1	*		*	* Temp-pH

* Estadísticamente significativo, con un nivel de confianza del 95%.

El análisis de varianza realizado para la cepa *K. marxianus* MG mostró que los factores individuales temperatura y agitación son los únicos que tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el peso seco alcanzado por esta cepa con un nivel de confianza del 95%. Por otro lado, para la cepa *K. marxianus* HY1 la interacción temperatura-agitación, así como los factores individuales agitación y temperatura tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre esta respuesta ($p < 0.05$). Mientras que, para la cepa *K. marxianus* L4B los factores que fueron estadísticamente significativos fueron la interacción pH-agitación y el factor individual agitación y para la cepa *K. marxianus* API-2 únicamente fue la agitación.

En el caso de la cepa *W. anomalous* API-1, el análisis de varianza realizado mostró que los factores que tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el peso seco fueron: la interacción temperatura-agitación, la interacción pH-agitación y los factores individuales pH y agitación. Por último, los factores que tuvieron efecto sobre el peso seco alcanzado por la cepa *C. glabrata* N1 fueron la interacción temperatura-pH y los factores temperatura y agitación.

El diagrama de Pareto (Figura 14a) mostró que el factor de mayor influencia sobre el peso seco de la cepa *K. marxianus* MG fue la agitación (250 rpm), este mismo factor influyó sobre el peso seco alcanzado por las cepas *K. marxianus* HY1, *K. marxianus* L4B (Figura 14b y f, respectivamente) y *C. glabrata* N1 (Figura 14c). Por otro lado, el diagrama de Pareto

(Figura 14 d y e) muestra que la temperatura y la agitación fueron los principales factores que tuvieron influencia sobre el peso seco de las cepas *W. anomalus* API-1 y *K. marxianus* API-2.

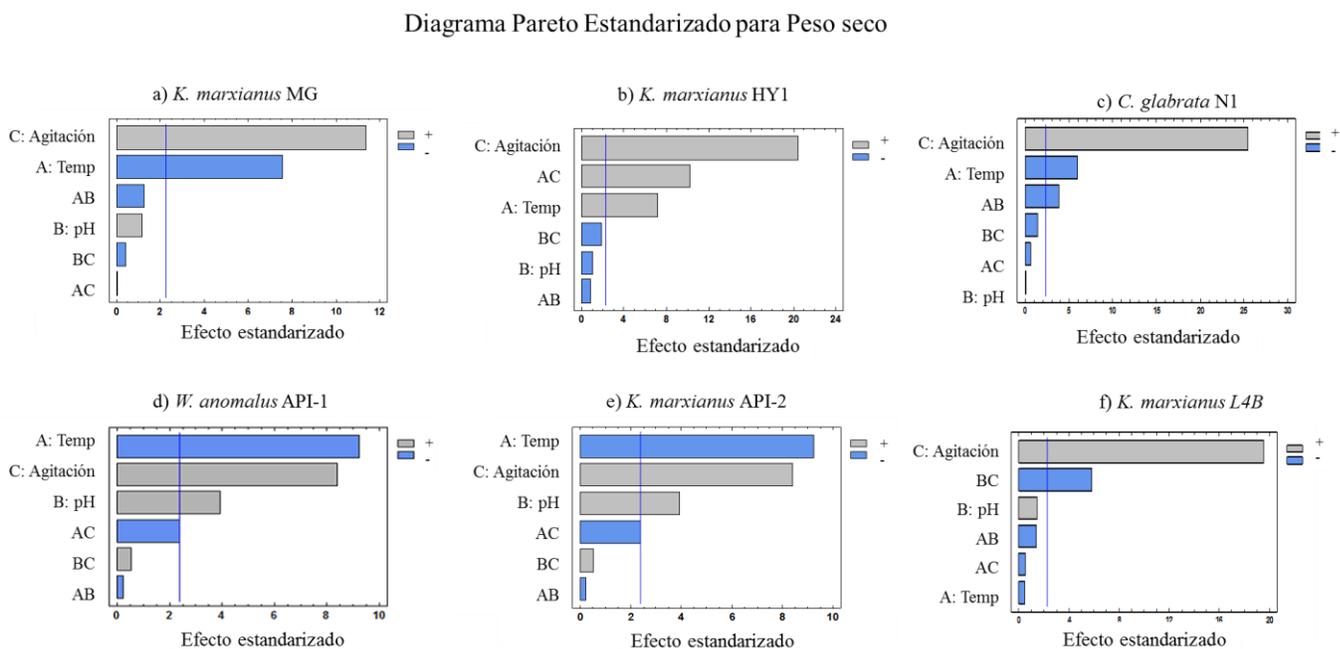


Figura 14. Diagramas de pareto para la variable respuesta peso seco de cada una de las cepas de levaduras silvestres.

8.3.3 Velocidad máxima de crecimiento y tiempo de duplicación

En las Tabla 12 y 13 se presentan los resultados obtenidos para los parámetros cinéticos de velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) y tiempo de duplicación (TD) para cada una de las cepas de levadura estudiadas bajo diferentes condiciones de crecimiento.

Con relación a la cepa *K. marxianus* HY1 la mayor velocidad de crecimiento y el menor tiempo de duplicación se alcanzaron en el tratamiento 8, en el que se realizó el crecimiento a 40°C, pH de 5.5 y 250 rpm. Para la cepa *K. marxianus* MG se puede apreciar que existió una diferencia en la velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}) así como en el tiempo de duplicación (TD), en dependencia del tratamiento empleado, alcanzándose la mayor μ_{max} (0.403 h⁻¹) y el menor TD (1.73 h) en el tratamiento 7 (30°C, pH 5.5 y 250 rpm).

Con respecto a la cepa *K. marxianus* L4B la mayor velocidad de crecimiento (0.573 h^{-1}) y el menor tiempo de duplicación (1.22 h) correspondieron a las condiciones de cultivo del tratamiento 8, es decir, 40°C , pH 5.5 y 250 rpm; estas mismas condiciones también permitieron que la cepa *K. marxianus* API-2 alcanzara la mayor μ_{max} (0.688 h^{-1}) y el menor tiempo de duplicación (1.09 h). Como puede observarse, tres de las cuatro cepas identificadas como *K. marxianus* tienen la mayor μ_{max} y el menor TD en el crecimiento a las condiciones del tratamiento 8. Los valores obtenidos para estas cepas en estos parámetros cinéticos son considerablemente mayores que los reportados por Govindaswamy y Vane (2007) para *S.cerevisiae* 424A, quienes indican una μ_{max} de 0.291 h^{-1} durante el crecimiento de esta levadura en medio YPG a 30°C y pH 5.0.

Para la cepa *W. anomalus* API-1 el menor tiempo de duplicación y mayor velocidad de crecimiento se obtuvieron en el tratamiento 6 (40°C , pH 4.5 y 250 rpm), alcanzándose 0.45 h^{-1} y 1.56 h, respectivamente. Finalmente, la cepa *C. glabrata* N1 alcanzó una μ_{max} de 0.872 h^{-1} al crecer a 40°C , pH 5.5 y 250 rpm (Tratamiento 8). Las tasas de crecimiento obtenidas en las mejores condiciones fueron altas, lo que indica una gran adaptación de estas levaduras silvestres al medio de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 12. Velocidad máxima de crecimiento en medio sintético para las cepas de levadura silvestres.

Trat	Temp (°C)	pH	Agitación (rpm)	μ max (h ⁻¹)					
				HY1	L4B	MG	API-2	API-1	N1
1	30	4.5	0	0.321 ± 0.067 ^a	0.267±0.021 ^a	0.242 ± 0.08 ^{ab}	0.258±0.012 ^a	0.271±0.005 ^{ab}	0.376±.004 ^{ab}
2	40	4.5	0	0.361 ± 0.054 ^{ab}	0.252±0.028 ^a	0.249 ± 0.06 ^{ab}	0.230±0.035 ^a	0.216±0.027 ^a	0.521±.068 ^{bc}
3	30	5.5	0	0.251 ± 0.058 ^a	0.271±0.042 ^a	0.282 ± 0.07 ^{abc}	0.231±0.015 ^a	0.276±0.051 ^{ab}	0.290±.053 ^a
4	40	5.5	0	0.410 ± 0.005 ^{ab}	0.463±0.026 ^{bc}	0.353 ± 0.03 ^{bc}	0.334±0.064 ^{ab}	0.287±0.149 ^{ab}	0.457±0.043 ^{abc}
5	30	4.5	250	0.412 ± 0.01 ^{ab}	0.498±0.004 ^{bc}	0.283 ± 0.03 ^{abc}	0.432±0.080 ^{bc}	0.379±0.066 ^{ab}	0.556±0.059 ^{bc}
6	40	4.5	250	0.591 ± 0.267 ^b	0.520±0.100 ^{bc}	0.202 ± 0.06 ^a	0.543±0.077 ^{cd}	0.450±0.076 ^{ab}	0.624±0.100 ^c
7	30	5.5	250	0.403 ± 0.04 ^{ab}	0.428±0.060 ^b	0.403 ± 0.04 ^c	0.426±0.002 ^{bc}	0.371±0.031 ^{ab}	0.385±0.167 ^{ab}
8	40	5.5	250	0.926 ± 0.05 ^c	0.573±0.067 ^c	0.193 ± 0.038 ^a	0.688±0.105 ^d	0.338±0.158 ^b	0.872±0.029 ^d

*Letras diferentes en una misma columna indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).

Tabla 13. Tiempo de duplicación en medio sintético para las cepas de levadura silvestres.

Trat	Temp (°C)	pH	Agitación (rpm)	TD (h)					
				HY1	L4B	MG	API-2	API-1	N1
1	30	4.5	0	2.20 ± 0.46 ^{cd}	2.607±0.205 ^b	2.97 ± 0.83 ^{ab}	2.685±0.121 ^d	2.560±0.051 ^a	1.846±0.019 ^{bcd}
2	40	4.5	0	1.94 ± 0.29 ^{bc}	2.773±0.309 ^b	2.85 ± 0.67 ^{ab}	3.00±0.267 ^d	3.229±0.406 ^a	1.341±0.175 ^{abc}
3	30	5.5	0	2.83 ± 0.66 ^d	2.592±0.403 ^b	2.53 ± 0.63 ^{ab}	3.014±0.202 ^d	2.559±0.473 ^a	2.432 ± 0.447 ^d
4	40	5.5	0	1.69 ± 0.02 ^{bc}	1.500±0.084 ^a	1.97 ± 0.19 ^a	2.116±0.406 ^c	2.799±1.458 ^a	1.525±0.144 ^{abc}
5	30	4.5	250	1.68 ± 0.007 ^{bc}	1.391±0.011 ^a	2.46 ± 0.27 ^{ab}	1.633±0.304 ^{bc}	1.857±0.322 ^a	1.255±0.134 ^{abc}
6	40	4.5	250	1.30 ± 0.589 ^{ab}	1.358±0.261 ^a	3.57 ± 1.04 ^b	1.290±0.183 ^{ab}	1.564±0.265 ^a	1.126±0.181 ^{ab}
7	30	5.5	250	1.44 ± 0.006 ^{abc}	1.636±0.228 ^a	1.73 ± 0.19 ^a	1.627±0.007 ^{bc}	1.875±0.155 ^a	1.984±0.859 ^{cd}
8	40	5.5	250	0.749 ± 0.04 ^a	1.219±0.143 ^a	3.66 ± 0.73 ^b	1.019±0.155 ^a	2.305±1.078 ^a	0.795 ± 0.026 ^a

*Letras diferentes en una misma columna indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).

En relación a la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación, en general, el único factor que tuvo efecto estadísticamente significativo fue la agitación (Anexo 1 c y d), lo cual es congruente con los resultados anteriores pues la biomasa depende de estos parámetros. Para la cepa HY1 el análisis de varianza realizado a los datos obtenidos mostró que únicamente la agitación y la temperatura (como factores individuales) tuvieron un efecto estadísticamente significativo a un nivel de confianza del 95% sobre estos parámetros. Por otro lado, para la cepa API-2 el análisis de varianza realizado indicó que la interacción temperatura-agitación, así como los factores individuales tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el tiempo de duplicación y la velocidad de crecimiento. Después de realizar el análisis de varianza para la cepa N1 se encontró que los factores individuales temperatura y agitación tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación.

El análisis de varianza realizado para la cepa *K. marxianus* MG mostró que el único factor que tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación fue la interacción temperatura-agitación.

Además, en el diagrama de Pareto (Figura 15 y Figura 16), para las cepas HY1, API-1, L4B y API-2 se puede observar que la agitación es el factor que más influencia mostró sobre estas dos variables respuesta (velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación). Mientras que en el caso de la cepa N1 el diagrama de Pareto (Figura 15 y Figura 16) muestra que la temperatura fue el principal factor que afectó la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación; y para la cepa MG la interacción temperatura-agitación fue la que tiene mayor efecto.

Diagrama de Pareto Estandarizado para μ_{max}

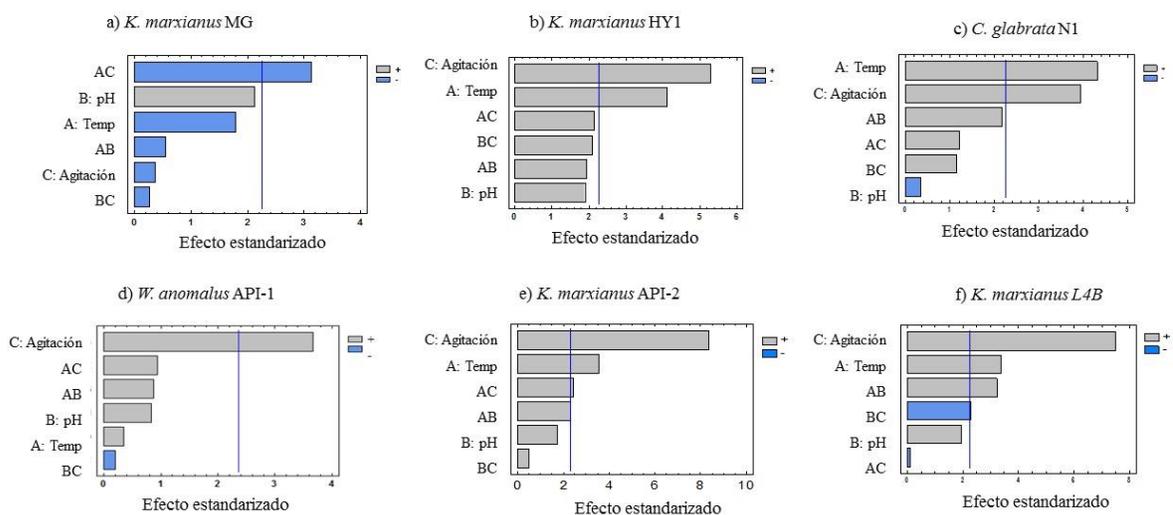


Figura 15. Diagrama de Pareto para la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) de las cepas silvestres.

Diagrama de Pareto Estandarizado para Td

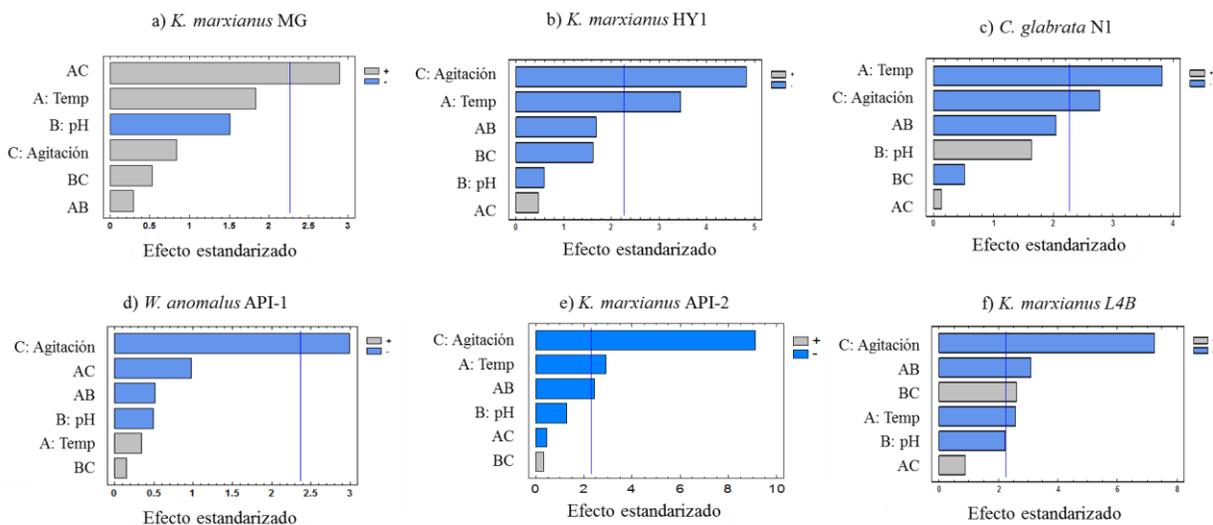


Figura 16. Diagrama de Pareto para el tiempo de duplicación (TD) de las cepas silvestres.

La mayor velocidad específica de crecimiento para la cepa MG (0.403 h^{-1}) fue menor a la obtenida por Arellano *et al.* (2008) para cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (0.492 h^{-1}) aisladas de jugo de agave y crecidas al mismo pH en medio de cultivo con jugo de *Agave tequilana* enriquecido con 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Sin embargo, esta diferencia puede deberse a que estos autores iniciaron la fermentación con una concentración de 60 g/L de azúcares reductores.

En general, se pudo observar que los tratamientos en los que se involucró la agitación (Tratamientos 5 al 8) permitieron obtener la mayor población y peso seco para cada cepa de levadura, excepto para las cepas MG y API-1, en las que los tratamientos 6 y 8 (ambos a 40°C , con agitación, pero diferente pH) disminuyeron el número de células que podría obtenerse. Se ha señalado que los microorganismos requieren cierta cantidad de oxígeno para sintetizar ácidos grasos que son indispensables en la formación de la membrana celular (Fromanger y col., 2010), adicional a esto, la mayoría de las levaduras que se han identificado son fermentadoras facultativas, y dependiendo de las condiciones de crecimiento, el tipo y la concentración de los azúcares y / o la disponibilidad de oxígeno pueden presentar un metabolismo completamente respiratorio o un metabolismo fermentativo o incluso ambos en un metabolismo respiratorio-fermentativo, por ejemplo, *S. cerevisiae* o *Pichia jadinii*, este último se denominaba anteriormente *C. utilis* (Rodrigues et al., 2006).

A continuación (Tabla 14), se resumen las mejores condiciones que favorecieron la obtención de la mayor cantidad de biomasa expresada como peso seco para las levaduras silvestres estudiadas, mismas que fueron utilizadas en etapas posteriores.

Tabla 14. Condiciones de cultivo establecidas para las levaduras silvestres

Cepas	Temperatura (°C)	pH	Agitación (rpm)	Tratamiento
MG, API-1, API-2, N1 y L4B	30	5.5	250	7
HY1	40	4.5	250	6
	40	5.5	250	8

8.4 Producción de alcohol.

La producción promedio neta de alcohol de las diferentes cepas de levaduras silvestres en medio de cultivo YPG se presenta en la Figura 17. Las cantidades de alcohol obtenidas variaron desde 5.40 ± 0.34 g/L para la cepa MG cultivada a 40°C , pH 5.5 y 0 rpm hasta los 10.68 ± 0.49 g/L para la cepa HY1 al crecer en las condiciones del tratamiento 2 (0 rpm, 40°C , pH 4.5).

En la Figura 17 también se puede observar que la condición de crecimiento en cultivo estático (tratamientos 1 al 4) favoreció la producción de alcohol en las cepas MG, HY1, N1 y API-1, mientras que las cepas API-2 y L4B producen mayor cantidad de este metabolito en condiciones de agitación. La producción de alcohol en cultivo con agitación ligera también ha sido reportado para cepas de *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 en medio YPG con 160 g/L de glucosa (30°C , 48 h) produciendo 58.78 g/L de etanol (López-Alvarez et al., 2012).

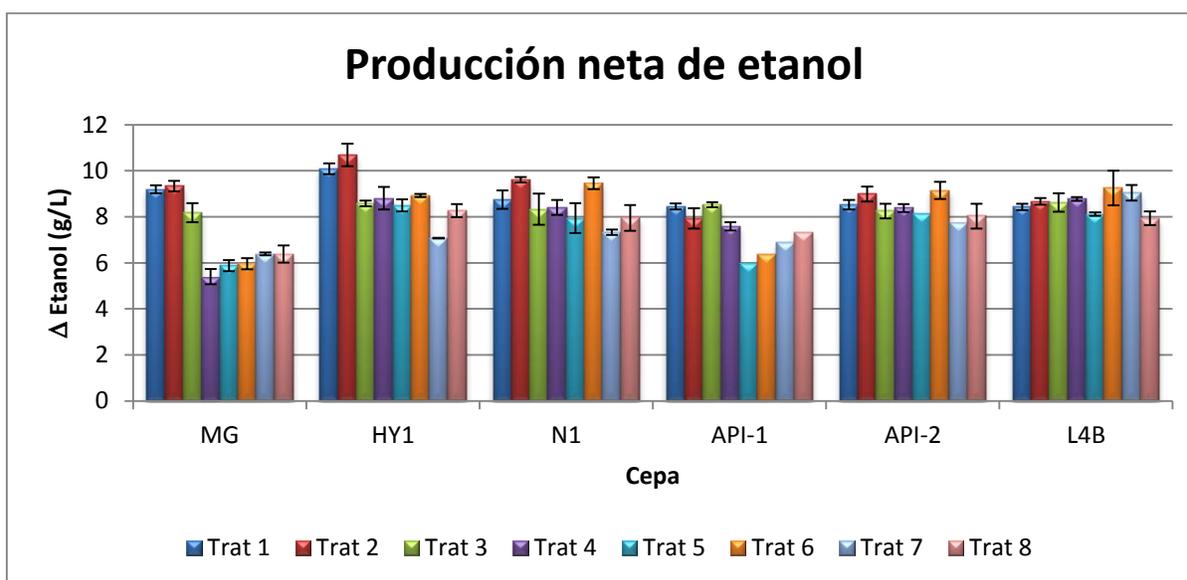


Figura 17. Producción neta de alcohol durante 24 h por levaduras silvestres inoculadas en medio de cultivo sintético. *Condiciones tratamientos:* **Trat 1:** 30°C , pH 4.5, 0 rpm; **Trat 2:** 40°C , pH 4.5, 0 rpm; **Trat 3:** 30°C , pH 5.5, 0 rpm; **Trat 4:** 40°C , pH 5.5, 0 rpm; **Trat 5:** 30°C , pH 4.5, 250 rpm; **Trat 6:** 40°C , pH 4.5, 250 rpm; **Trat 7:** 30°C , pH 5.5, 250 rpm y **Trat 8:** 40°C , pH 5.5, 250 rpm.

El análisis de varianza realizado para cada cepa de manera individual permitió identificar los factores o sus interacciones que tienen una influencia estadísticamente

significativa sobre la variable respuesta de producción de etanol (Anexo 1e). En la tabla 15 se resume lo encontrado.

Tabla 15. Factores que influyen sobre la cantidad de alcohol producida por cada cepa.

Cepa	Temperatura	pH	Agitación	Interacción
MG	*	*	*	* Temp-pH * Temp-Agit * pH- Agit
HY1	*	*	*	
N1	*	*	*	
API-1			*	
API-2	*	*		
L4B				* Temp-pH

* Estadísticamente significativo, con un nivel de confianza del 95%.

Para las cepas MG y HY1 las mejores condiciones para la producción de alcohol fueron bajo los tratamientos 1 o 2, que implican el cultivo estático y pH del medio de cultivo de 4.5, pero se efectúan a 30°C y 40°C, respectivamente. La cepa N1 produjo la mayor cantidad de etanol en medio YPG al crecer en las condiciones de los tratamientos 1 (30°C, pH 4.5 y 0 rpm), 2 (40°C, pH 4.5 y 0 rpm) o 6 (40°C, pH 4.5 y 250 rpm), pues estos tratamientos forman un grupo homogéneo entre sí. Con respecto a la cepa API-1, las mejores condiciones para la producción de etanol fueron los tratamientos 1 (30°C, pH 4.5 y 0 rpm), 2 (40°C, pH 4.5 y 0 rpm) y 3 (30°C, pH 5.5, 0 rpm). Mientras que para la cepa API-2, la cantidad neta de alcohol obtenida con los tratamientos 1, 2, 4, 5 y 6 forman un grupo estadísticamente homogéneo, por lo que cualquiera de estos tratamientos podría utilizarse de forma indistinta para la obtención de las mayores cantidades de este metabolito con la cepa API-2. Finalmente, la cepa L4B produjo la mayor cantidad de etanol en los tratamientos 2, 3, 4, 6 y 7, que son iguales estadísticamente hablando (ver Figura 17 para la referencia de las condiciones de cultivo utilizadas).

Con los datos obtenidos durante las cinéticas de fermentación se calcularon los parámetros de productividad máxima (P_{max}), productividad total (P_{tot}), velocidad de producción (r_p) y velocidad de consumo de sustrato (r_s) y se presentan en las Tablas 16 al 19.

En las fermentaciones alcohólicas se busca que las cepas de levaduras a emplear produzcan grandes cantidades de alcohol en el menor tiempo posible, lo cual conduce a disminuciones en el costo operativo.

8.4.1 Productividad máxima y productividad total

Los resultados de productividad máxima se presentan en la Tabla 16, se puede observar que la productividad máxima varió desde 0.311 g/l.h para la cepa API-1 (tratamiento 8, 40°C, pH 5.5. y 250 rpm) hasta 1.624 g/L.h para la cepa N1 (tratamiento 6, 40°C, pH 4.5, 250 rpm).

La cepa HY1 presentó una productividad máxima (Tabla 16) en el tratamiento 6 (40°C, pH 4.5, 250 rpm), alcanzando 1.153 g/l.h, mientras que la productividad total fue de 0.421 g/l.h (Tabla 17). La cepa L4B alcanzó su mayor productividad máxima al crecer bajo las condiciones del tratamiento 6 (1.232 g/l.h) y la mayor productividad total (Tabla 17) correspondió a 0.359 g/l.h, obtenida en el tratamiento 3 (30°C, pH 5.5 y 0 rpm). La mayor productividad alcanzada con la cepa N1 fue de 1.624 g/L.h, obtenida al crecer la levadura a 40°C, pH 5.5, 250 rpm y la mayor productividad total (Tabla 17) correspondió a 0.363 g/L.h en el tratamiento 1, 30°C, pH 4.5, 0 rpm. La cepa MG presentó una productividad máxima de 0.884 g/L.h al crecer bajo las condiciones del tratamiento 5 (30°C, pH 4.5, 250 rpm), mientras que la mayor productividad total correspondió a 0.405 g/L.h (tratamiento 2, 40°C, pH 4.5 y 0 rpm). Para la cepa API-1 se pudo observar que la productividad máxima obtenida fue de 0.728 g/L.h en el tratamiento 7 (30°C, pH 5.5, 250 rpm) y la mayor productividad total fue de 0.349 g/L.h alcanzada en el tratamiento 2 (40°C, pH 4.5, 0 rpm). La cepa API-2 alcanzó su mayor productividad máxima al crecer bajo las condiciones del tratamiento 6 (40°C, pH 4.5, 250 rpm, 1.202 g/l.h) y la mayor productividad total correspondió a 0.431 g/l.h, obtenida en el tratamiento 3 (30°C, pH 5.5, 0 rpm).

La productividad máxima alcanzada por las cepas de levadura silvestre estudiadas son mayores a las reportadas por Sehnem et al. (2017) para la cepa de *W. anomalus* WA-HF5.5 y la cepa *S. cerevisiae* P6H9 pues al crecer el hidrolizado de arroz a 30°C y 150 rpm se obtuvo una productividad de 0.23 g/L.h y de 0.08 g/L.h, respectivamente. Esta menor productividad pudo ser ocasionada por la presencia en el hidrolizado de compuestos como

hidroximetilfurfural y furfural, o a la hiperosmolaridad del medio que pueden inhibir el crecimiento de la levadura, o bien a la formación de otros compuestos como el xilitol y el glicerol; mientras que en el experimento aquí realizado se utilizó medio YPG.

De acuerdo al análisis de varianza (Anexo 1 f) realizado para los datos obtenidos con la cepa HY1, el factor temperatura fue el único que influyó de manera significativa sobre la productividad máxima, siendo 40°C la temperatura que permitió alcanzar los mayores valores de Pmax. Con respecto a la productividad total (Anexo 1 g) para la cepa HY1, ésta se vio influenciada exclusivamente por el factor agitación, siendo mayor la productividad total en cultivo estático (0 rpm).

Al realizar el análisis de varianza de la cepa L4B se encontró que la interacción temperatura-agitación fue la que presentó mayor influencia sobre la variable productividad máxima.

El análisis de varianza realizado para la productividad máxima obtenida con la cepa MG mostró que todos los factores, así como sus interacciones, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre esta respuesta ($p < 0.05$). Siendo el factor temperatura el que presentó mayor influencia, de acuerdo con el diagrama de Pareto obtenido (Figura 18). Por otro lado, la productividad total (Figura 19), solo se vio influenciada por la agitación.

El análisis de varianza realizado para la cepa API-1 mostró que los factores que tuvieron un efecto estadísticamente significativo en la productividad máxima fueron las interacciones temperatura-agitación y pH-agitación, así como los factores individuales temperatura y agitación. La interacción de factores: temperatura-agitación, así como cada uno de ellos de forma individual, ejercieron un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.05$) sobre la variable respuesta productividad total. Sin embargo, los respectivos diagramas de Pareto (Figura 18 y 19) indican que el factor que tuvo una mayor influencia sobre la productividad máxima fue la temperatura y la agitación, respectivamente.

El análisis de varianza realizado para los datos obtenidos con la cepa N1 indicó que los factores que tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la productividad máxima

fueron las interacciones temperatura-pH y temperatura-agitación, así como los factores individuales temperatura, pH y agitación. N1 Además el gráfico de Pareto (Figura 18) muestra que la temperatura y la agitación fueron los parámetros que tienen un mayor efecto sobre la productividad máxima

De acuerdo al diagrama de Pareto (Figura 18), el factor que presentó la mayor influencia sobre la productividad máxima fue la agitación para las cepas API-2 y L4B, mientras que para las cepas HY1, N1, API-1 y MG el principal factor que afecta esta respuesta fue la temperatura.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 16. Productividad máxima alcanzada en medio sintético por las cepas de levadura silvestres.

Trat	Temp (°C)	pH	Agitación (rpm)	P max (g/L.h)					
				HY1	L4B	MG	API-2	API-1	N1
1	30	4.5	0	0.872±0.017 ^b	0.743±0.007 ^b	0.615±0.014 ^c	0.582±0.018 ^a	0.557±0.003 ^c	0.574 ±0.030 ^{bc}
2	40	4.5	0	0.901±0.041 ^{bc}	0.940±0.005 ^c	0.405±0.008 ^a	0.800±0.017 ^b	0.349±0.012 ^a	0.809 ±0.011 ^d
3	30	5.5	0	0.551±0.009 ^a	0.446±0.019 ^a	0.539±0.031 ^b	1.081±0.037 ^d	0.456±0.011 ^b	0.360 ±0.029 ^a
4	40	5.5	0	0.950±0.018 ^{cd}	0.924±0.004 ^c	0.581±0.032 ^{bc}	0.914±0.024 ^c	0.332±0.006 ^a	0.552 ±0.032 ^b
5	30	4.5	250	0.551±0.013 ^a	1.093±0.013 ^d	0.884±0.025 ^d	1.08±0.025 ^d	0.673±0.030 ^d	0.519 ±0.035 ^b
6	40	4.5	250	1.153±0.028 ^f	1.232±0.083 ^e	0.401±0.019 ^a	1.204±0.043 ^e	0.391±0.02 ^a	1.624 ±0.049 ^e
7	30	5.5	250	0.980±0.031 ^d	0.780±0.026 ^b	0.608±0.007 ^c	1.03±0.010 ^d	0.728±0.018 ^e	0.632 ±0.009 ^c
8	40	5.5	250	1.083±0.026 ^e	1.098±0.051 ^d	0.439±0.018 ^a	1.025±0.070 ^d	0.312 ±0.002 ^a	0.816 ±0.051 ^d

*Letras diferentes en una misma columna indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (p < 0.05).

Tabla 17. Productividad total en medio YPG por las cepas de levadura silvestres.

Trat	Temp (°C)	pH	Agitación (rpm)	P total (g/L.h)					
				HY1	L4B	MG	API-2	API-1	N1
1	30	4.5	0	0.316±0.007 ^{bc}	0.343±0.029 ^c	0.315±0.021 ^c	0.367±0.010 ^d	0.346±0.009 ^d	0.363 ±0.002 ^d
2	40	4.5	0	0.421±0.011 ^e	0.327±0.010 ^c	0.405±0.008 ^d	0.394±0.001 ^e	0.349±0.012 ^d	0.359 ±0.037 ^d
3	30	5.5	0	0.379±0.003 ^{de}	0.359±0.003 ^c	0.367±0.018 ^d	0.431±0.011 ^f	0.346±0.006 ^d	0.360 ±0.029 ^d
4	40	5.5	0	0.339±0.021 ^{cd}	0.354±0.001 ^c	0.222±0.039 ^{ab}	0.352±0.002 ^d	0.332±0.006 ^{cd}	0.330 ±0.012 ^d
5	30	4.5	250	0.272±0.004 ^{ab}	0.276±0.009 ^b	0.232±0.012 ^{ab}	0.323±0.006 ^c	0.180±0.025 ^a	0.300 ±0.057 ^{cd}
6	40	4.5	250	0.237±0.046 ^a	0.188±0.007 ^a	0.258±0.003 ^b	0.227±0.007 ^a	0.295±0.030 ^b	0.185 ±0.017 ^a
7	30	5.5	250	0.247±0.026 ^a	0.281±0.009 ^b	0.208 ±0.010 ^a	0.299±0.016 ^b	0.184±0.019 ^a	0.226 ±0.017 ^{ab}
8	40	5.5	250	0.265±0.002 ^a	0.274±0.020 ^b	0.263±0.012 ^b	0.290±0.021 ^b	0.312±0.067 ^c	0.257 ±0.002 ^{bc}

*Letras diferentes en una misma columna indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (p < 0.05).

Diagrama de Pareto Estandarizado para Pmax

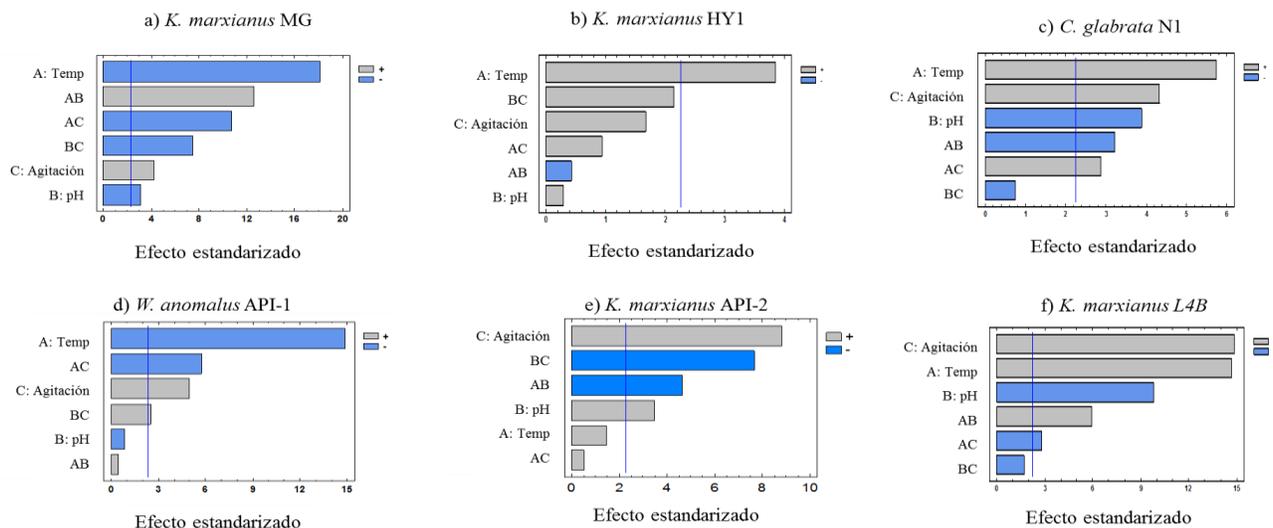


Figura 18. Diagrama de Pareto para la productividad máxima de las levaduras silvestres.

El diagrama de Pareto para productividad total (Figura 19) señala que el factor que tiene mayor influencia sobre esta respuesta para todas las levaduras estudiadas es la agitación.

Diagrama de Pareto Estandarizado para Ptotal

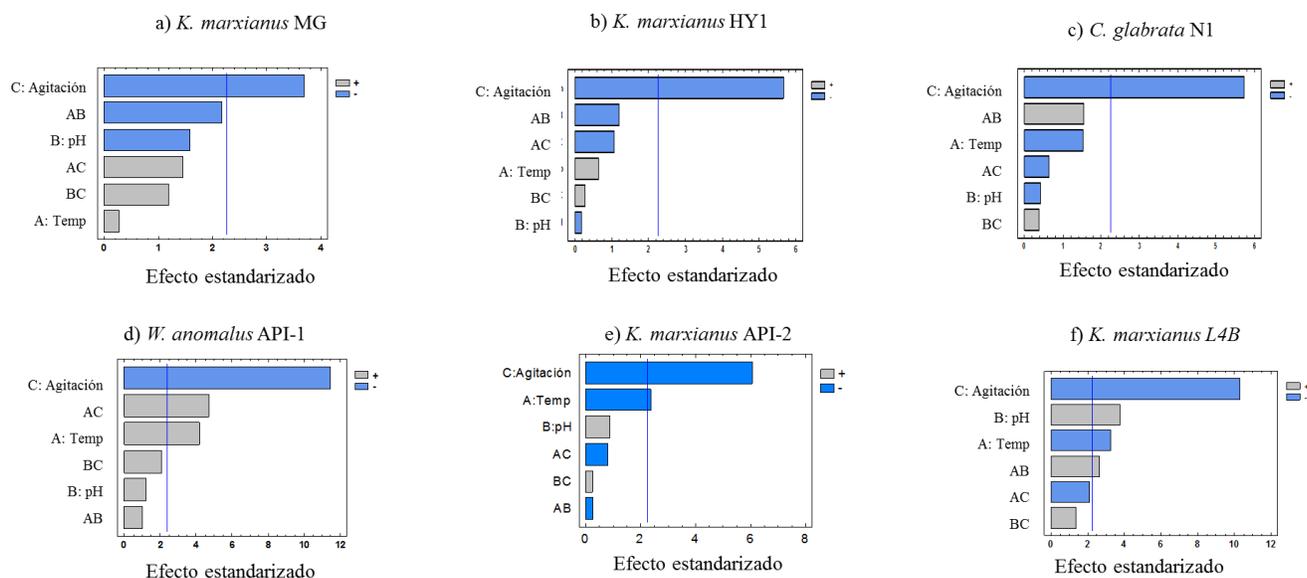


Figura 19. Diagrama de Pareto para productividad total de las levaduras silvestres.

8.4.1 Velocidad producción y velocidad de consumo de sustrato

Otro parámetro a considerar en la selección de cepas para la fermentación alcohólica es la velocidad con que la cepa de levadura produce el alcohol (r_p), así, se obtuvieron velocidades de producción comprendidas entre 0.267 g/L.h para la cepa MG en el tratamiento 1, hasta 0.801 g/L.h para la cepa HY1 al crecer a las condiciones de 30°C, pH 4.5, 250 rpm (Tabla 18). De igual forma, el parámetro que nos indica la velocidad con la que la levadura consume la glucosa del medio es el parámetro r_s , que varió entre 0.25 g/L.h para la cepa API-1 (tratamiento 6, 40°C, pH 4.5, 250 rpm) hasta el mayor valor obtenido con la cepa N1 (1.35 g/L.h), los resultados de este parámetro se presentan en la Tabla 19.

Las mayores velocidades de producción y de consumo obtenidas para la cepa L4B fueron 0.602 g/l.h y 1.232 g/l.h, respectivamente (Tabla 18 y Tabla 19), las cuales se obtuvieron al crecer a 30°C y 250 rpm. Para la cepa HY1 tanto la mayor velocidad de producción (0.802 g/l.h) como la de consumo (1.12 g/L.h) se obtuvieron en el tratamiento 5 (30°C, pH 4.5, 250 rpm). Con respecto a la cepa N1 la mayor velocidad de producción (0.755 g/L.h) se obtuvo con el tratamiento 2 (40°C, pH 4.5, 0 rpm) y la mayor velocidad de consumo de sustrato fue de 1.135 g/L.h, la cual se obtuvo al crecer la cepa bajo las condiciones del tratamiento 6 (Tabla 20). En relación a la cepa API-1 la mayor velocidad de producción fue de 0.836 g/L.h en el tratamiento 7 (30°C, pH 5.5, 250 rpm), mientras que la mayor velocidad de consumo fue de 0.778 g/L.h alcanzada en ese mismo tratamiento. Las mayores velocidades de producción y de consumo obtenidas para la cepa API-2 fueron 0.900 g/l.h y 0.985 g/l.h, respectivamente, alcanzados en los tratamientos 8 y 4. Finalmente, la cepa MG alcanzó una velocidad de producción entre 0.267 g/L.h y 0.466 g/L.h y la velocidad de consumo de azúcar fluctuó entre 0.327 g/L.h y 0.873 g/L.h (Tabla 18 y Tabla 19). Las velocidades o tasas de consumo de glucosa son similares a las reportadas por Zhao et al. (2008) para la cepa *Pachysolen tannophilus* 1771 creciendo en 20 g/L de glucosa que alcanzó en promedio 1.28 g/L.h

La velocidad de producción de la cepa N1 se vio afectada por los factores temperatura y agitación, lo anterior se concluyó después de realizar el análisis de varianza con un nivel de confianza del 95% (Anexo 1 h). De estos dos parámetros el que presentó mayor influencia fue

la temperatura (Figura 20). Con respecto a la velocidad de consumo (Anexo 1i), los factores que tienen un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.05$) sobre esta respuesta son, en orden de importancia, los siguientes: agitación, temperatura y la interacción entre ambos.

En tanto que para la cepa *K. marxianus* MG no se observó efecto estadístico de ningún factor (o sus interacciones) sobre la velocidad de producción (Anexo 1 h); mientras los factores individuales temperatura y agitación y su interacción presentaron un efecto estadísticamente significativo sobre la velocidad de consumo de sustrato (Figura 20 y Figura 21).

El análisis de varianza para la cepa *W. anomalus* API-1 realizado mostró que los factores que tienen un efecto estadísticamente significativo en la velocidad de producción (rp) fueron las interacciones temperatura-agitación y pH-agitación, así como los factores individuales temperatura y agitación.

El diagrama de Pareto (Figura 20) indica que la agitación fue el principal factor que influyó sobre la velocidad de producción de alcohol de las cepas *K. marxianus* HY1, MG, API-2 y L4B, para la cepa *C. glabrata* N1 el principal factor que tuvo efecto estadístico fue la temperatura, mientras que para la cepa *W. anomalus* API-1 fue la interacción Temperatura-Agitación. Por otro lado, el diagrama de Pareto para la velocidad de consumo de glucosa mostró que el factor agitación fue el que tuvo efecto en esta variable para las cepas HY1 y N1, mientras que la interacción temperatura-agitación influyó sobre esta respuesta en la cepa L4B, así como el factor individual temperatura influyó sobre la velocidad de consumo de las cepas MG y API-1 (Figura 21).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 18. Velocidad de producción de alcohol en medio YPG para las cepas de levadura silvestres.

Trat	Temp (°C)	pH	Agitacion (rpm)	rp (g/L.h)					
				HY1	L4B	MG	API-2	API-1	N1
1	30	4.5	0	0.405±0.029 ^{ab}	0.368±0.065 ^a	0.267±0.069 ^a	0.290±0.051 ^a	0.341±0.141 ^{ab}	0.339 ±0.039 ^a
2	40	4.5	0	0.762±0.017 ^{de}	0.428±0.014 ^{ab}	0.385±0.047 ^a	0.474±0.049 ^{abc}	0.399±0.069 ^{ab}	0.755 ±0.017 ^f
3	30	5.5	0	0.466±0.110 ^{abc}	0.579±0.197 ^b	0.329±0.072 ^a	0.432±0.044 ^{ab}	0.268±0.010 ^a	0.410 ±0.036 ^{ab}
4	40	5.5	0	0.393±0.119 ^a	0.460±0.064 ^{ab}	0.330±0.010 ^a	0.336±0.023 ^{ab}	0.329±0.030 ^{ab}	0.457 ±0.129 ^{abc}
5	30	4.5	250	0.802±0.024 ^e	0.488±0.034 ^{ab}	0.466±0.107 ^a	0.528±0.039 ^{bcd}	0.489±0.089 ^b	0.589 ±0.000 ^{cde}
6	40	4.5	250	0.596±0.158 ^{bcd}	0.586±0.049 ^b	0.305±0.038 ^a	0.688±0.024 ^d	0.263±0.052 ^{ab}	0.683 ±0.034 ^{ef}
7	30	5.5	250	0.670±0.074 ^{de}	0.602±0.012 ^b	0.318±0.141 ^a	0.616±0.030 ^{cd}	0.836±0.015 ^c	0.511 ±0.041 ^{bcd}
8	40	5.5	250	0.624±0.024 ^{cde}	0.555±0.030 ^b	0.301±0.148 ^a	0.900±0.012 ^e	0.363±0.027 ^{ab}	0.640 ±0.115 ^{def}

*Letras diferentes en una misma columna indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (p < 0.05).

Tabla 19. Velocidad de consumo de glucosa en medio YPG para las cepas de levadura silvestres.

Trat	Temp (°C)	pH	Agitacion (rpm)	rs (g/L.h)					
				HY1	L4B	MG	API-2	API-1	N1
1	30	4.5	0	0.958±0.032 ^{bc}	0.637±0.042 ^{ab}	0.544±0.001 ^{bc}	0.594±0.025 ^{ab}	0.334±0.012 ^a	0.279 ±0.001 ^a
2	40	4.5	0	0.661±0.016 ^a	0.731±0.072 ^{ab}	0.413±0.005 ^{ab}	0.518±0.052 ^a	0.300±0.025 ^a	0.398 ±0.100 ^a
3	30	5.5	0	0.946±0.075 ^{bc}	0.589±0.113 ^{ab}	0.549±0.396 ^{bc}	0.589±0.113 ^{ab}	0.416±0.120 ^a	0.367 ±0.108 ^a
4	40	5.5	0	0.909±0.068 ^b	0.888±0.025 ^{bc}	0.161±0.061 ^a	0.985±0.062 ^f	0.285±0.071 ^a	0.484 ±0.049 ^{ab}
5	30	4.5	250	1.122±0.021 ^d	1.232±0.092 ^d	1.130±0.112 ^d	0.777±0.084 ^{cd}	0.778±0.118 ^b	0.694 ±0.036 ^b
6	40	4.5	250	1.032±0.017 ^{cd}	0.452±0.003 ^a	0.377±0.004 ^{ab}	0.656±0.031 ^{bc}	0.252±0.064 ^a	1.135 ±0.007 ^c
7	30	5.5	250	0.993±0.062 ^{bc}	1.067±0.333 ^{cd}	0.873±0.013 ^{cd}	0.826±0.105 ^{de}	0.770±0.089 ^b	0.473 ±
8	40	5.5	250	0.877±0.063 ^b	0.454±0.051 ^a	0.327±0.059 ^{ab}	0.921±0.046 ^{ef}	0.286±0.051 ^a	1.111 ±

*Letras diferentes en una misma columna indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (p < 0.05).

Diagrama de Pareto Estandarizado para rP

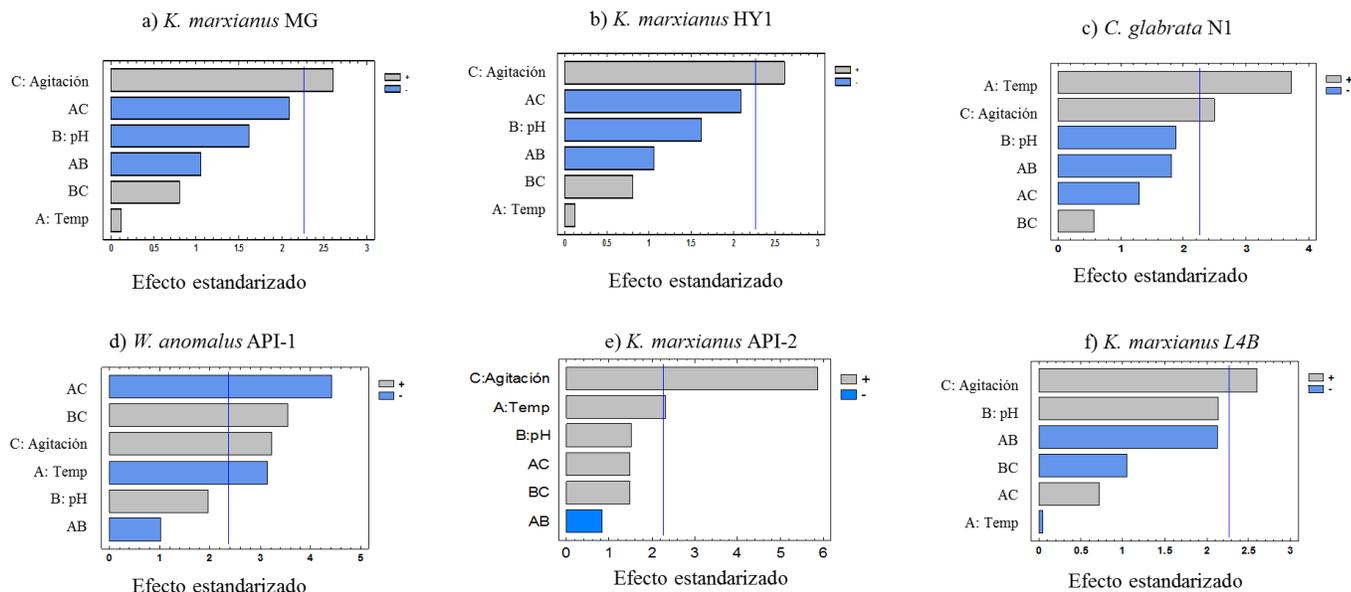


Figura 20. Diagrama de Pareto para la velocidad de producción de las cepas de levadura.

Diagrama de Pareto Estandarizado para rS

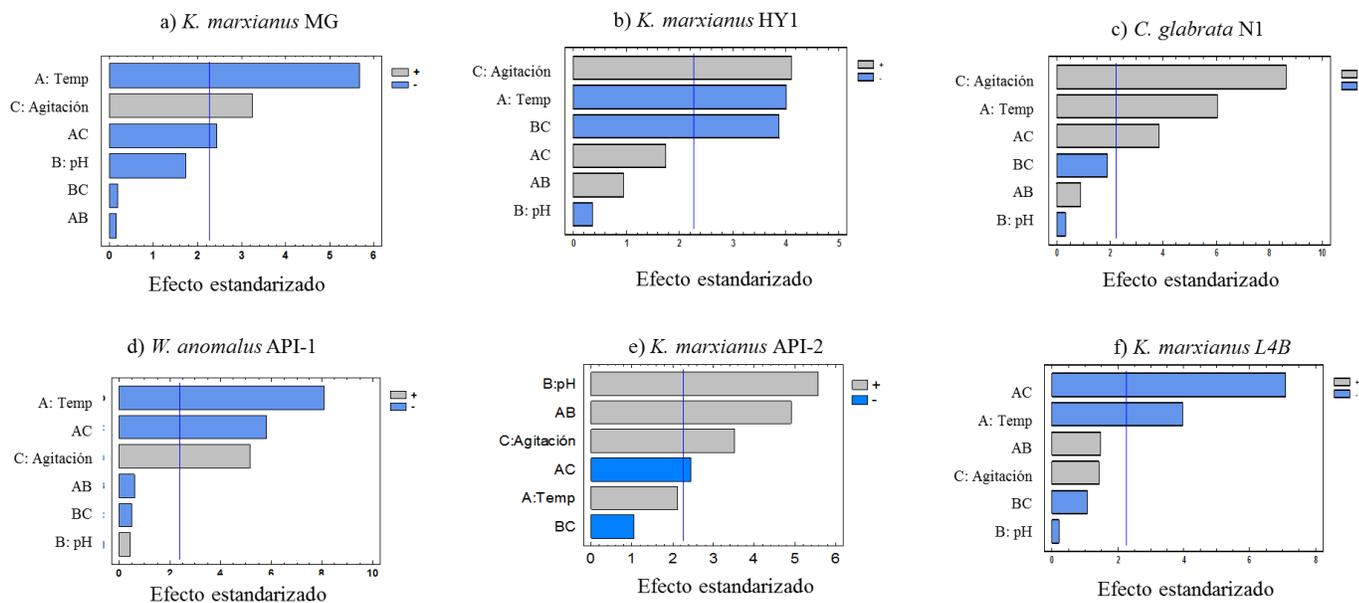


Figura 21. Diagrama de Pareto para la velocidad de consumo de diferentes cepas de levadura.

La influencia de la cepa de levadura utilizada en la cantidad de alcohol producida ha sido documentada por diversos autores (Rao *et al.*, 2008; Morán-Marroquín *et al.*, 2009; Díaz-Montaño, 2011; Segura-García *et al.*, 2011), lo cual coincide con lo encontrado en el presente trabajo. De igual forma, las condiciones de cultivo puede influir tanto en el crecimiento como en la fermentación alcohólica, a modo de ejemplo, la cepa de *Kluyveromyces* sp. IPE453, aislada de suelos con bagazo de caña durante el proceso de molienda requiere un pH de 5.0, 50°C y 150 rpm tanto para el crecimiento como para la fermentación de medios de cultivo con glucosa o xilosa (Kumar *et al.*, 2009).

Considerando lo anteriormente expuesto, se obtuvieron dos condiciones medioambientales que permiten obtener una cantidad considerable de alcohol para todas las cepas de levadura silvestres (Tabla 20): tratamiento 2 (40°C, pH 4.5 y 0 rpm) y tratamiento 1 (30°C, pH 4.5 y 0 rpm); aunque las cepas N1, API-2 y L4B también producen buenas cantidades de alcohol en condiciones de agitación (Tratamiento 6, 40°C, pH 4.5 y 250 rpm). Sin embargo, debido a que la reacción de producción de alcohol es exotérmica y dadas las condiciones ambientales de Yucatán, en las que se pueden alcanzar temperaturas ambiente de 40°C o más en los meses de primavera-verano, por practicidad se recomendaría emplear el tratamiento de 40°C, pH 4.5 y 0 rpm, pues alcanzar 30°C podría implicar un mayor gasto energético y económico al requerirse un sistema de enfriamiento en las tinas de fermentación.

Tabla 20. Mejores condiciones para la producción de alcohol en medio sintético para las levaduras silvestres

Cepas	Temperatura (°C)	pH	Agitación (rpm)	Tratamiento
MG, API-1, API-2, N1, HY1, L4B	40	4.5	0	2

Al evaluar las cepas en las mejores condiciones de crecimiento y fermentación para cada una de ellas se obtuvo que si existe diferencia significativa con un nivel de confianza del 95% entre las levaduras, la producción promedio de biomasa y etanol a las mejores

condiciones para cada cepa se presenta en la Tabla 21. Con respecto a la producción de biomasa, la cepa que produjo la mayor cantidad fue la cepa N1; mientras que para la producción de alcohol la mejor cepa fue la HY1, seguida de las cepas N1, MG y API-2 (Tabla 21), por lo que cualquiera de ellas podría utilizarse, siempre y cuando la fermentación se realice a las mejores condiciones para cada una de ellas.

Tabla 21. Prueba de rangos múltiples para la producción biomasa como peso seco y de alcohol a las mejores condiciones para cada cepa.

Method: 95.0 percent LSD

<i>Cepa</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Peso seco			
HY1	2	2.595	X
MG	2	2.77	XX
API-1	2	3.275	X
L4B	2	4.045	X
API-2	2	4.515	X
N1	2	7.005	X
Producción de alcohol			
API-1	2	7.93	X
L4B	2	8.665	XX
API-2	2	8.985	XX
MG	2	9.33	XX
N1	2	9.61	X
HY1	2	10.67	X

En todos los parámetros evaluados se vio una clara influencia de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento o fermentación, siendo particular para cada cepa el (o los) factor(es) o sus interacciones los que presentan un mayor efecto. Uno de los factores que mayor influencia presentó tanto las características de crecimiento como en la fermentación fue la agitación, habiéndose establecido las mejores condiciones de cultivo y producción alcohólica para cada una de las cepas evaluadas, mismas que se utilizaron en las etapas subsecuentes. Es importante conocer la cinética de crecimiento de los cultivos microbianos para pronosticar la evolución del cultivo, el consumo del substrato y la acumulación de metabolitos de interés.

CAPÍTULO III

8.5 Determinación de las condiciones medioambientales para el crecimiento de bacterias ruminales en medio de cultivo sintético

Se evaluaron diferentes condiciones de cultivo en medio celobiosa para las cuatro cepas de bacilos ruminales, variando factores como la temperatura (35 y 40°C) y el pH del medio (5, 6 y 7), mientras que la velocidad se mantuvo fija (100 rpm) en todos los tratamientos. A continuación se presentan los resultados obtenidos durante las cinéticas, que permitieron establecer las mejores condiciones medioambientales para su cultivo.

8.5.1 Cepa *Bacillus subtilis* Xer-15

La población de la cepa *B. subtilis* Xer-15 presentó distintos comportamientos al crecer bajo las diferentes condiciones medio-ambientales evaluadas, a manera de ejemplo en la Figura 22 se muestra la cinética correspondiente al crecimiento en medio celobiosa a 35°C y pH 7.0. Se pudo observar una fase lag con duración de 12h, seguida de la fase de crecimiento exponencial de las 12h hasta las 20h de cultivo y posteriormente la fase estacionaria de las 20h hasta las 32h. Con respecto al consumo de celobiosa, a partir de las 6 h de cultivo se observó la disminución de este sustrato en el medio, alcanzándose una concentración de aprox. 0.1 g/L a las 12h de cultivo, la cual permaneció constante hasta el término de la cinética. El mayor peso seco alcanzado con estas condiciones de cultivo (35°C y pH 7.0) fue de 0.43 g/L a las 20 h (0.36 g/L peso neto).

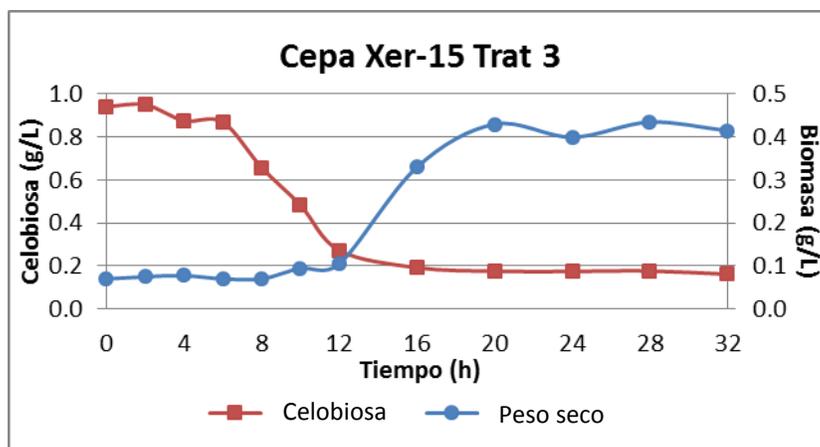


Figura 22. Cinética de crecimiento de la cepa Xer-15 en medio celobiosa, 35°C, pH 7.0.

En la Tabla 22 se presentan los parámetros cinéticos calculados para la cepa Xer-15 al crecer en diferentes condiciones de temperatura y pH del medio de cultivo. La mayor población obtenida para la cepa Xer-15 durante el crecimiento en medio celobiosa fue de $1,040 \times 10^6$ cel/ml, alcanzada a las 16 h de cultivo a 40°C y pH 6.0 (Tratamiento 5), que se correspondió con un peso seco de 2.15 g/L. Las velocidades de crecimiento se encontraron en el rango de 0.255 a 0.453 h^{-1} y los tiempos de duplicación estuvieron entre 1.53 y 2.90 h; con respecto al $Y_{x/s}$ y r_s los valores se encontraron entre el rango de 0.40 a $0.93 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{sustrato}}$ y de 0.12 a 0.71 g/L.h , respectivamente.

Tabla 22. Parámetros cinéticos de crecimiento obtenidos para la cepa *B. subtilis* Xer-15*

Trat	Temp (°C)	pH	$\Delta\text{Pob} \times 10^6$ (cel/ml)	ΔX (g/L)	μ_{max} (h^{-1})	Td (h)	$Y_{x/s}$	r_s (g/L.h)
1	35	5	435 ± 12^c	0.51 ± 0.02^c	0.467 ± 0.21	1.66 ± 0.75	0.45 ± 0.04	0.12 ± 0.03^d
2	35	6	649 ± 6^b	0.43 ± 0.13^c	0.231 ± 0.13	2.90 ± 1.98	0.40 ± 0.15	0.50 ± 0.003^c
3	35	7	661 ± 12^b	0.36 ± 0.02^c	0.293 ± 0.06	2.42 ± 0.53	0.44 ± 0.05	0.16 ± 0.02^d
4	40	5	341 ± 37^c	0.52 ± 0.05^c	0.258 ± 0.12	2.99 ± 1.36	0.46 ± 0.17	0.63 ± 0.04^b
5	40	6	1040 ± 79^a	2.15 ± 0.15^a	0.451 ± 0.12	1.59 ± 0.41	0.92 ± 0.31	0.71 ± 0.04^a
6	40	7	565 ± 38^b	0.94 ± 0.18^b	0.345 ± 0.14	2.19 ± 0.89	0.78 ± 0.49	0.18 ± 0.001^d

*Letras diferentes en una misma columna indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).

El análisis de varianza multifactorial realizado para la cepa *B. subtilis* Xer-15 (Anexo 1) mostró que la interacción de los factores temperatura-pH, así como cada uno de estos factores individuales evaluados, tuvieron efecto estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95% únicamente sobre las respuestas de ΔPob , ΔX y r_s , no siendo significativo su efecto sobre las demás respuestas estudiadas (μ_{max} , Td y $Y_{x/s}$).

En la Figura 23 se presentan los gráficos de interacción de los factores temperatura y pH para las respuestas sobre las que presentaron efecto estadísticamente significativo: población (Figura 23a), biomasa como peso seco (Figura 23b) y r_s (Figura 23c). Se puede observar que la mayor población para la cepa Xer-15 se obtuvo a 40°C y pH 5.0, mientras que la mayor cantidad de biomasa como peso seco y r_s se alcanzaron a 40°C y pH 6.

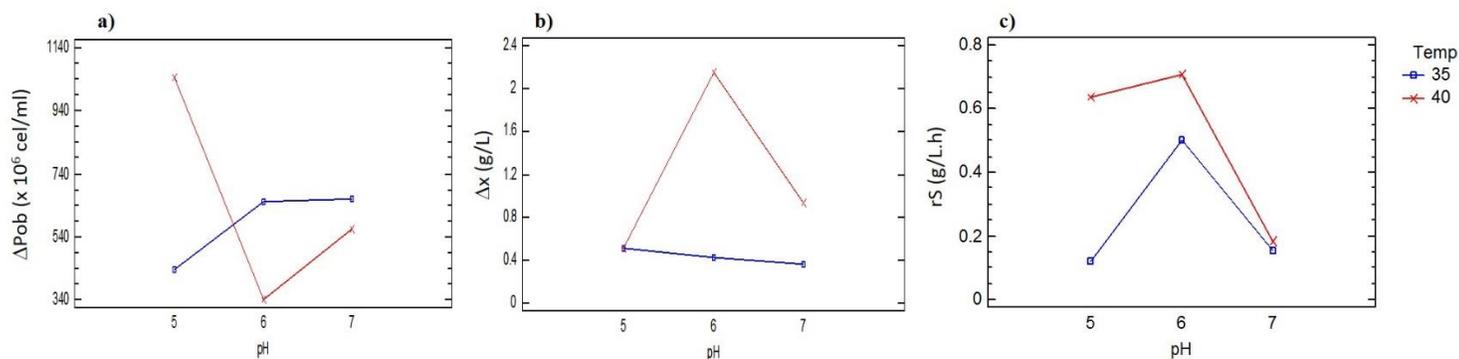


Figura 23. Gráfico de interacción para las respuestas: población (a), la biomasa (b) y r_s (c) de la cepa Xer-15.

Por lo anterior, para el crecimiento de la cepa *B. subtilis* Xer-15 en medio celobiosa se recomienda emplear 40°C y pH 6.0 (tratamiento 5), pues es con el que se obtuvo la mayor biomasa como peso seco y r_s , además de ser uno de los que favorecieron el obtener mayor $Y_{x/s}$ y μ_{max} , así como menor Td.

Las condiciones de cultivo establecidas para la cepa Xer-15 se encuentran dentro del rango de los valores reportados en general para *Bacillus subtilis*, que es un microorganismo que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza (incluyendo el rumen) y entre sus principales características cabe destacar su capacidad para formar esporas en diversas condiciones de estrés, crecer en un intervalo amplio de temperaturas (desde 15 hasta 55 °C) y a pH ligeramente ácido (5.6), presentar velocidades de crecimiento altas y producir una amplia variedad de enzimas hidrolíticas extracelulares (Nakamura et al., 1999).

8.5.2 Cepa *Bacillus subtilis* Xer-18

Durante el crecimiento de la cepa Xer-18 bajo diferentes condiciones de temperatura y pH se observaron curvas cinéticas típicas, para ilustrar lo anterior, en la Figura 24 se presenta la cinética de crecimiento a 40°C y pH 6.0, en la que se observa la fase de latencia que va de las 0 h a las 4 h de crecimiento, seguida de la fase exponencial de las 4 h a las 6 h y finalmente, la fase estacionaria con una duración de 8 h (de las 8 a 16 h de cultivo) y la fase de muerte de las 16 a las 24 h. En estas condiciones de cultivo se alcanzó un peso seco de 1.16 g/L a las 6 h, en este tiempo también se tiene aproximadamente la mitad del sustrato inicial (~0.5 g/L).

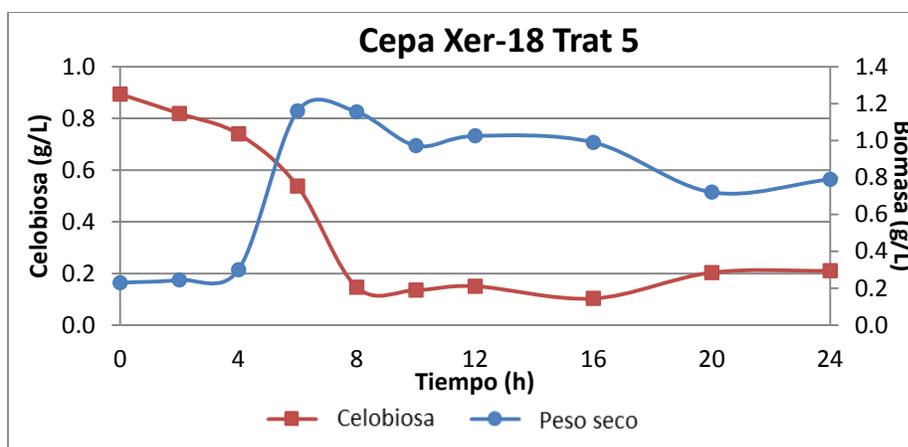


Figura 24. Cinética de crecimiento de la cepa Xer-18 a 40°C y pH 6.0, en medio celobiosa.

Empleando los valores de la biomasa obtenida y el consumo de la celobiosa del medio de cultivo se calcularon los parámetros cinéticos de crecimiento, cuyos promedios se presentan en la Tabla 23. La mayor población alcanzada para la cepa Xer-18 fue de 807×10^6 cel/ml al crecer a 40°C y pH 5, esta población se alcanzó a las 16 h de crecimiento. La μ_{max} se encontró entre 0.137 y 0.676 h^{-1} , y el rango del Td fluctuó entre 1.03 y 5.06 h, mientras que la velocidad de consumo del sustrato varió de 0.15 a 0.65 g/L.h, en dependencia de las condiciones ambientales empleadas.

Tabla 23. Parámetros cinéticos de crecimiento obtenidos para la cepa Xer-18*

Trat	Temp (°C)	pH	$\Delta\text{Pob} \times 10^6$ (cel/ml)	ΔX (g/L)	μ_{max} (h^{-1})	Td (h)	$Y_{x/s}$ (g/g)	r_s (g/L.h)
1	35	5	451 ± 21^c	1.65 ± 0.53	0.586 ± 0.38	1.18 ± 0.92	0.50 ± 0.27	0.15 ± 0.02^c
2	35	6	421 ± 38^c	0.46 ± 0.01	0.137 ± 0.02	5.06 ± 0.81	0.25 ± 0.003	0.44 ± 0.01^{ab}
3	35	7	639 ± 18^b	0.29 ± 0.0	0.289 ± 0.29	2.39 ± 0.28	0.38 ± 0.104	0.23 ± 0.07^{bc}
4	40	5	807 ± 89^a	1.08 ± 0.34	0.598 ± 0.07	1.16 ± 0.14	0.34 ± 0.09	0.57 ± 0.05^a
5	40	6	392 ± 24^c	0.93 ± 0.67	0.175 ± 0.03	3.96 ± 0.08	0.84 ± 0.39	0.65 ± 0.23^a
6	40	7	733 ± 56^{ab}	1.13 ± 0.03	0.271 ± 0.03	2.55 ± 0.28	0.73 ± 0.29	0.28 ± 0.03^{bc}

*Letras diferentes en una misma columna indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).

El análisis de varianza de dos vías realizado (Anexo 1) mostró que la interacción temperatura-pH, así como cada uno de estos factores individualmente, tuvieron efecto estadísticamente significativo únicamente sobre las respuestas ΔPob y r_s , con un nivel de confianza del 95%.

En la Figura 25 se muestra el gráfico de interacción de los factores temperatura y pH sobre las respuestas ΔP_{ob} (Figura 25a) y r_s (Figura 25b), de los que se desprende que se puede alcanzar la mayor población al crecer la cepa Xer-18 en medio celobiosa a 40°C y pH 5, y la mayor velocidad r_s al crecer a 40°C y pH 6.

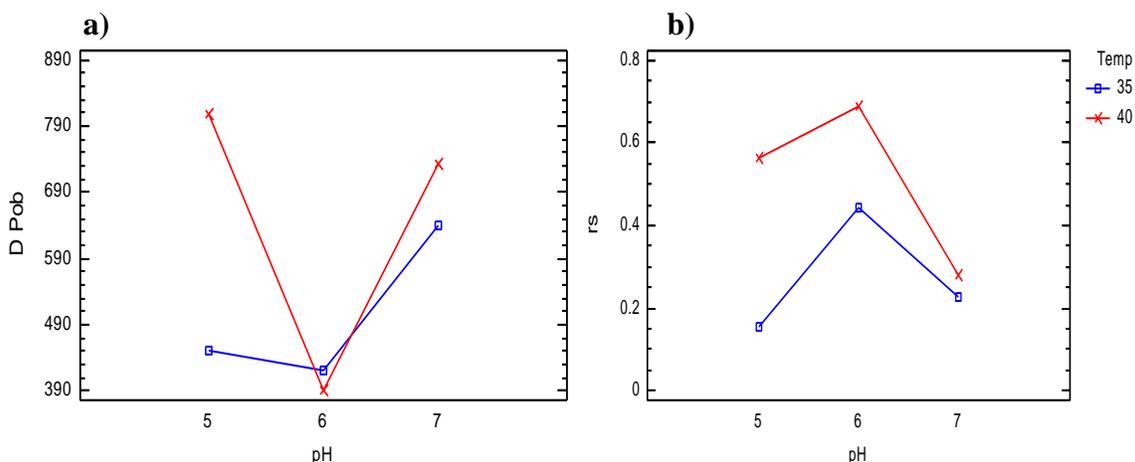


Figura 25. Gráfico de interacción para las respuestas: población (a) y r_s (b) para la cepa Xer-18.

Aun cuando la biomasa producida es uno de los principales parámetros que se desea maximizar durante el cultivo microbiano, con el diseño factorial realizado en este trabajo no se obtuvo diferencia estadísticamente significativa sobre esta respuesta ($\alpha > 0.05$), por lo que los factores pH, temperatura y su interacción no tuvieron efecto sobre la cantidad de biomasa obtenida, en los niveles evaluados en este trabajo. Al analizar los datos obtenidos mediante un diseño factorial simple, tomando como factor el tratamiento se obtuvo que existió diferencia estadísticamente significativa y se formaron 2 grupos homogéneos como se observa en el gráfico de medias (Figura 26), en donde el grupo formado por los tratamientos 1, 4, 5 y 6 fue el que presentó la mayor cantidad de biomasa. Para poder definir las condiciones más apropiadas para el crecimiento de la cepa *B. subtilis* Xer-18 también se consideraron los otros parámetros cinéticos calculados, es de notarse que el crecimiento de la cepa *B. subtilis* Xer-18 en medio celobiosa a 40°C y pH 5.0 permitió alcanzar los mayores valores de población, μ_{max} y r_s , así como el menor T_d , por lo que las condiciones anteriormente mencionadas se establecieron como las mejores para el crecimiento de ésta bacteria.

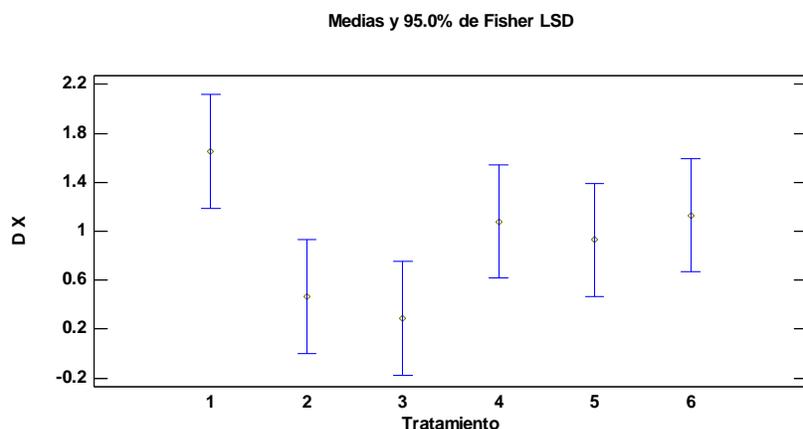


Figura 26. Gráfico de medias para la variable respuesta peso seco para la cepa Xer-18.

Las condiciones de cultivo más apropiadas para el crecimiento de la cepa *B. subtilis* Xer-18 (40°C y pH 5.0) fueron similares a las encontradas para *B. amyloliquefaciens* UNPDV-22 para la producción de celulasas en medio de cultivo adicionado de salvado de trigo y pasta de soya, a una temperatura de incubación de 44.24°C y pH de 5.25 (Vasudeo y Lew, 2011). El origen del aislamiento puede influir en las condiciones para su crecimiento, por ejemplo, en el rumen de los bovinos se tiene un ambiente con una temperatura estable entre 38 y 40°C y un pH de 5.5 a 7.0 (Kimura et al., 2012) por lo que se esperaría un mejor crecimiento en este rango de condiciones, y aunque el crecimiento del género *Bacillus* se asocia a pHs neutros, también se ha reportado su capacidad de adaptación a pH bajo (Calvo y Zuñiga, 2010), como en el caso de esta cepa.

8.5.3 Cepa *Bacillus* sp. Xer-19

La cepa *Bacillus* sp. Xer-19 creció bien en medio de cultivo con celobiosa como fuente de carbono, alcanzando hasta 2.41 g/L de biomasa al crecer a pH 5 y 35°C (12h de cultivo). A modo de ejemplo, se presenta la cinética de crecimiento obtenida en el tratamiento 4, con condiciones de 40°C y pH 5.0 (Figura 27). En ésta figura, se aprecia una fase lag de 6 horas de duración y un crecimiento exponencial de las 6 a las 12 h (alcanzando 1.53 g/L a las 12h), posteriormente se observó un descenso drástico en el peso seco que se mantiene constante hasta las 24h de cultivo. Este comportamiento también ha sido observado por Amore et al. (2013) en la medición de la densidad óptica (600 nm) durante el cultivo de *B. amyloliquefaciens* B31C porque los productos de desecho que han liberado durante la fase

exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano y la capacidad de multiplicación (crecimiento) de un microorganismo puede verse transitoriamente afectada por lesiones o por las condiciones físicas o químicas del entorno. La cantidad de celobiosa en el medio fue disminuyendo gradualmente desde el tiempo inicial y hasta las 8h, posteriormente la cantidad de este sustrato permaneció constante hasta las 24 h (aproximadamente 0.1 g/L).

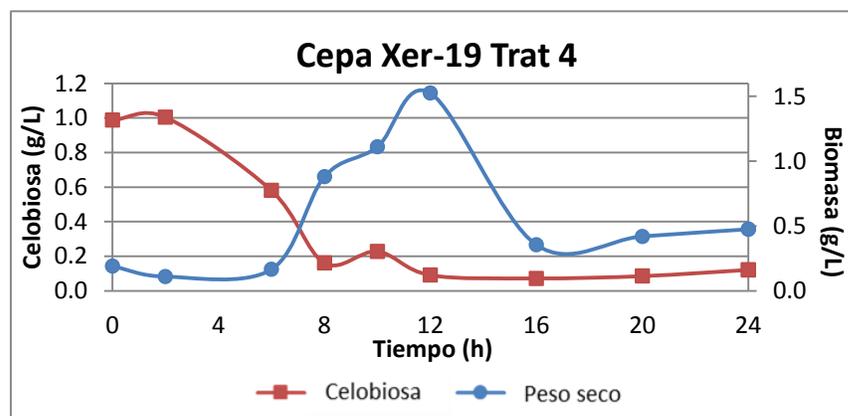


Figura 27. Cinética de crecimiento de la cepa Xer-19 en cultivo en medio celobiosa a 40°C y pH 5.0.

Los parámetros cinéticos promedio calculados para la cepa *Bacillus* sp. Xer-19 en los diferentes tratamientos realizados se presentan en la Tabla 24. La mayor población se alcanzó al crecer a 40°C y pH 7 (Tratamiento 6), obteniéndose 785×10^6 cel/ml, de igual forma, en estas condiciones de cultivo el rendimiento de biomasa en base a sustrato fue de 0.99 g/g. Por otro lado, la mayor μ_{max} para la cepa Xer-19 fue de 0.828 h^{-1} y el menor Td fue de 0.84 h y se obtuvieron en las condiciones de 40°C y pH 5 (tratamiento 4).

Tabla 24. Parámetros cinéticos de crecimiento para la cepa Xer-19 en medio de cultivo celobiosa*

Trat	Temp (°C)	pH	$\Delta\text{Pob} \times 10^6$ (cel/ml)	ΔX (g/L)	μ_{max} (h^{-1})	Td (h)	$Y_{x/s}$	r_s (g/L.h)
1	35	5	348 ± 51^c	2.41 ± 0.34^a	0.812 ± 0.26	0.89 ± 0.28	0.34 ± 0.03	0.11 ± 0.01^e
2	35	6	667 ± 41^b	0.60 ± 0.01^{cd}	0.776 ± 0.17	0.92 ± 0.20	0.63 ± 0.06	0.48 ± 0.05^c
3	35	7	666 ± 39^b	0.33 ± 0.01^d	0.722 ± 0.24	1.02 ± 0.34	0.41 ± 0.10	0.31 ± 0.07^d
4	40	5	379 ± 21^c	1.34 ± 0.22^b	0.828 ± 0.08	0.84 ± 0.08	0.33 ± 0.01	0.64 ± 0.01^b
5	40	6	313 ± 42^c	1.16 ± 0.09^{bc}	0.358 ± 0.11	2.05 ± 0.63	0.27 ± 0.03	0.79 ± 0.02^a
6	40	7	785 ± 20^a	1.54 ± 0.41^b	0.503 ± 0.03	1.38 ± 0.09	0.99 ± 0.06	0.48 ± 0.02^c

*Letras diferentes en una misma columna indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).

El análisis de varianza (Anexo 1) realizado permitió identificar que tanto los factores temperatura y pH, así como su interacción, presentaron efecto estadísticamente significativo sobre las respuestas de ΔP_{ob} y r_s , con un nivel de significancia del 95%. Mientras que la interacción de factores temperatura y pH, así como el factor individual pH tuvieron efecto estadísticamente significativo sobre la variable respuesta Δx . En la Figura 28 se presenta el gráfico de interacción para éstas respuestas, se puede observar que la mayor población para la cepa Xer-19 se obtuvo al utilizar el mayor pH y temperatura (7 y 40°C, Figura 28a). Por otro lado las condiciones de pH 5 y 35°C (Figura 28b) permitieron obtener la mayor biomasa, mientras que la mayor r_s implicó crecer la bacteria ruminal a 40°C y pH 6 (Figura 28c).

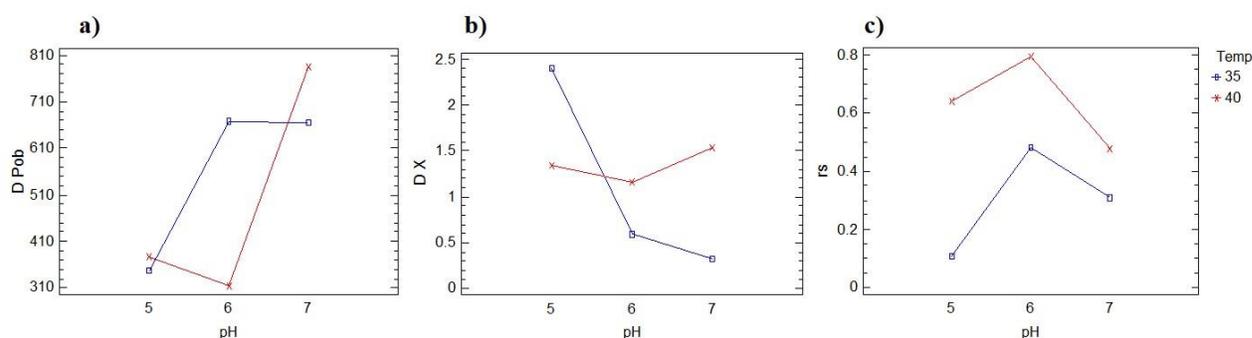


Figura 28. Gráfico de interacción para las respuestas: población (a), ΔX (b) y r_s (c) para la cepa Xer-19.

Teniendo en cuenta lo anterior, las condiciones de cultivo más apropiadas para el crecimiento de la cepa Xer-19 en medio con celobiosa resultaron ser 35°C y pH 5 (tratamiento 1).

8.5.4 Cepa *Bacillus subtilis* Xer-28

Las cinéticas de crecimiento de la bacteria *B. subtilis* Xer-28 a diferentes condiciones de pH y temperatura en medio celobiosa mostraron un comportamiento típico, para ejemplificar esto, en la Figura 29 se presentan las variaciones en el peso seco y en el consumo de celobiosa al crecer a 40°C y pH 6.0. Se observa la fase lag de las 0 a las 6 h, la fase logarítmica de las 6 a las 12 h (6 h de duración) y la fase de muerte a partir de las 12 h. Es de destacar que el mayor peso seco para la cepa Xer-28 se obtuvo en el tratamiento ilustrado, alcanzándose 2.26 g/L a las 12 h de cultivo.

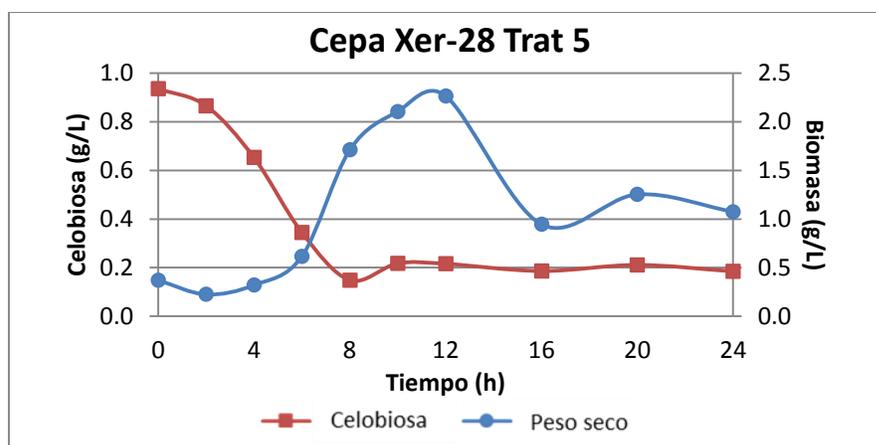


Figura 29. Cinética de crecimiento de la cepa Xer-28 en medio celobiosa a 40°C y pH 6.0 (tratamiento 5).

Los promedios de los parámetros cinéticos calculados se presentan en la Tabla 25. La mayor población alcanzada por esta bacteria fue de 694×10^6 cel/ml a las 20 h, durante su crecimiento a 40 °C y pH 7 (Tratamiento 6); la mayor μ_{max} fue de 0.766 h^{-1} al crecer a 35 °C y pH 5 (que se correspondió con el menor tiempo de duplicación, 0.90 h), finalmente, el mayor $y_{x/s}$ fue de $0.94 \text{ g}_{biomasa}/\text{g}_{sustrato}$ al crecer a 40°C y pH 6 (Tratamiento 5); mientras que la mayor r_s obtenida fue de 0.61 g/L.h al crecer en medio con celobiosa a 40°C y pH 5.0 (Tratamiento 4).

Tabla 25. Parámetros cinéticos de crecimiento para la cepa Xer-28 en medio de cultivo celobiosa*

Trat	Temp (°C)	pH	$\Delta\text{Pob} \times 10^6$ (cel/ml)	ΔX (g/L)	μ_{max} (h^{-1})	Td (h)	$Y_{x/s}$	r_s (g/L.h)
1	35	5	580 ± 56^b	1.67 ± 0.44^a	0.773 ± 0.07	0.90 ± 0.08	0.53 ± 0.07	0.13 ± 0.01^c
2	35	6	664 ± 52^{ab}	0.61 ± 0.03^b	0.262 ± 0.12	3.76 ± 0.23	0.30 ± 0.07	0.50 ± 0.06^a
3	35	7	602 ± 18^{ab}	0.24 ± 0.04^b	0.772 ± 0.25	0.95 ± 0.31	0.38 ± 0.08	0.23 ± 0.07^{bc}
4	40	5	304 ± 4^c	1.30 ± 0.34^a	0.444 ± 0.13	1.64 ± 0.46	0.42 ± 0.18	0.61 ± 0.08^a
5	40	6	324 ± 54^c	1.90 ± 0.21^a	0.578 ± 0.31	1.39 ± 0.74	0.94 ± 0.37	0.43 ± 0.24^{ab}
6	40	7	694 ± 29^a	0.57 ± 0.29^b	0.677 ± 0.20	1.07 ± 0.32	0.63 ± 0.01	0.18 ± 0.02^{bc}

*Letras diferentes en una misma columna indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).

El análisis de varianza de dos vías efectuado con los datos obtenidos (Anexo 1) permitió identificar que tanto la interacción de los factores temperatura-pH como cada uno de los factores individuales, tuvieron efecto estadísticamente significativo sobre los parámetros

de ΔP_{ob} , ΔX y r_s ($p < 0.05$). En la Figura 30 se muestran las interacciones correspondientes a éste análisis, encontrándose que la mayor población se alcanzó al crecer a la bacteria Xer-28 a 40°C y pH 7 (Figura 30a), el mayor peso seco se obtuvo con el nivel más alto de temperatura y el nivel intermedio de pH (40°C, pH 6, Figura 30b) y, finalmente, la mayor velocidad de consumo de sustrato se logra en las condiciones de 40°C y pH 5 (nivel alto de temperatura y nivel bajo de pH, ver Figura 30c).

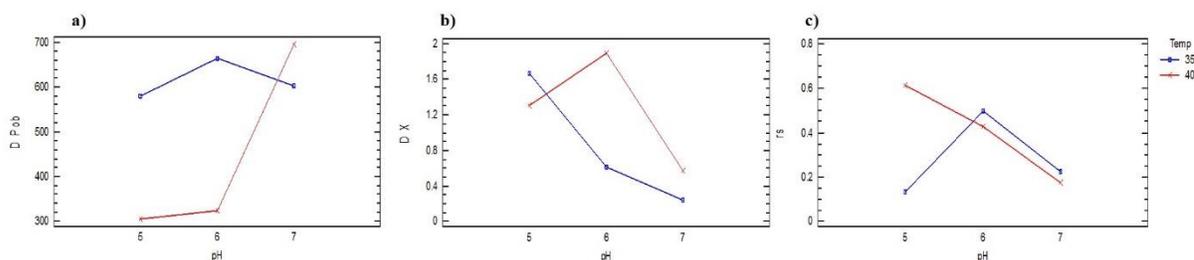


Figura 30. Gráfico de interacción para las respuestas: población (a), ΔX (b) y r_s (c) para la cepa Xer-28.

Para la cepa *B. subtilis* Xer-28 se tuvieron dos condiciones para su crecimiento en celobiosa, mismas que fueron iguales estadísticamente, las condiciones fueron: 40°C y pH 6.0, así como 35°C y pH 5.0. Las cepas del género *Bacillus* son metabólicamente diversas y con una gran capacidad de adaptación, lo que les permite tener una colonización exitosa en diferentes ambientes como el ruminal (Calvo y Zuñiga, 2010).

En la Tabla 26 se presentan las mejores condiciones medioambientales que permitieron alcanzar el mayor crecimiento para las bacterias ruminales en estudio, destacando que para cada una de ellas se tienen diferentes condiciones medioambientales, exceptuando *B. subtilis* Xer-18 y Xer-28. Dichas condiciones se utilizaron en la caracterización de la producción de glicosilhidrolasas en diferentes polisacáridos. Estas condiciones de crecimiento tienen importancia porque la producción de celulasas depende de diversas variables del proceso como pH, temperatura, fuentes de carbono y nitrógeno, concentración de sustrato, cantidad de inóculo y aereación, adicionalmente la reducción de los costos de producción enzimática puede lograrse a través del empleo de medios de cultivo adecuados y de la manipulación de las condiciones de fermentación (Vasudeo y Lew, 2011).

Tabla 26. Mejores condiciones de crecimiento para las bacterias ruminales en medio de cultivo celobiosa

Cepa	Trat	pH	Temperatura (°C)	ΔX (g/L)	μ_{max} (h ⁻¹)
<i>B. subtilis</i> Xer-15	5	6.0	40	2.15 ± 0.15	0.451±0.12
<i>B. subtilis</i> Xer-18	4	5.0	40	1.08 ± 0.34	0.598±0.07
<i>B. subtilis</i> Xer-28	5	6.0	40	1.90 ± 0.21	0.578±0.31
<i>Bacillus</i> sp. Xer-19	1	5.0	35	2.41 ± 0.34	0.812±0.26

Aun cuando la finalidad de este capítulo fue el establecimiento de las mejores condiciones de cultivo de las bacterias ruminales, de la Tabla 26 se puede observar que la cepa que alcanzó la mayor cantidad de biomasa y la mayor velocidad máxima de crecimiento fue *Bacillus* sp. Xer-19. Las velocidades de crecimiento de las cepas *B. subtilis* Xer-18 y Xer-28 a sus mejores condiciones de crecimiento son similares a las encontradas para *B. subtilis* 168 (0.6 h⁻¹) al crecer en 4g/L de glucosa (Goel et al., 1993). Sin embargo, ninguna de bacterias estudiadas alcanzó la velocidad de crecimiento reportada para la cepa *B. subtilis* BSR6 al crecer en cultivos aerobicos en medio de cultivo con 4g/L de glucosa, a pH 7.0, 37°C y 300 rpm, en las que se obtuvieron 1.41h⁻¹ (Espinosa-de-los-Monteros et al., 2001); ésta diferencia pudo ser ocasionada por la fuente de carbono utilizada pues la glucosa es metabolizada más fácilmente que la celobiosa que requiere ruptura previa del enlace β que une las dos moléculas de glucosa para poder atravesar la membrana plasmática del microorganismo.

Está bien documentado que varios parámetros del proceso como tiempo de incubación, temperatura, pH y agitación influyen sobre el crecimiento microbiano y por tanto, en la producción de celulasas, una selección cuidadosa de estos parámetros puede mejorar dramáticamente el rendimiento de las enzimas (Sreedevi et al., 2013). A modo de ejemplo de la influencia de los parámetros de cultivo, se ha observado el efecto de la temperatura de crecimiento sobre la producción de actividad celulasa para la cepa *B. amyloliquefaciens* B31C cultivándolo a 28, 37 y 47°C, tanto el crecimiento de esta cepa como los niveles de actividad se incrementaron conforme aumentó la temperatura. Ray et al. (2007) reportaron que el menor crecimiento y menor rendimiento de celulasa para *B. subtilis* y *Bacillus circulans* se

observaron cuando la fermentación se realice a 45 °C, mientras que el máximo nivel se obtuvo a 40°C, en otras palabras cada cepa tiene diferentes condiciones para alcanzar su mayor crecimiento. A escala industrial se requiere un entendimiento y un control adecuado de los parámetros de crecimiento para incrementar la producción de enzimas. Por otro lado, la naturaleza termofílica de estas bacterias ruminales (crecimiento a 40°C) hace que su uso a nivel industrial sea menos propenso a la contaminación, asimismo, se reduce el costo del enfriamiento, por lo que se facilitaría su empleo en la hidrólisis de biomasa lignocelulósica en climas tropicales.

CAPÍTULO IV

8.6 Obtención del perfil de asimilación y fermentación de mono y disacáridos de las levaduras silvestres en medio sintético*8.6.1 Perfil preliminar*

A continuación se presenta el perfil preliminar de asimilación de fuentes de carbono de las levaduras silvestres evaluadas, en la que se incluyeron mono- (de 5 y 6 carbonos) y disacáridos reportados en la literatura como presentes en las cáscaras de cítricos. La prueba se realizó a las mejores condiciones para el crecimiento de cada cepa (obtenidas en la etapa anterior) en medio YNB.

a) Cepas *K. marxianus* HY1, L4B, MG y API-2

La levadura HY1 mostró preferencia para la asimilación de sacarosa, seguida de galactosa, glucosa, fructosa y manosa (Figura 31a). La levadura L4B presentó capacidad de asimilar las siguientes fuentes de carbono, en orden de preferencia: sacarosa, galactosa, fructosa, glucosa, manosa y xilosa (Figura 31b), mientras que la arabinosa y rhamnosa no fueron utilizadas para el crecimiento por esta cepa. La cepa MG tuvo una clara preferencia por la sacarosa, además también asimila glucosa, rhamnosa, galactosa, xilosa y fructosa (Figura 31c), aunque cabe destacar que su crecimiento fue menor que las otras cepas (menor D.O.₅₄₀). La levadura API-2 asimiló principalmente sacarosa, galactosa, fructosa, glucosa y manosa (Figura 31d); la arabinosa y rhamnosa no fueron asimiladas por esta levadura.

El análisis de varianza simple realizado para las cepas HY1, L4B, MG y API-2 indicó que existe diferencia estadísticamente significativa en la densidad óptica (D.O.₅₄₀) ocasionada por el carbohidrato añadido como sustrato al medio de cultivo.

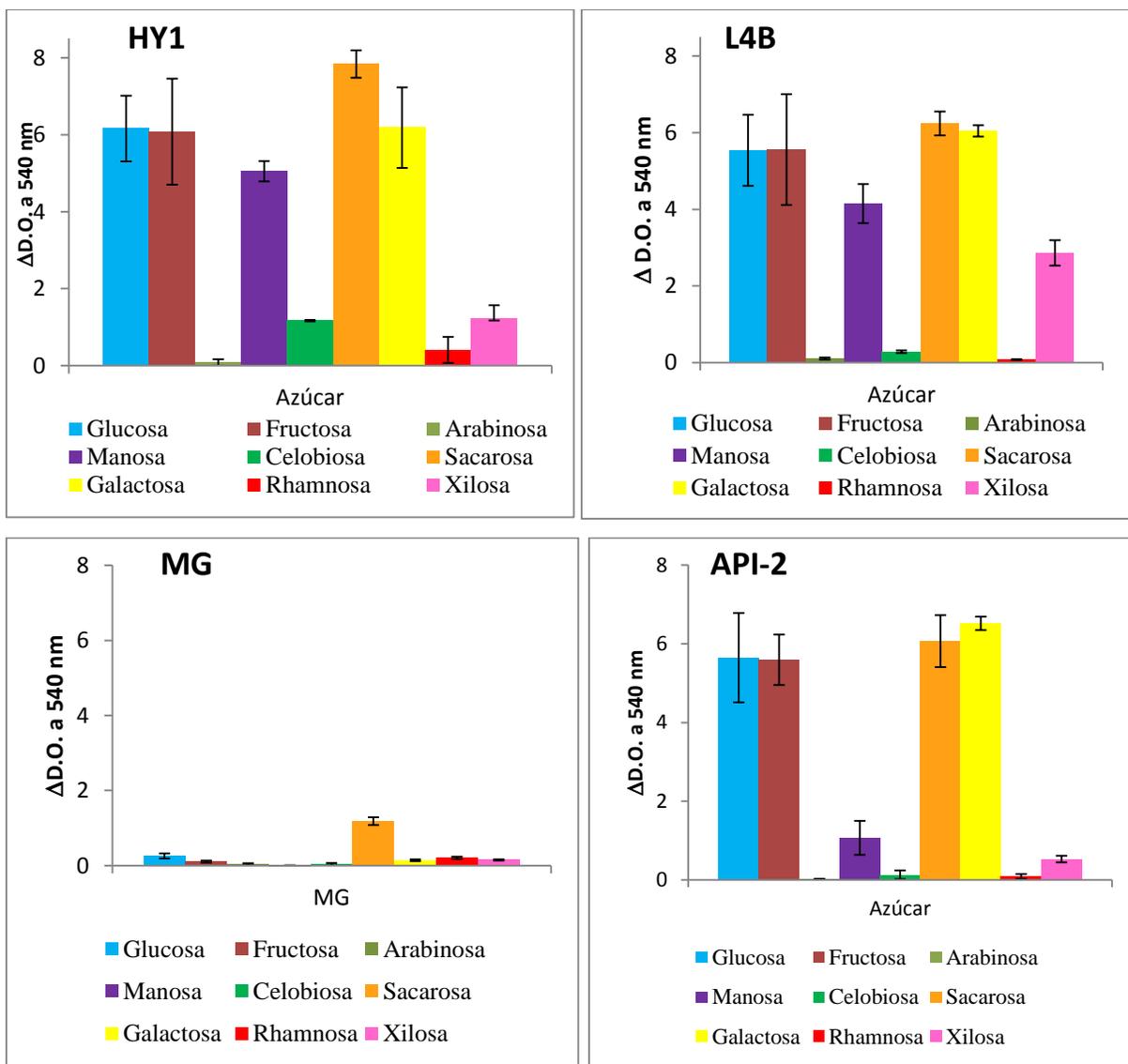


Figura 31. Perfil preliminar de asimilación de fuentes de carbono de las levaduras HY1, L4B, MG y API-2.

En la Figura 32a se presenta el gráfico de medias para los distintos azúcares evaluados para la cepa HY1, se observa que la arabinosa y rhamnosa fueron escasamente utilizados por esta cepa. Además, para la cepa HY1 la fructosa, galactosa, glucosa y manosa permitieron obtener una densidad óptica similar. Para la cepa L4B, se observó que la arabinosa, rhamnosa y celobiosia prácticamente no fueron asimiladas por este microorganismo (Figura 32b), mientras que la xilosa ocasionó una menor densidad óptica que la fructosa, galactosa, glucosa, manosa y sacarosa. Por otro lado, la manosa no fue utilizada por la cepa MG (Figura 32c), de igual forma la arabinosa y celobiosia fueron escasamente asimiladas, pues no se aprecia un

incremento notable en la densidad óptica. Finalmente, para la cepa API-2, se observó que la arabinosa, rhamnosa, xilosa y celobiosa fueron escasamente utilizadas por esta levadura (Figura 32d). Aun cuando estas cuatro cepas fueron identificadas como *K. marxianus*, en esta prueba se pudo observar que asimilan distintas fuentes de carbon, lo que actualmente se conoce es que las cinéticas de crecimiento y consumo de azúcares dependen cuali y cuantitativamente de la especie de levadura, de la disponibilidad de oxígeno y de otros parámetros ambientales entre los que se pueden mencionar temperatura, pH, composición del medio y presencia de metabolitos no acoplados (Fonseca et al., 2013).

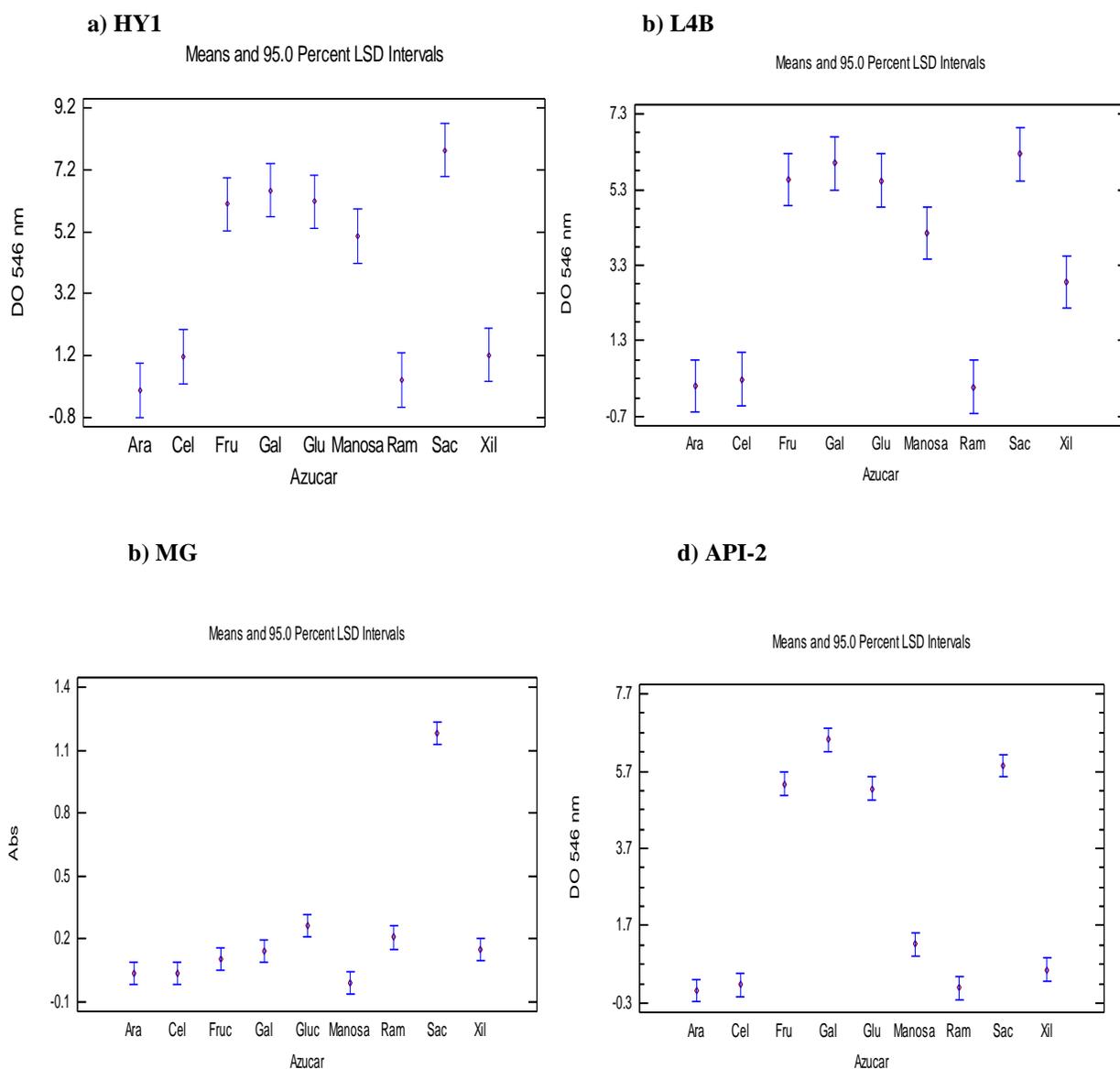


Figura 32. Gráfico de medias para el cambio de densidad óptica de las cepas HY1, L4B, MG y API-2 en distinta fuente de carbono.

El aprovechamiento de lactosa (disacárido constituido por glucosa y galactosa) por cepas de *Kluyveromyces* ha sido previamente reportado (Silveira et al., 2005; Rodrussamee et al., 2011) y aprovechado para la obtención de etanol a partir de suero de leche. Por otro lado, el aprovechamiento de manosa que presentan las cepas HY1 y L4B podría ser útil para la fermentación de hemicelulosa, pues este monosacárido es uno de sus principales componentes.

b) Cepa *C. glabrata* N1

La levadura *C. glabrata* N1 tuvo preferencia por la asimilación fructosa, seguida de glucosa, manosa y, en menor medida, sacarosa (Figura 33). La xilosa no fue utilizada por esta levadura para el crecimiento medido como cambio en densidad óptica. El análisis de varianza simple realizado demostró que en dependencia de la fuente de carbono añadida al medio de cultivo es el crecimiento bacteriano medido por la densidad óptica alcanzada.

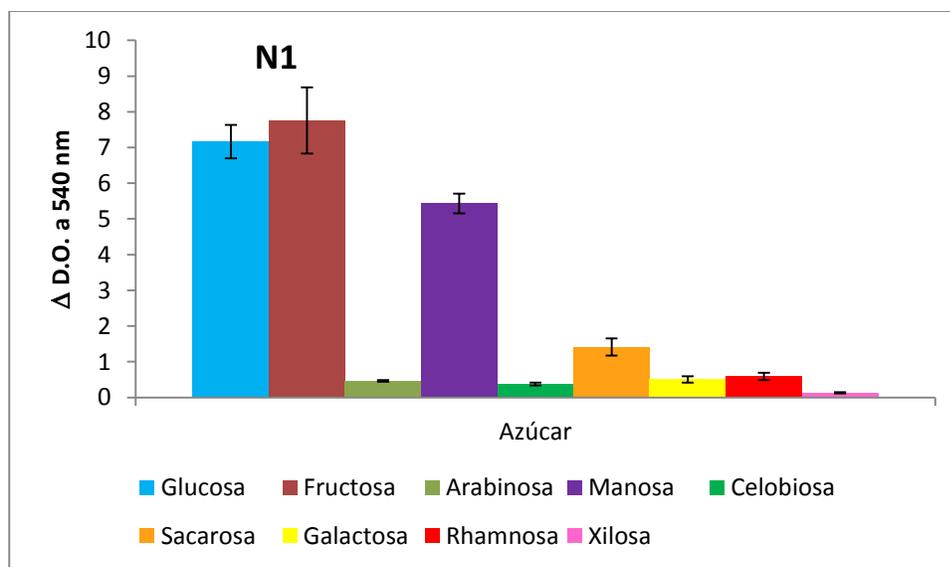


Figura 33. Perfil de asimilación de fuentes de carbono de la levadura N1.

En la Figura 34 se presenta el gráfico de medias para los distintos azúcares evaluados para la cepa N1, se observó que la arabinosa, rhamnosa, xilosa, galactosa y celobiosa fueron

escasamente utilizadas por esta cepa. Los azúcares con mayor preferencia para el crecimiento de la cepa N1 fueron fructosa, glucosa y manosa.

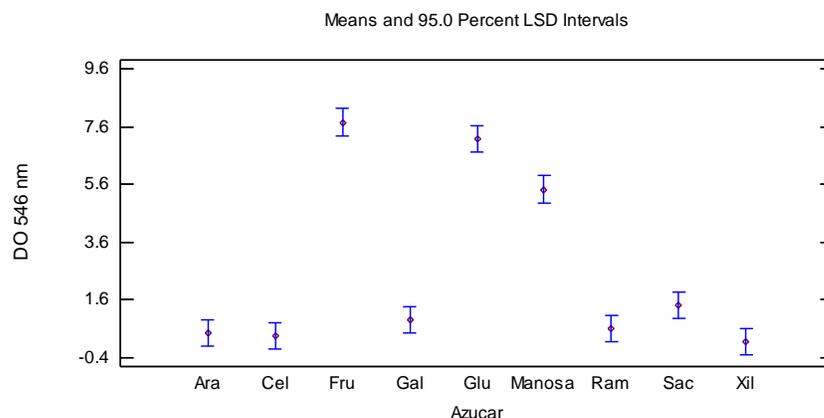


Figura 34. Gráfico de medias para el cambio de densidad óptica de la cepa N1 en distinta fuente de carbono.

c) Cepa *W. anomalous* API-1

La levadura *W. anomalous* API-1 asimiló mayoritariamente fructosa, seguida de glucosa y manosa (Figura 35). La arabinosa y rhamnosa no fueron utilizadas por esta levadura para el crecimiento. El análisis de varianza simple realizado indica que en dependencia de la fuente de carbono añadida al medio de cultivo es el crecimiento bacteriano medido por la densidad óptica alcanzada.

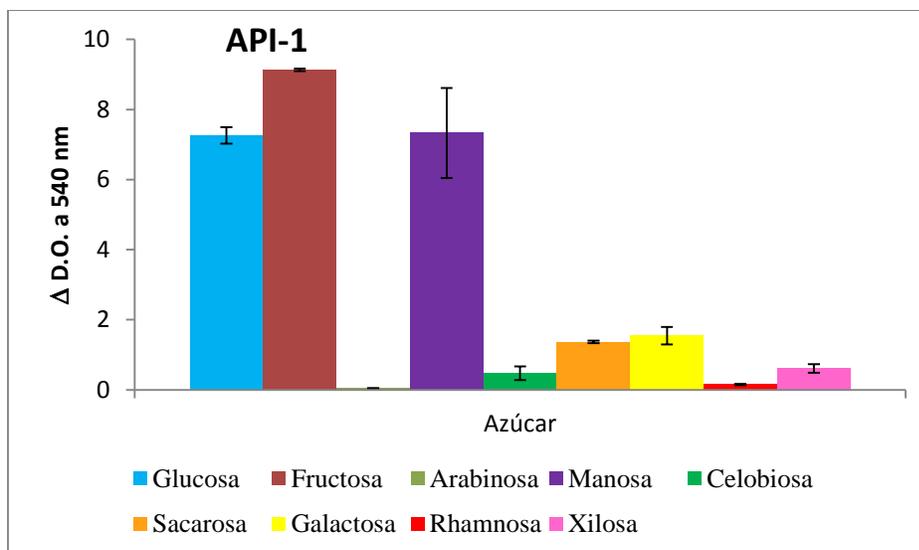


Figura 35. Perfil de asimilación de fuentes de carbono de la levadura API-1.

En la Figura 36 se presenta el gráfico de medias para los distintos azúcares evaluados para el crecimiento de la cepa API-1, se observa que la arabinosa, rhamnosa, xilosa y celobiosa fueron escasamente utilizadas por esta cepa, que presentó preferencia por la fructosa.

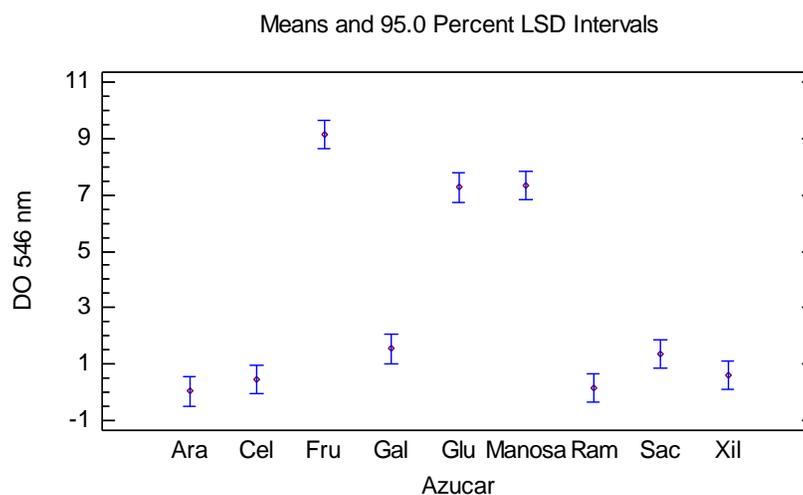


Figura 36. Gráfico de medias para el cambio de densidad óptica de la cepa API-1 en distinta fuente de carbono.

En la Tabla 27 se resume el nivel de preferencia de las diferentes levaduras silvestres, establecido con respecto al promedio de densidad óptica arrojado por la prueba de rangos múltiples (grupos homogéneos).

Tabla 27. Nivel de preferencia de las fuentes de azúcar por las diferentes levaduras silvestres, basados en los promedios de densidad óptica.

Azúcar	Nivel preferencia					
	MG	HY1	N1	API-1	API-2	L4B
Glucosa	2 ^b	3 ^{ab}	2 ^a	3 ^b	4 ^b	4 ^{ab}
Fructosa	6 ^{cde}	4 ^b	1 ^a	1 ^a	3 ^b	3 ^a
Arabinosa	8 ^{ef}	9 ^c	8 ^{cd}	9 ^e	9 ^d	8 ^d
Manosa	9 ^f	5 ^b	3 ^b	2 ^b	5 ^c	5 ^{bc}
Celobiosa	7 ^{ef}	7 ^c	7 ^{cd}	7 ^{de}	7 ^d	7 ^d
Sacarosa	1 ^a	1 ^a	4 ^c	5 ^{cd}	2 ^b	1 ^a
Galactosa	5 ^{cd}	2 ^{ab}	5 ^c	4 ^c	1 ^a	2 ^a
Rhamnosa	3 ^{bc}	8 ^c	6 ^c	8 ^e	8 ^d	9 ^d
Xilosa	4 ^c	6 ^c	9 ^d	6 ^{cde}	6 ^d	6 ^c

* Letras distintas en una misma columna indican diferencia estadísticamente significativa a un nivel de confianza del 95%

La sacarosa fue el azúcar consumido en primer término por las levaduras *K. marxianus* MG, HY1 y L4B, mientras que la fructosa lo fue para las cepas *C. glabrata* N1 y *W. anomalus* API-1, y la galactosa para la levadura *K. marxianus* API-2. La asimilación de la arabinosa fue escasa o nula para todas las cepas evaluadas, lo mismo que la celobiosa, y en algunos casos la rhamnosa.

Cabe destacar que las cepas *K. marxianus* L4B y HY1 fueron capaces de asimilar xilosa (pentosa) y manosa (hexosa), ambos azúcares presentes en la biomasa lignocelulósica, lo que las vuelve buenos candidatos a su utilización en la producción de etanol a partir de esta materia prima.

8.6.2 Producción alcohólica por levaduras silvestres en diferentes fuentes de carbono.

Con la finalidad de seleccionar las levaduras que se utilizaron en los cultivos mixtos para la obtención de etanol se realizaron cinéticas de crecimiento y producción de alcohol en los monosacáridos glucosa, fructosa, galactosa y xilosa y en el disacárido sacarosa, utilizando las condiciones de cultivo previamente establecidas. Estas fermentaciones se realizaron utilizando medio YNB adicionado de manera individual con los diferentes carbohidratos como única fuente de carbono (10g/L). Se realizó un diseño factorial considerando los factores: cepa (6) y la fuente de carbono (5).

a) Población

En la Figura 37 se presenta la población promedio obtenida para las cepas de levadura silvestre evaluadas en diferentes fuentes de carbono. La mayor población alcanzada para la cepa *K. marxianus* L4B (Figura 37a) fue de 89×10^6 cel/ml, la cual se obtuvo a las 41 h de cultivo en glucosa como fuente de carbono. Sin embargo, en fructosa y sacarosa, el crecimiento de la cepa L4B fue más rápido aunque con menor población, así en fructosa se alcanzaron 72×10^6 cel/ml a las 30 h de cultivo, mientras que en sacarosa la máxima población fue de 71×10^6 cel/ml a las 16 h de cultivo. Al crecer la cepa L4B en galactosa, la población se mantuvo constante desde el inóculo y hasta las 30 h de cultivo, posteriormente se da un incremento en el número celular hasta alcanzar las 50×10^6 cel/ml a las 120 h de cultivo. En esta fuente de carbono no se observa una estabilización (fase estacionaria) del número de células, por lo que posiblemente se pueda alcanzar una mayor cantidad de células en esta fuente de carbono. Finalmente, en xilosa la población de la cepa L4B se mantiene sin cambio de las 0 h a las 82 h de cultivo, siendo la máxima de 37×10^6 cel/ml, obtenida a las 120 h de cultivo, en éste monosacárido se realizó un seguimiento hasta las 175h (datos no mostrados) y se observó una ligera disminución en el número de células.

La cepa *W. anomalus* API-1 (Figura 37b) alcanzó su mayor población a las 50 h de cultivo en glucosa como fuente de carbono (74×10^6 cel/ml), seguido de 48×10^6 cel/ml en fructosa (60 h) y de 46×10^6 cel/ml en sacarosa (50 h). Al crecer la cepa API-1 en galactosa y en xilosa, la población se mantiene sin un incremento exponencial en el número celular y en

estos monosacárido se observa una disminución en el número de células a lo largo de la cinética.

La mayor población alcanzada para la cepa *C. glabrata* N1 (Figura 37c) fue de 72×10^6 cel/ml, la cual se obtuvo a las 74h de cultivo en glucosa como fuente de carbono, seguido de 63×10^6 cel/ml en fructosa (24 h) y de 45×10^6 cel/ml en sacarosa (16 h). El comportamiento de la población de la cepa N1 tanto en galactosa como en xilosa fue semejante, pues a partir de las 4h de incubación se observó una disminución en el número de células hasta aproximadamente la mitad del número inicial, la cual se mantuvo constante hasta las 16h de cultivo, tiempo en el que se observó un repunte en la población siendo ligeramente superior al inicial. Este incremento puede deberse a la adaptación del microorganismo a estas fuentes de carbono, sin embargo, no logra tener un crecimiento importante, comparado con su crecimiento en YPG, en donde se había alcanzado $1,300 \times 10^6$ cel/ml.

La mayor población alcanzada para la cepa *K. marxianus* HY1 (Figura 37d) fue de 62×10^6 cel/ml, la cual se obtuvo a las 36 h de cultivo en sacarosa, seguido de 59×10^6 cel/ml tanto en glucosa como en fructosa (48 y 16 h, respectivamente). La cepa HY1 también es capaz de asimilar la galactosa, aunque la población que se obtiene en este sustrato es aproximadamente la mitad a la alcanzada en sacarosa. El crecimiento de la cepa HY1 en xilosa fue prácticamente nulo.

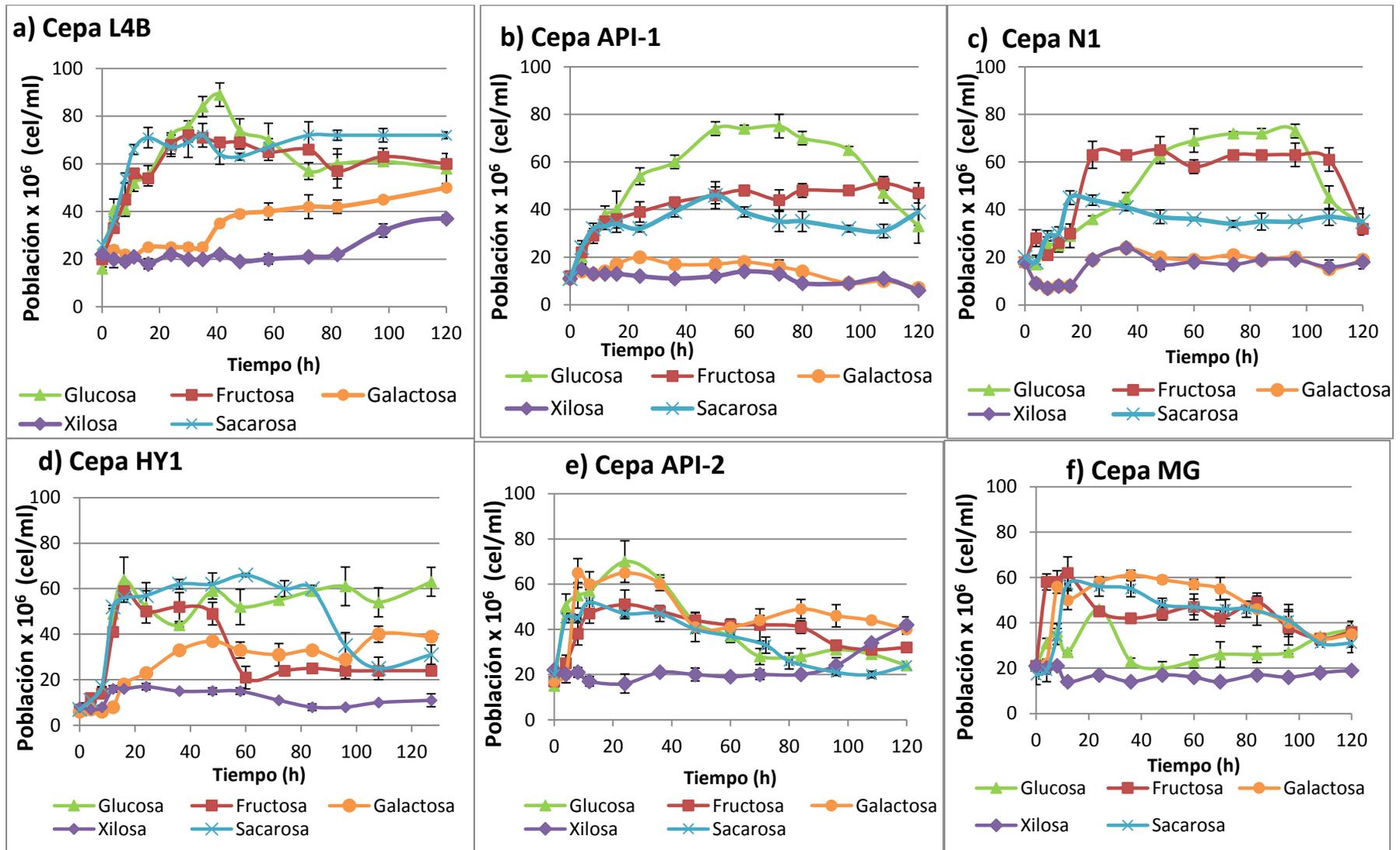


Figura 37. Población promedio de las cepas de levadura silvestre en diferentes fuentes de carbono: L4B (a), API-1 (b), N1 (c), HY1 (d), API-2(e) y MG (f).

Con respecto a la cepa *K. marxianus* API-2 (figura 37e) puede observarse que la mayor población (70×10^6 cel/ml) se alcanzó a las 24 h de crecimiento en glucosa, aunque el crecimiento en galactosa también fue considerable y similar al obtenido en glucosa. Esta levadura empieza a incrementar el número poblacional en xilosa a partir de las 108 h de cultivo, siendo una de las cepas (la otra es la L4B) que pueden crecer a partir de xilosa pero tienen una fase de adaptación muy larga y hubiera sido necesario continuar el experimento durante un mayor número de horas para poder verificar la cantidad de población que se alcanzaría. Finalmente, la cepa *K. marxianus* MG (Figura 37f) tiene un buen crecimiento tanto en fructosa (62×10^6 cel/ml) como en galactosa (61×10^6 cel/ml), incluso mayor que en glucosa.

Como puede apreciarse en la Figura 37, el azúcar que permitió obtener la mayor población para las cepas L4B, API-1, API-2 y N1 fue la glucosa, mientras que para la cepa HY1 fue la sacarosa y para la cepa MG fue la fructosa. También es importante recalcar que las cepas *K. marxianus* L4B, HY1, API-2 y MG tuvieron capacidad de asimilar galactosa, mientras que la xilosa solo fue utilizada por la cepa L4B y API-2, aunque escasamente. Este azúcar es uno de los principales componentes de la biomasa lignocelulósica, pero pocas levaduras tienen capacidad de utilizarlo.

La población alcanzada en galactosa por las cepas *K. marxianus* L4B y HY1 es mayor a la reportada por Estrada (2013) para la cepa *Candida tropicalis* LR4 al crecer en este mismo medio de cultivo, sin embargo, en el medio suplementado con xilosa la población de la cepa L4B fue menor a la cepa *Candida glabrata* T1 (Estrada, 2013).

Si se compara el número de células obtenidas al crecer en medio YNB-glucosa con las obtenidas al crecer las cepas en medio YPG, en cuya composición además de glucosa se adiciona peptona y extracto de levadura, se tiene que las cepas L4B y API-1 incrementaron el número celular en el medio YNB-glucosa, mientras que la población de las cepas N1, HY1, API-2 y MG disminuyó. El primer comportamiento observado puede deberse a la mayor adaptabilidad que presentan las cepas L4B y API-1, mientras que la disminución en la población del medio mínimo con respecto al medio sintético complejo YPG puede ser consecuencia de los requerimientos nutricionales más exigentes que presenten estas cepas, como pueden ser los aminoácidos, polipéptidos y vitaminas que aportan el extracto de levadura y la peptona de caseína.

b) Peso Seco

El peso seco obtenido a lo largo de la cinética en diferentes fuentes de carbono se presenta en la Figura 38. Durante el crecimiento de la cepa *K. marxianus* L4B (Figura 38a) en glucosa se observa una fase logarítmica de las 0 a las 16h, una fase estacionaria que va de las 24 a las 41h y una ligera disminución en el peso seco de las 48h a las 120h. En este monosacárido se alcanza el máximo peso seco (1.050 g/L) a las 24h de cultivo. En fructosa la fase de crecimiento exponencial de la cepa L4B tiene una duración de 24h y va desde el tiempo inicial de inóculo hasta las 24h, la fase estacionaria se observa de las 24 a 48 h y un posterior descenso en el peso seco desde las 48h a las 120h. El mayor peso seco alcanzado en fructosa correspondió a 1.044 g/L y se obtuvo a las 24h de cultivo. Por otro lado, cuando la cepa L4B creció en medio YNB adicionado de galactosa se observa un ligero crecimiento de las 0h a las 16h, a partir de las 24h el peso seco se mantuvo en constante aumento y se apreció una aparente estabilización de las 30h a las 48h y repunte en el crecimiento de las 48h a las 120h de cultivo, tiempo en el que se alcanzó el mayor peso seco con 0.833 g/L. El crecimiento de la cepa L4B en xilosa tiene una fase lag de las 0h hasta las 72 h y se observa un incremento en la biomasa de las 82h y hasta las 120h. En el tiempo final de la cinética se alcanzó el mayor peso seco, que corresponde a 0.422 g/L. Finalmente, en el disacárido sacarosa el mayor peso seco alcanzado fue de 1.017 g/L a las 24h de cultivo.

El mayor peso seco alcanzado para la cepa *W. anomalus* API-1 (Figura 38b) varió en dependencia de la fuente de carbono utilizada y los valores se encontraron entre 0.472 g/L al crecer en galactosa y 1.262 g/L al crecer en sacarosa. En glucosa se observó una fase lag de 4 h de duración y una fase logarítmica que fue de las 0h a las 24h, una fase estacionaria que fue de las 24 a las 36h y una ligera disminución en el peso seco de las 50h a las 120h; en este azúcar se alcanzó el máximo peso seco a las 36 h de cultivo (0.883 g/L). En fructosa la fase de crecimiento exponencial presentó una duración de 24h y fue desde el tiempo inicial de inóculo hasta las 24h, la fase estacionaria se observó de las 24 a las 36h y un posterior descenso en el peso seco desde las 36h a las 120 h, en este monosacárido el mayor peso seco alcanzado correspondió a 0.906 g/L y se obtuvo a las 24h de cultivo. Cuando la cepa API-1 creció en medio YNB adicionado de galactosa como fuente de carbono se observó un ligero crecimiento de las 0h a las 16h, a partir de las 24h el peso seco se mantuvo constante y se apreció una disminución alrededor de las 72h, en este sustrato el mayor peso seco alcanzado fue de 0.472 g/L a las 24h de cultivo. El crecimiento de la cepa API-1 en xilosa tuvo un ligero incremento a partir de las 24 h de cultivo, observándose una fase lag de las 0h hasta las 16 h, una fase estacionaria de las 36 a las 50 h

y una fase de muerte a partir de las 60 h. El mayor peso seco alcanzado correspondió a 0.517 g/L a las 50h. Por otro lado, el crecimiento de la cepa API-1 en sacarosa presentó fase lag de las 0h a las 12 h, seguido de un crecimiento exponencial de las 12h a las 36h, una fase estacionaria con una duración de 14h y una disminución en el peso seco de las 50h a las 120h de cultivo, alcanzándose un peso seco de 1.262 g/L a las 36h de cultivo.

Durante el crecimiento de la cepa *C. glabrata* N1 (Figura 38c) en glucosa no se observó la fase lag, la fase logarítmica fue de las 0h a las 24h, la fase estacionaria de las 24 a las 74h (50h de duración) y a partir de las 84h se obtuvo una ligera disminución en el peso seco, el cual se mantuvo constante hasta las 120h. En este monosacárido se alcanzó el máximo peso seco (0.978 g/L) a las 48 h de cultivo. En fructosa no se observó fase lag, la fase de crecimiento exponencial tuvo una duración de 24h y fue desde el tiempo inicial de inóculo hasta las 24h, la fase estacionaria se observó de las 24 a 74h y un posterior descenso en el peso seco a partir de las 84h y hasta las 120 h; el mayor peso seco alcanzado en este sustrato correspondió a 0.941 g/L y se obtuvo a las 48h de cultivo. Por otro lado, el crecimiento de la cepa N1 en el disacárido sacarosa presentó fase de crecimiento exponencial de las 0h a las 16 h, seguido de una fase estacionaria de las 24 a las 74h con una duración de 50h y una disminución en el peso seco de las 84h a las 120h de cultivo. El mayor peso seco alcanzado en este azúcar fue de 0.989 g/L a las 60h de cultivo. No se observó incremento en el peso seco en la galactosa ni en la xilosa.

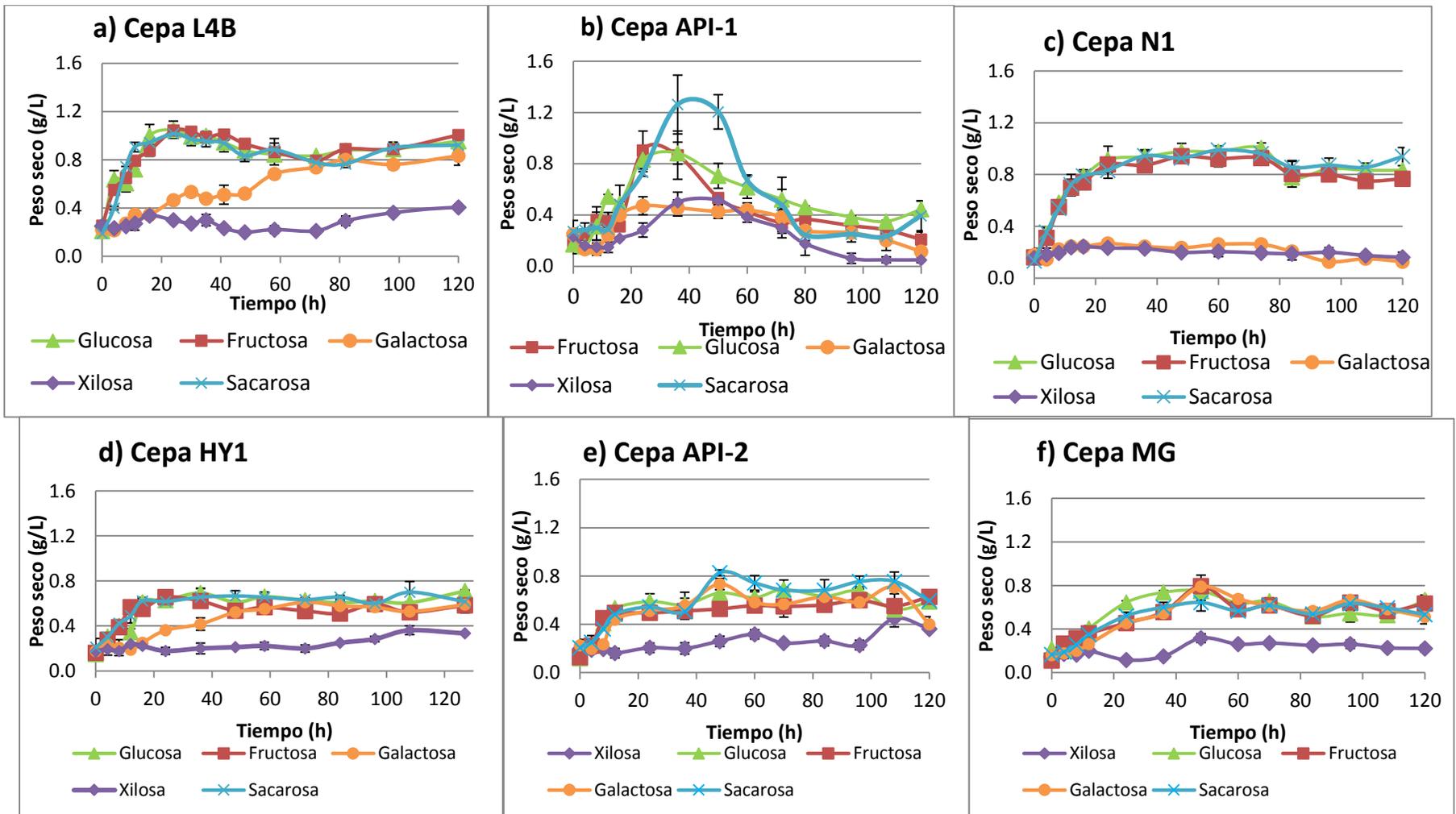


Figura 38. Peso seco promedio de las cepas de levadura silvestres en diferentes fuentes de carbono: L4B (a), API-1 (b), N1 (c), HY1 (d), API-2 (e) y Mg (d).

En el cultivo de la cepa *K. marxianus* HY1 (figura 38d) en glucosa no se observó la fase lag, la fase logarítmica fue de las 0h a las 16h, la fase estacionaria se observó de las 24 a las 108h (84h de duración) y a las 127h se observó un ligero incremento en el peso seco; el mayor peso seco (0.692 g/L) se alcanzó a las 36 h de cultivo. En fructosa tampoco se observó fase lag, la fase de crecimiento exponencial presentó una duración de 24h y ocurrió desde el tiempo inicial de inóculo hasta las 24h, posteriormente se observó una ligera disminución en el peso seco, el cual se mantuvo relativamente constante hasta las 120 h. El mayor peso seco alcanzado en este sustrato correspondió a 0.656 g/L y se obtuvo a las 24h de cultivo. En el medio YNB adicionado con galactosa se observó una fase lag de las 0 a las 8h, una fase de crecimiento exponencial de las 12h hasta las 72 h y una fase estacionaria a partir de las 72h y hasta las 127h. En este sustrato el mayor peso seco alcanzado fue de 0.611g/L a las 72h de cultivo. En xilosa se alcanzó un ligero incremento en el peso seco a partir de las 72 h de cultivo, observándose una fase log de las 72h hasta las 108 h. El mayor peso seco alcanzado en ésta fuente de carbono correspondió a 0.361 g/L a las 108h. Por otro lado, el crecimiento de la cepa HY1 en sacarosa presentó la fase de crecimiento exponencial de las 0h a las 16 h, seguido de una fase estacionaria de las 24 a las 96h con una duración de 72h y un ligero incremento en el peso seco a las 108h. El mayor peso seco alcanzado en éste azúcar fue de 0.667 g/L a las 48h de cultivo.

La duración de la fase crecimiento exponencial, que ocurre a una máxima velocidad, depende de la concentración inicial del sustrato limitante; así como de la habilidad del microorganismo para adaptarse a la disminución de la concentración de sustrato (Ribéreau 2006)

c) Parámetros cinéticos de crecimiento

Se calcularon los parámetros cinéticos para las cepas de levadura L4B, API-1, HY1, N1, API-2 y MG al crecer en diferentes fuentes de carbono, los resultados se presentan en la Tabla 28.

Para la cepa *K. marxianus* L4B al crecer en medio YNB suplementado con glucosa (40°C y 0 rpm) se obtuvo el mayor peso seco, la mayor velocidad de crecimiento y el

menor tiempo de duplicación, seguido de fructosa, sacarosa y finalmente galactosa. El azúcar que fue menos aprovechado para el crecimiento por esta levadura fue la xilosa.

Para la cepa *W. anomalus* API-1 la velocidad específica máxima (μ_{\max}) se encontró entre 0.054 y 0.253 h⁻¹, a lo que correspondió tiempos de duplicación de entre 12.42 y 2.80h. Se obtuvo el mayor peso seco en sacarosa, la mayor velocidad de crecimiento y el menor tiempo de duplicación en glucosa, mientras que el mayor Yx/s se alcanzó en fructosa. Los azúcares que fueron menos aprovechados para el crecimiento por esta levadura fueron la galactosa y la xilosa.

Durante el crecimiento de la cepa *C. glabrata* N1 en medio YNB a 40°C y 0 rpm, se obtuvo el mayor peso seco, la mayor velocidad de crecimiento, el menor tiempo de duplicación y el mayor Yx/s en sacarosa. Los azúcares que fueron menos aprovechados para el crecimiento por esta levadura fueron la galactosa y la xilosa.

Por otro lado, para la cepa silvestre *K. marxianus* HY1 se obtuvo el mayor peso seco, la mayor velocidad de crecimiento y el menor tiempo de duplicación en glucosa. El azúcar que fue menos aprovechado para el crecimiento fue la xilosa. Al crecer a la cepa *K. marxianus* API-2 en medio YNB con diferentes fuentes de carbono a 40°C y 0 rpm, se alcanzó el mayor peso seco en sacarosa, sin embargo, la mayor velocidad de crecimiento y el menor tiempo de duplicación se obtuvieron en glucosa, comportamiento similar al de la cepa API-1 (Tabla 28). Finalmente, para la cepa *K. marxianus* MG se obtuvo el mayor peso seco, la mayor velocidad de crecimiento y el menor tiempo de duplicación en fructosa.

Tabla 28. Parámetros cinéticos de crecimiento de las cepas silvestres en diferentes fuentes de carbono.

Fuente de carbono	Cepa	ΔX (g/L)	μ_{max} (h ⁻¹)	Td (h)	Y _{x/s} (g/g)
Glucosa	L4B	0.839 ± 0.09	0.28 ± 0.05	2.50 ± 0.43	0.035 ± 0.006
	API-1	0.711 ± 0.06	0.253 ± 0.05	2.80 ± 0.57	0.115 ± 0.04
	N1	0.811 ± 0.13	0.132 ± .003	5.26 ± 0.14	0.073 ± 0.01
	HY1	0.542 ± 0.03	0.178 ± 0.03	3.97 ± 0.72	0.042 ± 0.01
	API-2	0.569 ± 0.06	0.178 ± 0.002	3.90 ± 0.06	0.044 ± 0.01
	MG	0.533 ± 0.08	0.085 ± 0.001	8.18 ± 0.09	0.073 ± 0.01
Fructosa	L4B	0.789 ± 0.02	0.190 ± 0.002	3.62 ± 0.05	0.029 ± 0.00
	API-1	0.722 ± 0.06	0.133 ± 0.03	5.38 ± 1.35	0.174 ± 0.04
	N1	0.779 ± 0.02	0.162 ± 0.03	4.34 ± 0.73	0.052 ± 0.01
	HY1	0.494 ± 0.07	0.136 ± 0.04	5.35 ± 1.60	0.029 ± 0.01
	API-2	0.500 ± 0.08	0.176 ± 0.01	3.95 ± 0.29	0.027 ± 0.01
	MG	0.683 ± 0.12	0.216 ± 0.09	3.54 ± 1.50	0.052 ± 0.01
Galactosa	L4B	0.610 ± 0.14	0.083 ± 0.004	8.37 ± 0.47	0.015 ± 0.003
	API-1	0.222 ± 0.05	0.156 ± 0.02	4.48 ± 0.67	0.047 ± 0.01
	N1	0.090 ± 0.06	0.108 ± 0.01	6.44 ± 0.57	0.047 ± 0.03
	HY1	0.433 ± 0.03	0.108 ± 0.01	6.47 ± 0.88	0.014 ± 0.01
	API-2	0.509 ± 0.09	0.158 ± 0.01	4.39 ± 0.34	0.02 ± 0.01
	MG	0.628 ± 0.01	0.122 ± 0.02	5.75 ± 0.96	0.052 ± 0.01
Xilosa	L4B	0.172 ± 0.01	0.04 ± 0.003	15.82 ± 0.28	0.054 ± 0.010
	API-1	0.283 ± 0.02	0.054 ± .002	12.42 ± 0.49	0.008 ± 0.001
	N1	0.089 ± 0.02	0.051 ± 0.02	14.19 ± 4.06	0.079 ± 0.06
	HY1	0.189 ± 0.03	0.088 ± 0.05	9.85 ± 6.26	0.005 ± 0.01
	API-2	0.256 ± 0.02	0.026 ± .003	26.92 ± 2.82	0.005 ± 0.01
	MG	0.178 ± 0.00	0.106 ± .02	6.60 ± 0.99	0.052 ± 0.01
Sacarosa	L4B	0.828 ± 0.01	0.19 ± 0.03	3.69 ± 0.63	0.028 ± .0003
	API-1	0.990 ± 0.17	0.123 ± 0.02	6.56 ± 3.47	0.124 ± 0.06
	N1	0.856 ± 0.05	0.245 ± 0.05	2.89 ± 0.61	0.114 ± 0.01
	HY1	0.456 ± 0.03	0.108 ± 0.05	7.21 ± 3.43	0.019 ± 0.01
	API-2	0.622 ± 0.03	0.117 ± 0.03	6.12 ± 1.55	0.009 ± 0.01
	MG	0.478 ± 0.02	0.108 ± 0.002	6.45 ± 0.11	0.052 ± 0.01

La velocidad de crecimiento específica máxima (μ_{max}) alcanzada en glucosa, galactosa y xilosa por las diferentes levaduras silvestres estudiadas fueron menores a las reportadas para *K. marxianus* DMKU3-1042 al crecer a 40°C en medio con 20 g/L de cada uno de estos azúcares (de forma individual), ya que se encontraron velocidades específicas

máximas de 1.1 a 1.3 h⁻¹ (Rodrussamee et al., 2011). Las diferencias encontradas están dadas por las condiciones de agitación empleadas, puesto que éstos autores utilizan una velocidad la aereación de 160 rpm y se sabe que las condiciones aerobias generalmente favorece la producción de biomasa (Tortora, 2010). La adición de oxígeno busca mejorar la síntesis de biomasa, de modo que se incremente la tasa de fermentación, ya que es un factor importante en la síntesis de los lípidos constituyentes de la membrana celular y que influyen la velocidad general de la reacción (Sablayrolles 1996; Rosenfeld 2003). Por otro lado, el medio empleado por Rodrussamee et al. (2011) estaba constituido tanto por la fuente de carbono como por extracto de levadura y peptona, nutrientes que favorecieron el crecimiento microbiano.

El análisis estadístico realizado mostró que la interacción cepa-azúcar, así como los parámetros cepa y azúcar individuales tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el peso seco neto, la velocidad de crecimiento μ_{max} y el tiempo de duplicación con un nivel de confianza del 95%. En la figura 39 se presenta el gráfico de medias y de interacción para el parámetro peso seco, en el que puede apreciarse que en general la mayor biomasa se obtuvo con la cepa L4B, y sobre todo destacar la asimilación de galactosa para el crecimiento que tiene esta levadura, la cual fue superior a la presentada por las otras cepas de levadura estudiadas.

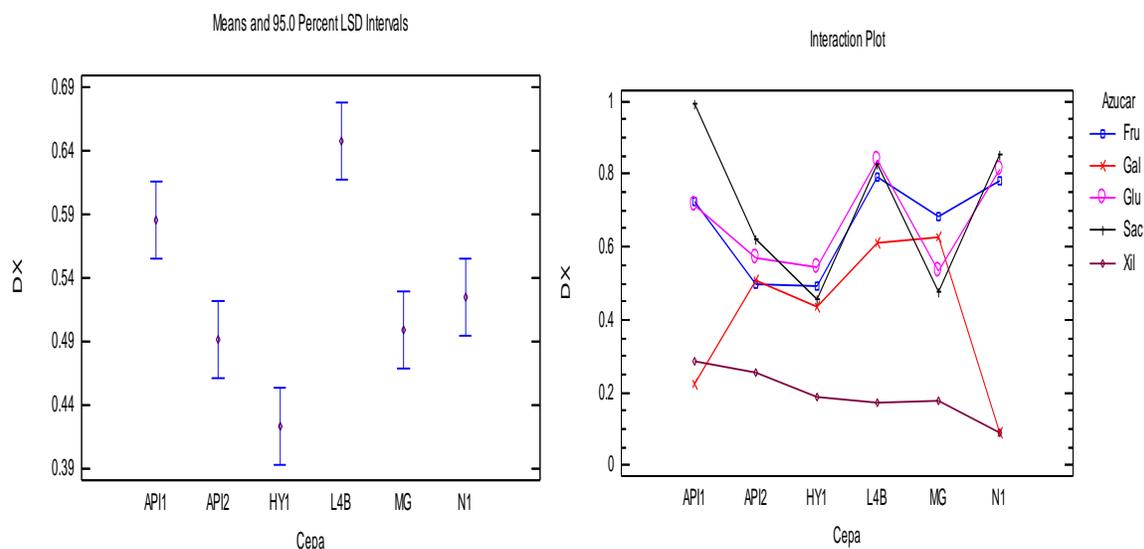


Figura 39. Gráfico de medias y de interacción obtenido para el parámetro ΔX

d) Producción de Etanol

La producción de alcohol de las cepas silvestres al crecer en diferente fuente de carbono se presenta en la figura 40. Con respecto a la cepa *K. marxianus* L4B (figura 40a), la mayor cantidad producida de este metabolito (16.31 ± 0.77 g/L) se obtuvo al inocular el microorganismo en medio YNB adicionado de fructosa. Se pudo apreciar un comportamiento similar al crecer en glucosa, fructosa y sacarosa, en el que a las 4h de cultivo fue posible cuantificar el etanol en el medio y cuya concentración fue incrementando conforme transcurría el tiempo de incubación, alcanzando su máximo a las 41h en fructosa y a las 48h tanto en glucosa como en sacarosa. Posteriormente, la cantidad de alcohol en el medio se mantuvo relativamente constante, observándose una ligera disminución a partir de las 98h. Considerando la producción de etanol a partir de galactosa, se observó un período de adaptación de 30h y la máxima producción en éste sustrato (14.54 ± 0.14 g/L) se alcanzó a las 98h de cultivo. Finalmente, en el medio YNB con xilosa como fuente de carbono no se detectó la producción de alcohol.

La producción de alcohol de la cepa *W. anomalus* API-1 al crecer en diferente fuente de carbono se presenta en la figura 40b, la mayor cantidad (4.41 ± 0.21 g/L) se obtuvo al inocular el microorganismo en medio YNB adicionado de glucosa. En esta fuente de carbono la producción de alcohol empezó a partir de las 8h y se observó un incremento hasta las 50 h, seguido de un nuevo incremento a las 72h de cultivo, hasta alcanzar su máximo a las 120h. Mientras que en fructosa la máxima concentración alcanzada por la cepa API-1 fue de 2.00 g/L a las 60 h, en este sustrato la concentración permaneció relativamente constante a partir de las 50 h de incubación a 40°C y 0 rpm. Finalmente, en el medio YNB con galactosa y con xilosa como fuente de carbono no se detectó la producción de alcohol con la cepa API-1.

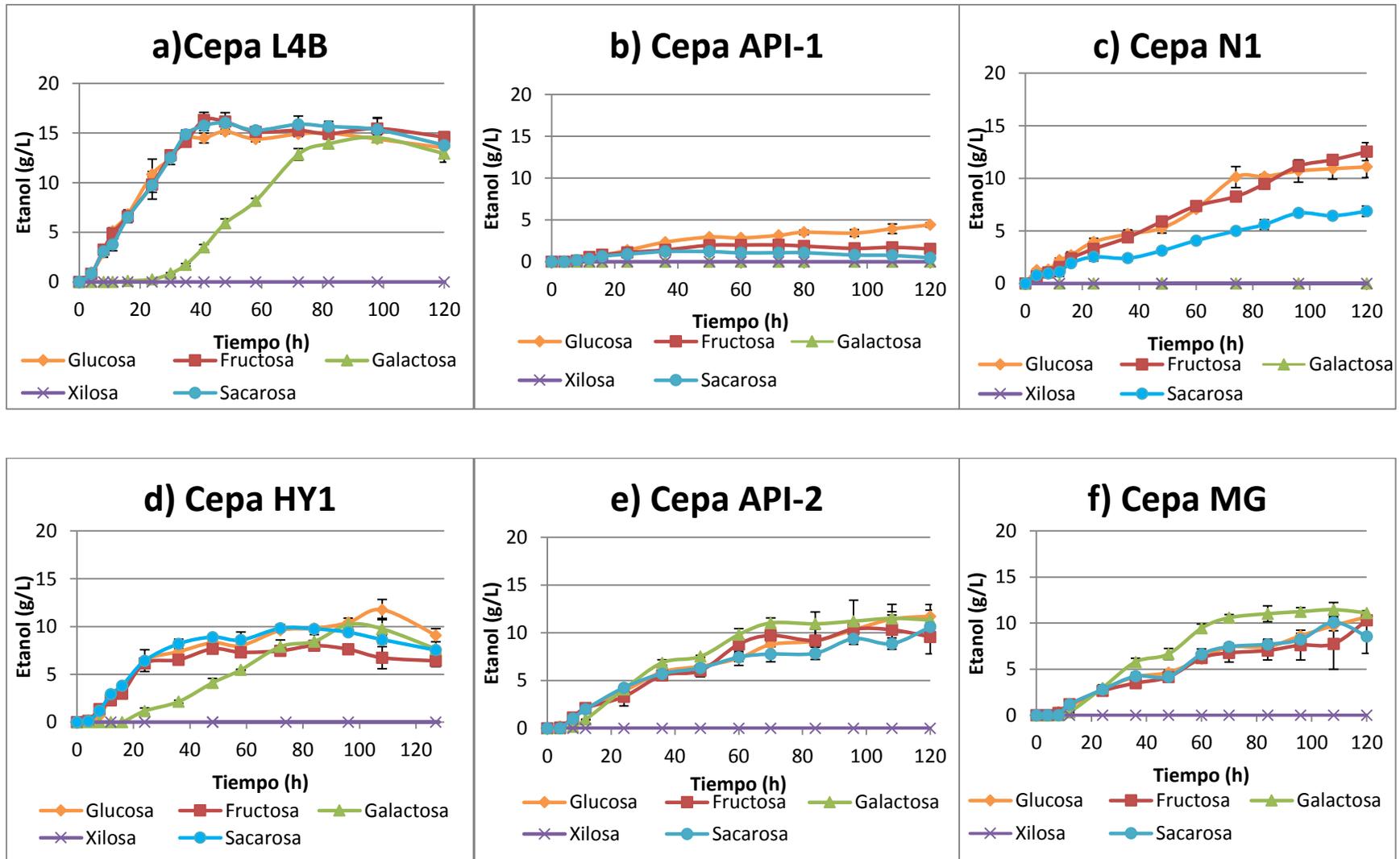


Figura 40. Producción de etanol promedio de las cepa L4B (a), API-1 (b) N1 (c) , HY1 (d), API-2 (e) y MG (f) en medio YNB adicionado con diferentes fuentes de carbono (condiciones de cultivo: 40°C, 0 rpm)

Para la cepa *C. glabrata* N1 (figura 40c), la mayor cantidad producida de alcohol (12.53 ± 0.85 g/L, 120h) se obtuvo a partir de fructosa, mientras que con galactosa y con xilosa como fuente de carbono no se detectó la producción de alcohol. En glucosa la producción empieza a partir de las 4h y se observó un incremento hasta las 74 h, hasta alcanzar su máximo a las 120h.

En glucosa la producción de etanol de la cepa *K. marxianus* HY1 (figura 40d) inició a partir de las 8h y se observó un incremento hasta las 48 h, la concentración permaneció constante hasta las 120h. En fructosa y sacarosa la producción empezó a partir de las 4h de incubación, aunque la producción es menor que en el disacárido. La máxima concentración alcanzada por la cepa HY1 en fructosa fue de 11.76 g/L a las 108 h, mientras que en sacarosa se alcanzaron 9.82 g/L.

La producción de la cepa *K. marxianus* API-2 (Figura 40e) tiene un comportamiento similar en los azúcares glucosa, fructosa, galactosa y sacarosa, en los que la producción inicia a las 8 h de cultivo, manteniéndose estable a partir de las 70 h de cultivo, 96 h en el caso de glucosa. Esta cepa alcanza su mayor producción de etanol en glucosa (11.72 g/L), seguido de galactosa (11.51 g/L) y de fructosa (10.38 g/L)

Las cepas *K. marxianus* L4B, HY1, API-2 y MG fueron las únicas que tuvieron capacidad de fermentar 4 de las cinco fuentes de carbono, entre las que se pueden mencionar glucosa, fructosa, galactosa y sacarosa (Figura 41). El sustrato xilosa no pudo utilizarse para producción de etanol y sí para crecimiento, generalmente, en las levaduras, la poca producción de etanol a partir de xilosa se debe a la acumulación de xilitol y a la inhabilidad de catalizar la conversión de xilitol a xilulosa durante la fermentación anaerobia (Zhang et al., 2011). Cuando se emplean fuentes de carbono diferentes a la glucosa, se requiere una gluconeogénesis, donde se generan carbohidratos de almacenamiento de tipo hexosas, para el mantenimiento dentro de la vía metabólica de la hexosa monofosfato, en la cual se llega a la síntesis de la ribosa necesaria en los procesos anabólicos y la posterior generación de R5P que conduce a la ruta PP (Dickinson, 2003).

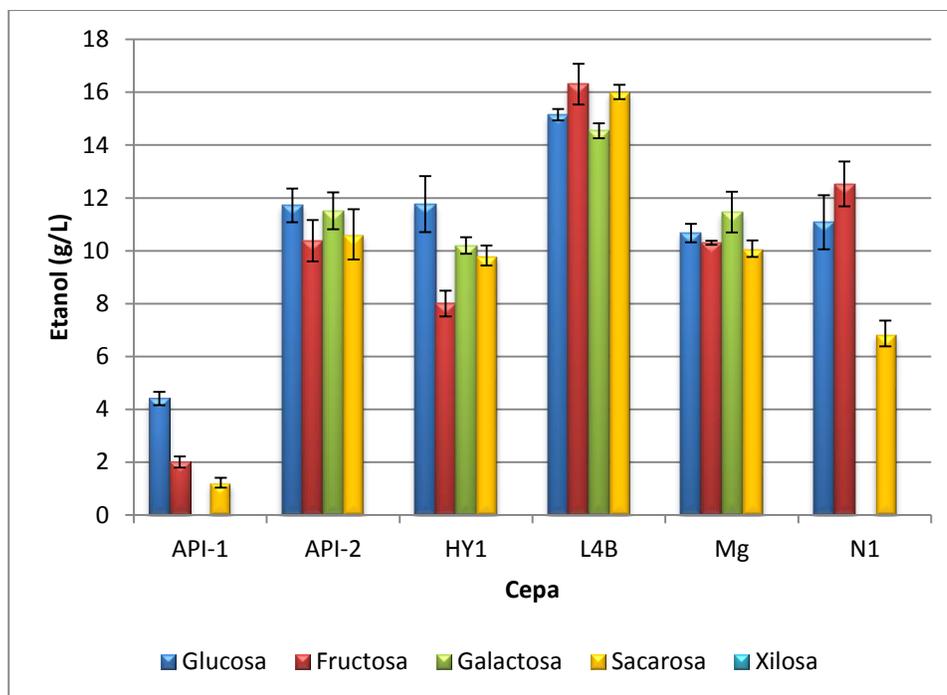


Figura 41. Producción de etanol en diferente fuente de carbono

El análisis estadístico realizado indicó que existe un efecto significativo sobre la producción de etanol debido a la interacción de los factores cepa y fuente de carbono, así para como para cada uno de los factores individuales, a un nivel de significancia del 95%. En el gráfico de medias (figura 42) se aprecia que la cepa *K. marxianus* L4B es la que produce la mayor cantidad de alcohol, de igual forma se pudo observar que la mayor producción se obtuvo al crecer esta cepa en fructosa.

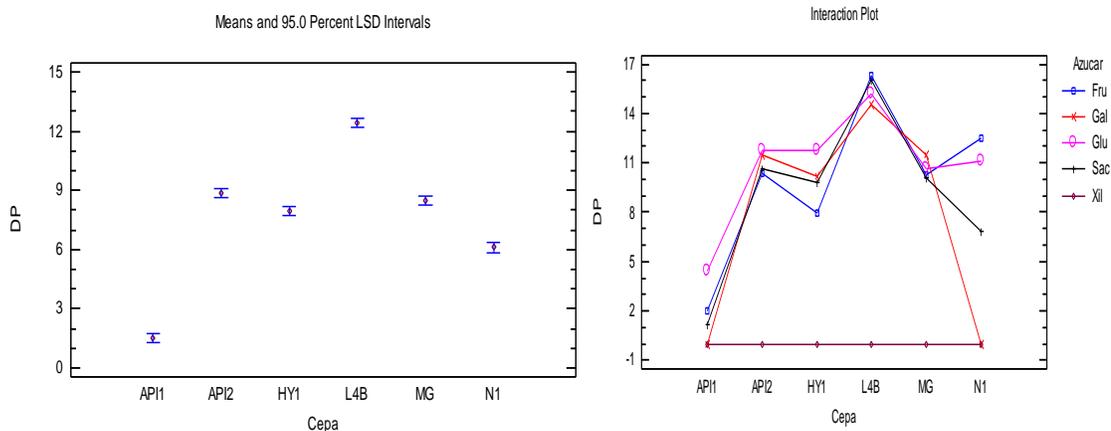


Figura 42. Gráfico de medias y de interacción obtenidos para el parámetro de producción de alcohol.

e) Parámetros Cinéticos de Producción

Se calcularon los parámetros cinéticos de producción de alcohol para las cepas de levadura silvestres al crecer en diferentes sustratos. Los resultados se presentan en la tabla 29.

Tabla 29. Parámetros cinéticos de producción de alcohol de las cepas de levadura silvestres en diferentes fuentes de carbono.

Fuente de carbono	Cepa	ΔP (g/L)	P_{tot} (g/L.h)	P_{max} (g/L.h)	r_P (g/L.h)	r_s (g/L.h)	$Y_{P/s}$ (g/g)
Glucosa	L4B	15.15 ± 0.22	0.112 ± 0.01	0.316 ± 0.01	0.285 ± 0.06	0.696 ± 0.05	0.49 ± 0.05
	API-1	4.41 ± 0.25	0.037 ± 0.002	0.037 ± 0.002	0.428 ± 0.17	0.019 ± 0.03	0.422 ± 0.06
	N1	11.08 ± 1.0	0.092 ± 0.01	0.092 ± 0.01	0.131 ± 0.003	0.024 ± 0.01	0.453 ± 0.02
	HY1	11.76 ± 1.06	0.072 ± 0.01	0.109 ± 0.01	0.413 ± 0.04	0.023 ± 0.01	0.470 ± 0.02
	API-2	11.73 ± 0.64	0.098 ± 0.05	0.098 ± 0.05	0.427 ± 0.04	0.023 ± 0.01	0.422 ± 0.06
	MG	10.67 ± 0.35	0.089 ± 0.003	0.089 ± 0.003	0.263 ± 0.01	0.023 ± 0.01	0.422 ± 0.06
Fructosa	L4B	16.31 ± 0.77	0.122 ± 0.00	0.397 ± 0.02	0.343 ± 0.05	0.201 ± 0.001	0.51 ± 0.03
	API-1	2.00 ± 0.21	0.013 ± 0.00	0.033 ± 0.003	0.361 ± 0.01	0.016 ± 0.00	0.404 ± 0.12
	N1	12.53 ± 0.85	0.104 ± 0.01	0.104 ± 0.01	0.122 ± 0.04	0.029 ± 0.02	0.369 ± 0.01
	HY1	8.00 ± 0.44	0.05 ± 0.004	0.095 ± 0.01	0.684 ± 0.33	0.027 ± 0.01	0.368 ± 0.02
	API-2	10.38 ± 0.78	0.079 ± 0.01	0.108 ± 0.008	0.73 ± 0.09	0.016 ± 0.00	0.369 ± 0.01
	MG	10.30 ± 0.08	0.086 ± 0.001	0.086 ± 0.001	0.07 ± 0.007	0.029 ± 0.02	0.368 ± 0.02
Galactosa	L4B	14.54 ± 0.28	0.108 ± 0.0	0.148 ± 0.003	0.193 ± 0.01	0.06 ± 0.002	0.35 ± 0.01
	API-1	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0	0 ± 0.0
	N1	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0	0 ± 0.0
	HY1	10.20 ± 0.31	0.06 ± 0.01	0.106 ± 0.003	0.054 ± 0.003	0.023 ± 0.01	0.470 ± 0.02
	API-2	11.51 ± 0.69	0.09 ± 0.01	0.107 ± 0.006	0.552 ± 0.003	ND	ND
	MG	11.46 ± 0.77	0.093 ± 0.002	0.106 ± 0.007	0.189 ± 0.02	ND	ND
Xilosa	L4B	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0.02 ± 0.003	0 ± 0.0
	API-1	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
	N1	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
	HY1	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

	API-2	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
	MG	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0	0 ± 0.0
Sacarosa	L4B	16.01 ± 0.27	0.115 ± 0.01	0.333±0.006	0.340 ± 0.16	0.130 ± 0.01	0.48 ± 0.01
	API-1	1.22 ± 0.20	0.004 ± 0.0	0.033± 0.005	0.169 ± 0.06	0.013±0.003	0.190 ± 0.03
	N1	6.87 ± 0.49	0.057 ± 0.004	0.057± 0.004	0.175 ± 0.08	0.024 ± 0.00	0.505 ± 0.04
	HY1	9.82 ± 0.38	0.059 ± 0.00	0.136±0.005	0.589 ± 0.09	0.023 ± 0.01	0.470 ± 0.02
	API-2	10.62 ± 0.95	0.088 ± 0.007	0.088±0.007	0.172 ± 0.11	ND	ND
	MG	10.09 ± 0.31	0.071 ± 0.015	0.093±0.003	0.075 ± 0.03	ND	ND

ND: No determinado

Las velocidades de consumo de sustrato fueron considerablemente menores que las reportadas por Rodrussamee et al. (2011), quienes indican que la cepa *K. marxianus* DMKU3-1042 presenta una velocidad de consumo de manosa de 0.86 g/L.h y de 1.3 g/L.h al crecer en glucosa.

Aun cuando las cepas silvestres utilizadas no tuvieron la capacidad para producir alcohol a partir de xilosa, existen reportes que algunas cepas de *K. marxianus* son capaces de consumir este azúcar y producir alcohol en medios ambientes con limitación de oxígeno, por ejemplo, a 40°C *K. marxianus* IMB4 produce 2.08 g/L (Zhang et al., 2011), y otras cepas pueden producir hasta 5.6 g/L de etanol a partir de 20 g/L de xilosa a 35 °C, mientras que a 40 °C la producción se reduce a 0.8-1.2 g/L (Zhang et al., 2013).

Al ser la productividad máxima otro de los parámetros a considerar durante el proceso de selección de cepas alcohologénicas, se encontró que la interacción de los factores cepa-fuente de carbono, así como los factores individuales tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la productividad máxima, siendo mayor en la cepa L4B, seguida de la cepa HY1 y API-2, tal y como puede observarse en la figura 43.

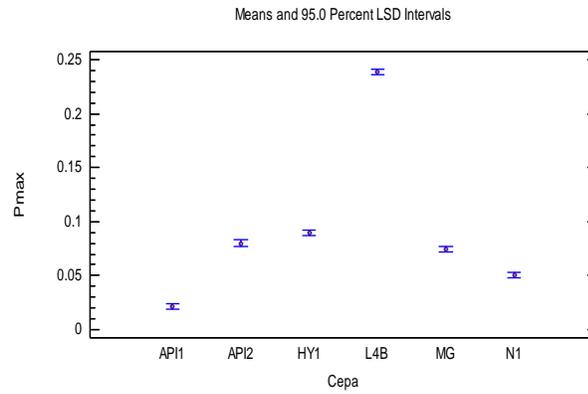


Figura 43 Gráfico de medias obtenido para el parámetro de productividad máxima.

Con lo anterior se sugiere que las cepas que se podrían utilizar en los cultivos mixtos son L4B, HY1 o API-2, pues fueron las que presentaron un mejor desempeño durante la producción de alcohol en diferentes fuentes de carbono.

CAPITULO V

8.7. Caracterización de la producción de enzimas lignocelulolíticas de las bacterias ruminales.

8.7.1. Asimilación de carbohidratos complejos en medio sólido

Se evaluó el comportamiento de las cuatro cepas de bacterias ruminales (paquetes celulares y sus sobrenadantes) en medio sólido adicionado de diferentes sustratos carbonosos a una concentración del 0.5%, de manera individual. Por la misma naturaleza de los sustratos utilizados éstos no se disolvieron completamente en el medio de sales utilizados, con excepción de celobiosa, carboximetilcelulosa y pectina.

En los sustratos harina de limón (italiano y persa), xilanos (haya y abedul), celulosa, celobiosa y almidón no fue posible observar ningún halo de hidrólisis (Figura 44), por el contrario, en el pozo donde se colocó la enzima Vizcozyme L (control +) se observó una concentración del colorante. El control positivo utilizado tienen principalmente actividad beta-glucanasa, aunque también contiene xilanasas (como actividad secundaria), esto de acuerdo a los datos del fabricante, sin embargo, tampoco fue posible observar ningún halo de degradación en los diferentes tipos de xilano evaluados. Esto pudo ser ocasionado porque la enzima comercial pudo haber sufrido degradación de esta actividad enzimática debido a pérdida de la cadena de frío durante su almacenamiento por descompostura del refrigerador.

En el medio con pectina de cítricos comercial (Figura 44h) se observó halo de degradación únicamente en el pocillo donde se colocó el coctel enzimático comercial, obteniéndose un halo con diámetro de 8.95 ± 0.26 mm.

En el medio de cultivo con CMC al 0.5% (Figura 44g) se observó degradación del polisacárido únicamente en los pocillos en los que se colocó la enzima comercial, el sobrenadante de la cepa Xer-15 (identificado con el número 1 en la figura 44) y el paquete celular de la cepa Xer-15 (identificado con el número 2 en la figura 44). Este sustrato es de

estructura amorfa, lo que puede facilitar su hidrólisis. El tamaño de los halos de hidrólisis (diámetro) se presenta en la tabla 30.

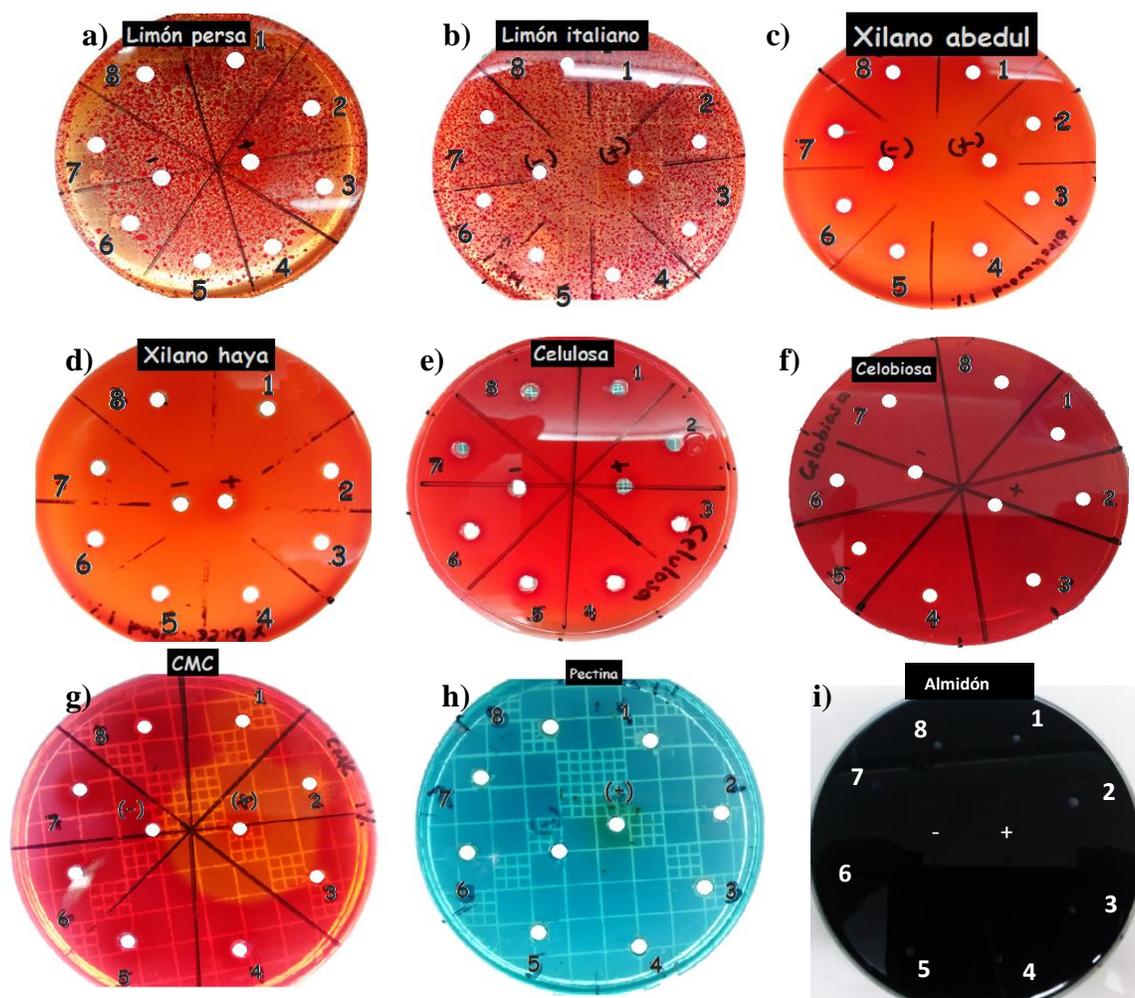


Figura 44. Búsqueda inicial de actividades hidrolíticas en diferentes sustratos al 0.5%, harina de limón persa (a), harina de limón italiano (b), xilano de abedul (c), xilano de haya (d), celulosa (e), celobiosa (f), carboximetilcelulosa CMC (g), pectina cítrica (h) y almidón (i). Codificación pozos: 1 Sobrenadante cepa Xer-15; 2 Paquete celular cepa Xer-15; 3 Sobrenadante cepa Xer-18; 4 Paquete celular Cepa Xer-18; 5 Sobrenadante cepa Xer-19; 6 Paquete celular Cepa Xer-19; 7 Sobrenadante cepa Xer-28; 8 Paquete celular Cepa Xer-28; (+) Control positivo Viscozyme L; (-) Control negativo agua destilada.

Tabla 30. Halos de hidrólisis observados en carboximetilcelulosa (tinción con rojo congo)

Muestra	Diámetro Halos de degradación (mm)
Viscozyme L	33.48 ± 0.90
Sobrenadante cepa Xer 15	12.59 ± 0.64
Paquete celular cepa Xer15	6.95 ± 0.89

Se pudo observar que el sobrenadante de la cepa *Bacillus subtilis* Xer-15 fue el que presentó casi el doble de actividad hidrolítica que las células de esta bacteria en el sustrato carboximetilcelulosa al 0.5%, lo que indicaría presencia de endoglucanasas extracelulares en esta cepa. Mientras que, en las otras cepas y sus sobrenadantes evaluados no fue posible detectar actividad hidrolítica con el ensayo realizado, aun cuando las cepas son de la misma especie, género y origen.

Los resultados obtenidos para la cepa *B. subtilis* Xer-15 fueron similares a los reportados por Behera et al. (2014) para cepas de *Bacillus brevis* (CDB-1), *Bacillus alcalophilus* (CDB-2) y *Bacillus subtilis* (CDB-09), entre otras, aisladas del suelo de manglares del delta del río Mahanadi, en India, quienes encontraron zonas claras de inhibición en el rango de 9 a 21 mm. Sin embargo, difieren de los presentados por Gupta et al. (2012) quienes reportan valores de zona clara alrededor de las colonias de 28 a 50 mm para bacterias aisladas del intestino de organismos que se alimentan de celulosa como termitas, caracoles y orugas.

En los otros sustratos analizados (a excepción de pectina cítrica) no se observó evidencia de degradación por las cepas bacterianas en estudio o sus sobrenadantes, lo anterior pudo deberse a que se requiere mayor tiempo de incubación de los microorganismos con el sustrato para permitir su crecimiento y, por consiguiente, la producción de enzimas hidrolíticas.

8.7.2. *Caracterización de la producción de enzimas celulolíticas en diferentes fuentes de carbono*

La caracterización de la producción de enzimas celulolíticas en cuatro diferentes fuentes de carbono (harina de limón persa, xilano, pectina cítrica y CMC 5g/L) se efectuó de manera preliminar con la cepa *B. subtilis* Xer-15, pues aparentemente fue la única que presentó actividad hidrolítica en medio sólido.

a) Población

En la Figura 45 se presenta la población promedio obtenida para la cepa *B. subtilis* Xer-15 a lo largo de la cinética en medio mineral adicionado con diferentes fuentes de carbono a una concentración de 5 g/L. Al crecer en harina de limón persa (HLP, Figura 45a), se observó un rápido incremento en la población al día 1 de cultivo; aparentemente, al segundo día de cultivo la cepa Xer-15 ya se encontraba en fase estacionaria, sin embargo, al día 3 se pudo observar un nuevo incremento en el número de células que continuó creciendo exponencialmente hasta el cuarto día de cultivo alcanzándose 216×10^6 cel/ml, posteriormente se dio una ligera disminución y una estabilización de la población. Esto pudo deberse al consumo inicial de glucosa/sacarosa libre en la harina de limón y una vez agotado este sustrato fácilmente metabolizable, se consumió la glucosa que se encuentra polimerizada en la celulosa.

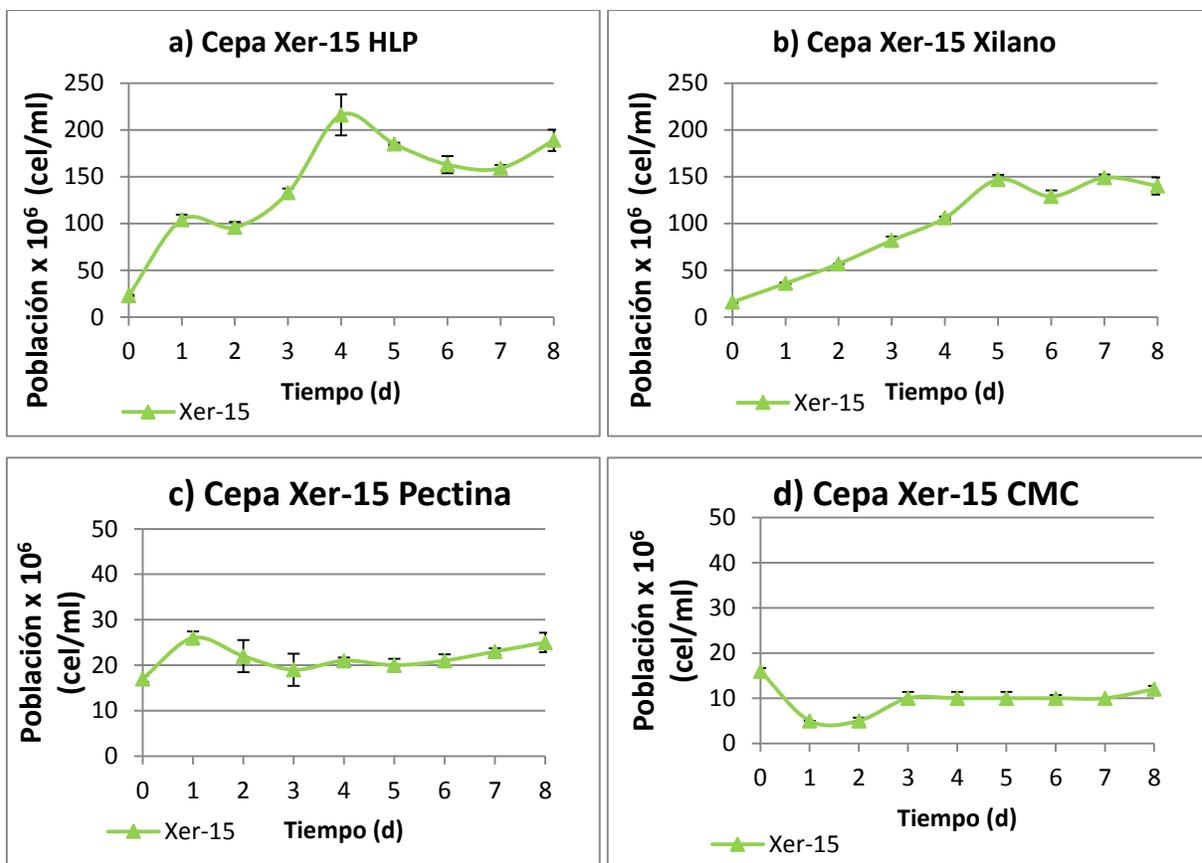


Figura 45. Población promedio de la cepa Xer-15 en diferentes sustratos. Condiciones de cultivo: 40°C, pH 6.0, 100 rpm

En el sustrato xilano (Figura 45b) la cepa Xer-15 alcanzó la máxima población a los 5 días de cultivo con 147×10^6 cel/ml, mientras que en la pectina cítrica comercial (Fig 45c) el incremento en la población fue muy escaso, permaneciendo prácticamente sin cambio a lo largo del tiempo. Finalmente, en CMC (Figura 45d) tampoco se observó crecimiento de esta cepa, aun cuando en medio sólido adicionado con CMC fue donde pudo visualizarse la degradación de este sustrato (ver figura 44), esta ausencia de crecimiento en el sustrato donde previamente se había detectado actividad pudo ser ocasionada porque al encontrarse en medio líquido con agitación la célula bacteriana no tuvo suficiente contacto con el sustrato, mientras que en el agar se encuentra “inmovilizada” y se facilita la interacción entre el microorganismo y el sustrato (Casablanca-Alarcón et al., 2011). No obstante, Sreedevi et al. (2013) indican que la agitación incrementa la aereación del medio y así contribuye a mejorar el contacto entre el sustrato y el microorganismo, aunque en este caso no pudo observarse este fenómeno.

b) Peso seco

El peso seco alcanzado por la cepa *B. subtilis* Xer-15 en diferentes sustratos se presenta en la Figura 46. El mayor peso seco se alcanzó en harina de limón persa (Figura 46a), correspondiendo a 3.972 g/L (peso neto: 0.492 g/L) al día 1 de cultivo, posteriormente se observó una disminución gradual en el peso seco. Lo anterior pudo ser ocasionado por la solubilización en el medio de componentes de la harina de limón utilizada, como la pectina. El crecimiento de cepas de *Bacillus* en sustratos pécticos procedentes de albedo de naranja o toronja ha sido reportado previamente y en el presente trabajo la harina de limón persa utilizada procedía de las cáscaras y membranas de este fruto (Barragán et al., 2014; Arellano et al., 2015).

Por otro lado, en el crecimiento en xilano (Figura 46b) se observó un comportamiento similar al indicado en HLP, alcanzándose el mayor peso seco al primer día de cultivo con un ligero aumento en el peso seco (peso neto: 0.231 g/L) y una disminución gradual en los días subsecuentes. En los sustratos pectina cítrica y CMC (Figura 46c y Figura 46d, respectivamente) no se observó un incremento en la biomasa en peso seco de esta cepa, lo cual coincide con la ausencia de crecimiento poblacional.

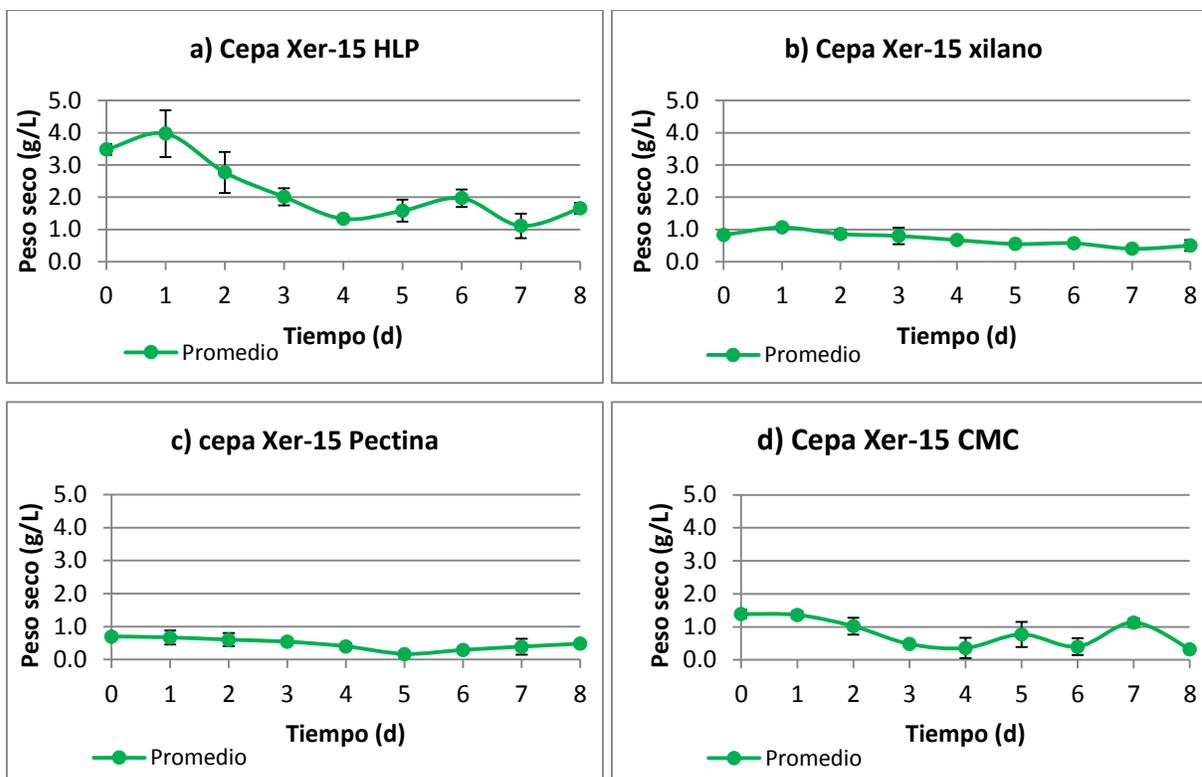


Figura 46. Variaciones en el peso seco de la cepa *Bacillus subtilis* Xer-15 en diferentes sustratos a lo largo de 8 días de crecimiento a pH 6.0, 100 rpm y 40°C.

Se calcularon los parámetros cinéticos para la cepa *B. subtilis* Xer-15 al crecer en diferentes fuentes de carbono (5 g/L) y los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 31, en la que se puede observar que la mejor fuente de carbono para esta cepa fue la harina de limón (HLP). Sin embargo, el peso seco y la μ_{max} alcanzados en este sustrato para la cepa Xer-15 fueron menores a los obtenidos durante el establecimiento de las condiciones ambientales en medio adicionado con celobiosa (1 g/L), pues se habían alcanzado 2.15 g/L y 0.451 h⁻¹, respectivamente. Esta variación pudo estar relacionada con la composición del medio utilizado durante el establecimiento de las condiciones de cultivo, pues además de celobiosa contiene extracto de levadura, peptona y sales minerales, que son elementos que pueden favorecer el crecimiento microbiano, mientras que el medio utilizado en ésta etapa únicamente contenía sales minerales y la fuente de carbono.

Tabla 31. Parámetros cinéticos de la cepa Xer-15 en diferentes fuentes de carbono.

Fuente de carbono	Δ Población $\times 10^6$ (cel/ml)	Δ Peso seco (g/L)	μ_{\max} (h^{-1})	Td (h)
HLP	193 \pm 4	0.492 \pm 0.08	0.28 \pm 0.05	2.50 \pm 0.43
Xilano	131 \pm 3	0.231 \pm 0.32	0.19 \pm 0.002	3.62 \pm 0.05
Pectina	9 \pm 2	-0.03	0	0
CMC	0	0	0	0

La utilización de carbohidratos complejos para el crecimiento por la bacteria ruminal *B. subtilis* Xer-15 fue en el siguiente orden: HLP>Xilano>Pectina>CMC. La mayor producción de biomasa como peso seco en el sustrato HLP comparado con las otras fuentes de carbono estudiadas, pudo ser consecuencia a que es un medio rico en nutrientes, pues de acuerdo al análisis bromatológico realizado a esta harina se trata de una materia vegetal con un 5.87% de proteína, 0.66% de grasa, 8.14% de cenizas y 82.76% de carbohidratos, 8387 mg/Kg de calcio y 7700 mg/Kg de potasio que aporta los nutrimentos adecuados para el mejor crecimiento de la cepa Xer-15.

c) Variación en el pH del medio de cultivo

El pH del medio de cultivo a lo largo de la cinética de crecimiento de *B. subtilis* Xer-15 presentó diferentes comportamientos dependiendo del sustrato que se analizó (Figura 47), así se pudo notar que en la harina de limón persa se dio un aumento de una unidad de pH con respecto al valor inicial del medio de cultivo. Sin embargo, en los otros sustratos se observó una disminución del pH que va desde moderada (CMC) hasta considerable en el medio con xilano (más de una unidad). En el medio de cultivo adicionado con pectina cítrica fue aun más notoria la disminución del pH, pues este medio fue ajustado a pH 6.0 antes de su esterilización, sin embargo, en el tiempo inicial de inoculación (t_0) se apreció una disminución (pH 5.0), este comportamiento puede deberse a la liberación del ácido galacturónico que conforma la pectina causada por el proceso de esterilización previo al inóculo del microorganismo, de igual forma, este factor (pH ácido) puede ser el responsable del nulo crecimiento de la cepa Xer-15 en este sustrato pues el crecimiento de la mayoría de las cepas de *Bacillus* está asociado a pH neutros (Calvo y Zuñiga, 2010).

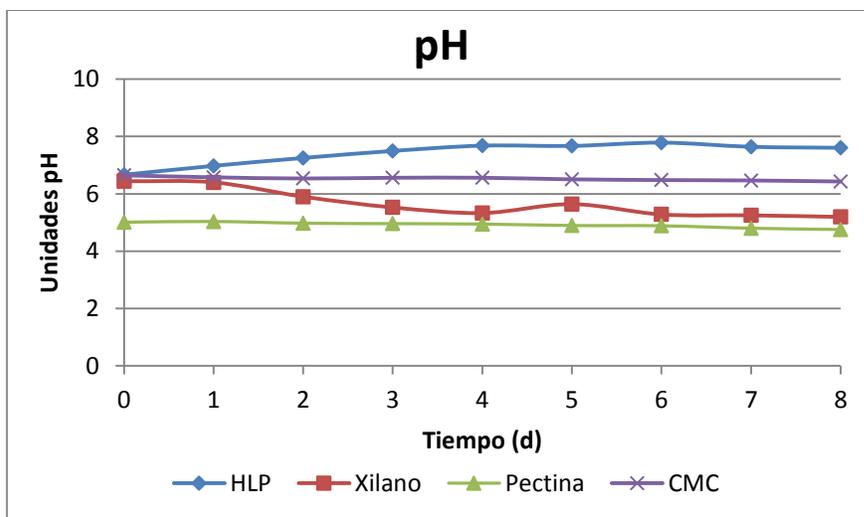


Figura 47. Cambio del pH en el medio de cultivo a lo largo de la cinética de la cepa *Bacillus subtilis* Xer-15 en diferentes sustratos.

De acuerdo con Calvo y Zuñiga (2010), las bacterias del género *Bacillus* pueden ocasionar disminución del pH del medio de cultivo debido a la producción de ácidos en presencia de glucosa, que podría ser el caso del sustrato CMC; con respecto al xilano, la disminución del pH del medio puede ser ocasionada por la liberación del ácido ferúlico o galacturónico que puede estar conformando la molécula de xilano. El incremento en el pH observado en el sustrato HLP pudo ser ocasionado porque las cepas de *Bacillus* hidrolizan las proteínas a través de la producción de proteasas alcalinas, liberando de esta manera ion amonio al medio de cultivo (Annamali et al., 2012; Josephine et al., 2017), o bien a la producción de proteasas alcalinas (Manabe et al., 2013).

d) Contenido de proteína en sobrenadantes

La mayor cantidad de proteína en el sobrenadante de la cepa *B. subtilis* Xer-15 se alcanzó en HLP, a los 6 días del cultivo, con 0.085 ± 0.016 mg/ml (Figura 48), seguido de xilano con 0.078 ± 0.011 mg/ml a los 3 días de crecimiento. En el sustrato CMC no se observó presencia de proteínas en el sobrenadante.

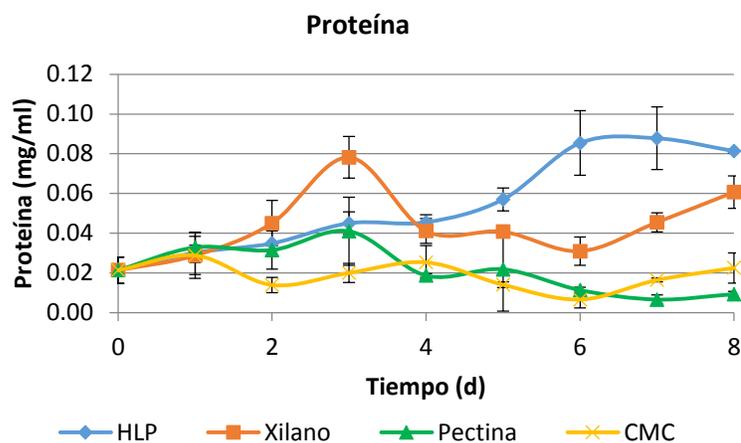


Figura 48. Cuantificación del contenido de proteína en sobrenadantes de la cepa Xer-15 crecida en diferente fuente de carbono.

La presencia de proteínas en el sobrenadante está relacionada directamente con la producción de enzimas extracelulares pues las diferentes especies de *Bacillus* sintetizan y excretan una gran cantidad de enzimas proteolíticas y otras hidrolasas durante su crecimiento y esporulación (Espinosa de los Monteros et al., 2001).

e) Determinación de actividades enzimáticas

Durante el crecimiento de la cepa *Bacillus subtilis* Xer-15 en medio mineral adicionado con diferentes sustratos se evaluó la producción de diversas enzimas hidrolíticas, encontrándose que únicamente en la harina de limón persa fue posible la detección y cuantificación de proteasas y de xilanasas, esta última en muestras a las que se había agregado inhibidor de proteasas durante el muestreo periódico (Figura 49 y Tabla 32).

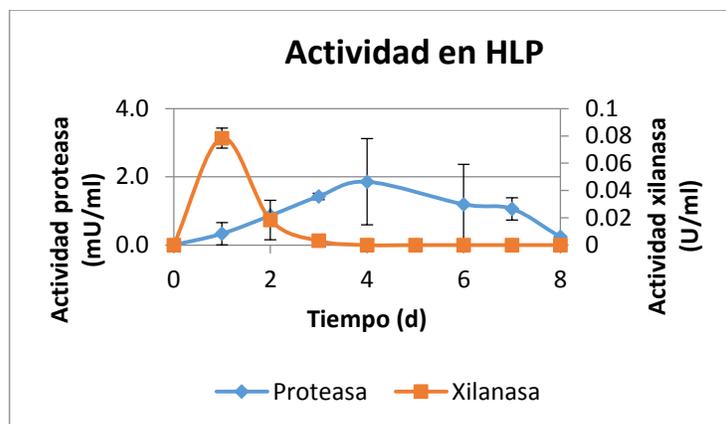


Figura 49. Actividad enzimática de los sobrenadantes de la cepa Xer-15 creciendo en harina de limón persa (pH 6.0, 40°C, 100 rpm)

Como puede observarse, se dio una disminución en la producción de xilanasas conforme aumentó la producción de proteasas, por lo que para poder emplear esta bacteria como agente hidrolítico en la obtención de bioetanol sería necesario utilizar inhibidores de proteasas para prevenir que éstas actúen sobre las otras enzimas hidrolíticas que pudieran estarse produciendo en el medio y que puedan resultar útiles en la hidrólisis de polisacáridos.

Tabla 32. Actividades hidrolíticas determinadas en los sobrenadantes de la cepa Xer-15 creciendo en distintas fuentes de carbono

Actividad enzimática	Fuente de carbono			
	HLP	Xilano	Pectina	CMC
Proteasa (mU/ml)	1.86 ± 1.26	ND	ND	ND
β-glucopiranosidasa	ND	ND	ND	ND
β-xilopiranosidasa	ND	ND	ND	ND
Celulasa	ND	ND	ND	ND
Xilanasas (U/ml)	0.078 ± 0.007	ND	ND	ND
Pectinasa	ND	ND	ND	ND
Amilasa	ND	ND	ND	ND

ND = No detectado

La producción de proteasas por cepas de *Bacillus* ha sido ampliamente reportada, siendo metabolitos producidos a la par del crecimiento y altamente influenciados por las condiciones de cultivo como pH, temperatura y agitación (Shine et al., 2016). Sin embargo, los valores obtenidos de actividad proteolítica para la cepa Xer-15 son menores a los reportados en la literatura, por ejemplo, Annamalai et al. (2014) indican que el crecimiento de

la cepa marina *Bacillus alveayuensis* CAS 5 en polvo de cáscara de camarón al 1% permitió obtener 2872 IU/ml de actividad proteasa. De igual forma Shine et al. (2016) reportan que *Bacillus cereus* RS3 aislado de suelo desértico pudo producir una máxima actividad específica de 118 U/ml, mientras que la cepa *Bacillus licheniformis* K-3 aislada por Singh y Bajaj (2017) tuvo la capacidad de producir 1321 U/ml de proteasa empleando biomasa de agujas de pino como fuente de carbono. La menor actividad encontrada para la cepa *B. subtilis* Xer-15 pudo ser ocasionada porque la agitación del medio no fuera la más indicada para la producción de esta enzima pues se sabe que la agitación incrementa la aereación del medio y así contribuye a mejorar el contacto entre el sustrato y el microorganismo, lo cual favorece un mejor rendimiento enzimático, por ejemplo *Bacillus* sp. BSS3 aislada de madera inundada presentó una actividad de 26.05 U/ml a pH 9 y 6 h de incubación, sin embargo, al incrementar la agitación a 150 rpm se incrementó la actividad celulolítica a 104.68 U/ml (Sreedevi et al., 2013).

Tomando en consideración que el sustrato HLP (5g/L) fue el medio en el cual se registró el mayor crecimiento de las bacterias ruminales Xer-15, Xer-18, Xer-19 y Xer-28 estudiadas y en el que se detectó actividad hidrolítica de los sobrenadantes de la cepa Xer-15, se realizaron nuevas determinaciones de actividad enzimática incluyendo un inhibidor de proteasas para evitar la degradación de las enzimas producidas. Las actividades que pudieron cuantificarse en esta fuente de carbono fueron actividad celulasa y xilanasas en las cuatro cepas de *Bacillus* estudiadas, siendo la cepa Xer-19 la que presentó mayor actividad con 12 y 28 mU/ml (miliunidades), respectivamente (Figura 50).

La máxima producción de celulasas y xilanasas para la cepa *B. subtilis* Xer-15 se presentó al final de la fase log, mientras que la producción de estas dos enzimas para la cepa *B. subtilis* Xer-18 se dio en la fase de decaimiento celular; y la de la cepa *B. subtilis* Xer-28 al final de la fase exponencial. Por otro lado la cepa *Bacillus* sp. Xer-19 presentó la máxima producción de xilanasas al final de la fase exponencial y la de celulasa en la fase estacionaria (Figura 50). *B. subtilis* presenta un control temporal al terminar el crecimiento exponencial, lo que le permite llevar a cabo una serie de cambios tanto estructurales como metabólicos que culminan con la formación de esporas (Espinosa de los Monteros, 2015).

Numerosas especies de *Bacillus* han sido reportadas como productoras de celulasas (Abou-Taleb *et al.*, 2009). La cepa *B. amyloliquefaciens* UNPDV-22 se aisló de muestras de aguas termales en Unapdev, India y se encontró que produce 8.62U/ml de actividad celulasa en medio de cultivo adicionado de salvado de trigo y pasta de soya después de 48 h de incubación, a una temperatura de incubación de 44.24°C, pH de 5.25 y 4.95% de inóculo (Vasudeo y Lew, 2011). *Bacillus subtilis*, *B. megaterium* y *B. amyloliquefaciens* aisladas de suelo, *Bacillus pumilis* de biomasa en descomposición, *Paenibacillus polymyxa* y *Brevibacillus* sp. de composta son de las especies más estudiadas para la producción de celulasas (Lynd *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2008; Tamaru *et al.*, 2010).

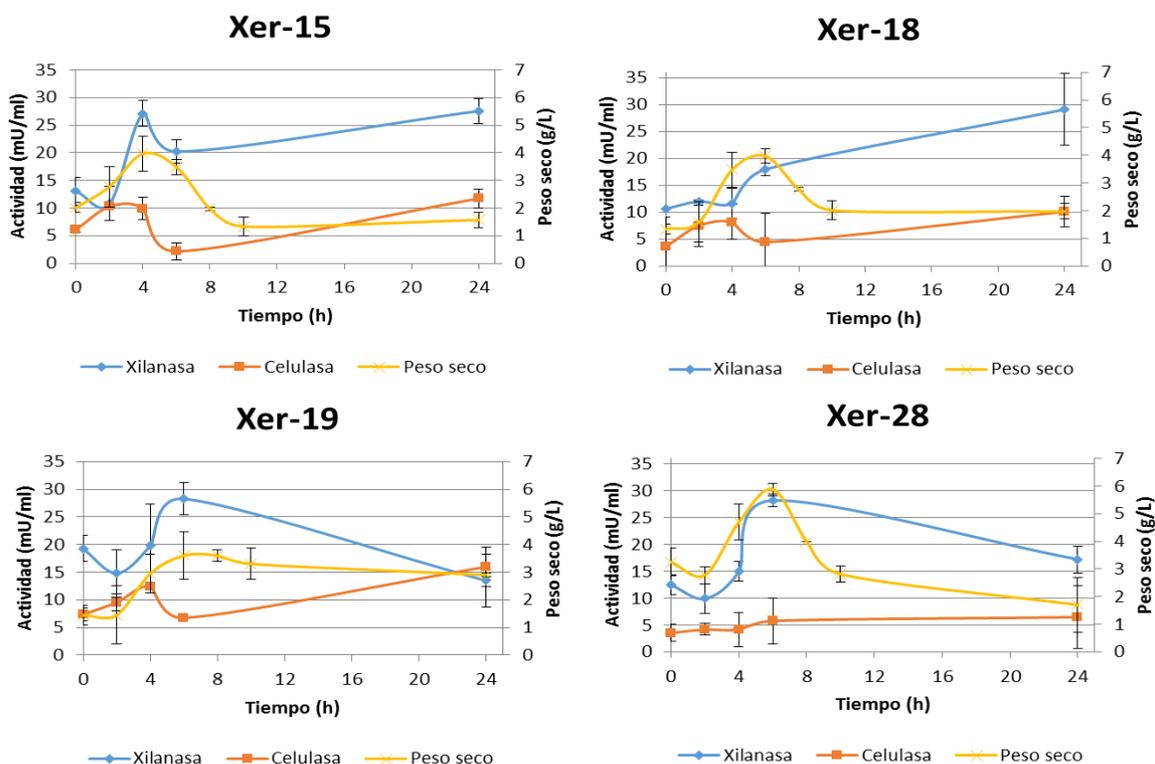


Figura 50. Actividad celulasa y xilanasas de sobrenadantes de bacterias ruminales creciendo en harina de limón persa con inhibidor de proteasa.

Con esta prueba se detectó que todas las bacterias aisladas de líquido ruminal evaluadas tienen la capacidad de degradar carboximetil celulosa e indican su capacidad de producir celulasas y xilanasas.

Por otro lado, la actividad β -glucosidasa se detectó en sobrenadantes de las bacterias ruminales creciendo en harina de limón persa y concentrados en membranas de exclusión de 3 kD, mediante zimogramas usando pNPG como sustrato. En la electroforesis en gel de acrilamida SDS 12% (Figura 51A) se detectaron bandas de proteína de diverso peso molecular en los sobrenadantes concentrados siendo más intensa la encontrada para la cepa *Bacillus* sp. Xer-19 aproximadamente equivalente a 8 KD. En el zimograma se obtuvo que la cepa *Bacillus* sp. Xer-19 fue la que presentó mayor actividad β -glucosidasa (Figura 51B carril 5).

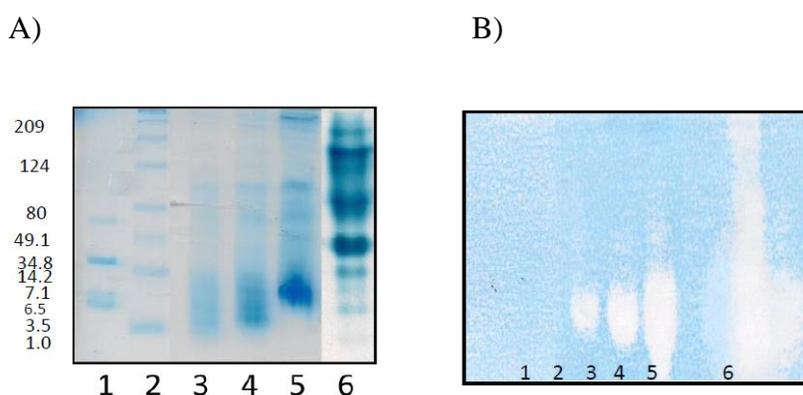


Figura 51. Electroforesis en gel de acrilamida SDS 12% de sobrenadantes concentrados: A) Revelado con azul de Coomassie y B) Zimograma actividad β -glucosidasa 2 μ g proteína/ μ l sobrenadante. Carriles: 1. Marcador de peso molecular bajo rango, 2. Marcador de peso molecular amplio rango, 3. Xer-15, 4. Xer-18, 5. Xer-19, 6. Celluclast

La producción de β -glucosidasa ha sido reportada para diferentes bacterias por Dias et al. (2015), por ejemplo, para *Bacillus amyloliquefaciens* (22.4 ± 2.7 IU/ml), quienes indican que se buscan cepas con alta velocidad de crecimiento y habilidad de desarrollarse en diferentes sustratos y condiciones medioambientales y con alta tasa de producción extracelular de enzimas, especialmente considerando que la β -glucosidasa tiene un amplio rango de aplicaciones en la producción de etanol, jugos, bebidas, fármacos y cosméticos.

La producción de diferentes celulasas por las cepas estudiadas resulta de gran importancia pues este tipo de enzima es ampliamente utilizado en la industria alimenticia, cervecera y del vino, textil y del papel. Actualmente, las celulasas representan un 20% del

mercado mundial de las enzimas, por lo que estas cepas de *Bacillus* también podrían tener una aplicación potencial en otras ramas industriales.

La cepa seleccionada para realizar cultivos secuenciales o mixtos fue la cepa *Bacillus* sp. Xer-19, pues con las pruebas realizadas se encontró evidencia de la producción de celulasas, xilanasas y β -glucosidasa que podrían permitir la ruptura de los polisacáridos que conforman la pared celular de la harina de limón persa para la liberación de azúcares fermentables.

CAPITULO VI

8.8. Establecimiento de los cultivos mixtos con los microorganismos seleccionados en medio sintético y complejo a base de cítricos.

El objetivo de este apartado fue establecer los cultivos mixtos para la producción de etanol, con la bacteria y la levadura previamente seleccionadas por sus características de producción de enzimas hidrolíticas o de fermentación, respectivamente.

8.1.1 Cultivo mixto en medio sintético

Se formuló un medio de cultivo considerando la proporción de polisacáridos reportadas para cáscaras de limón (Boluda-Aguilar y López-Gómez, 2013), tratando con ello de emular el sustrato industrial, incluyendo en su formulación celulosa, pectina cítrica, xilano, peptona y sales minerales.

En esta experiencia se realizaron 2 cultivos secuenciales y se compararon con el comportamiento de la levadura *K. marxianus* HY1 creciendo de manera individual en el medio sintético, el primer cultivo secuencial (CSE) consistió en inocular la cepa *Bacillus* sp. Xer-19 en el medio cítrico sintético, dejándola crecer durante 8 h y posteriormente esterilizando el medio e inoculando la levadura *K. marxianus* HY1; mientras que el segundo cultivo secuencial (CS) se realizó dejando crecer la cepa *Bacillus* sp. Xer-19 durante 8 h y al concluir este tiempo de hidrólisis se inoculó la levadura HY1 (sin esterilización del medio).

La cepa *K. marxianus* HY1 alcanzó mayor cantidad de biomasa al crecer de manera individual en el medio cítrico sintético, de igual forma consume más rápido la glucosa presente en el medio, comparado con los cultivos secuenciales (Figura 52). En los cultivos secuenciales CSE y CS se observó un ligero incremento en el peso seco posterior a la inoculación de la levadura *K. marxianus* HY1, sin embargo, este no continuó aumentando debido a que en el medio ya no se encontraba azúcar libre que permitiera el crecimiento de este microorganismo. El medio sintético formulado presentó un bajo contenido de glucosa libre (0.34 g/L) y cuando se cultivó la levadura de manera individual a las 4 horas

prácticamente ya no se encontraba este azúcar en el medio, mientras que en los cultivos secuenciales CSE y CS este agotamiento se da a las 8 h de cultivo y no se volvió a detectar glucosa en las siguientes horas de cultivo, lo que indica que aparentemente no hubo actividad hidrolítica de la cepa *Bacillus* sp. Xer-19 ocasionada probablemente porque en el medio de cultivo no se tenían inductores para la producción de celulasas, como se ha reportado para algunos microorganismos celulolíticos que requieren celobiosa y glucosa para iniciar la producción de enzimas (Amore et al., 2013). La producción de celulasas también requiere un incremento en la biomasa del microorganismo productor, condiciones nutricionales específicas y factores físico-químicos, como la temperatura y los pH definidos para cada especie (Castañeda y Sánchez, 2016).

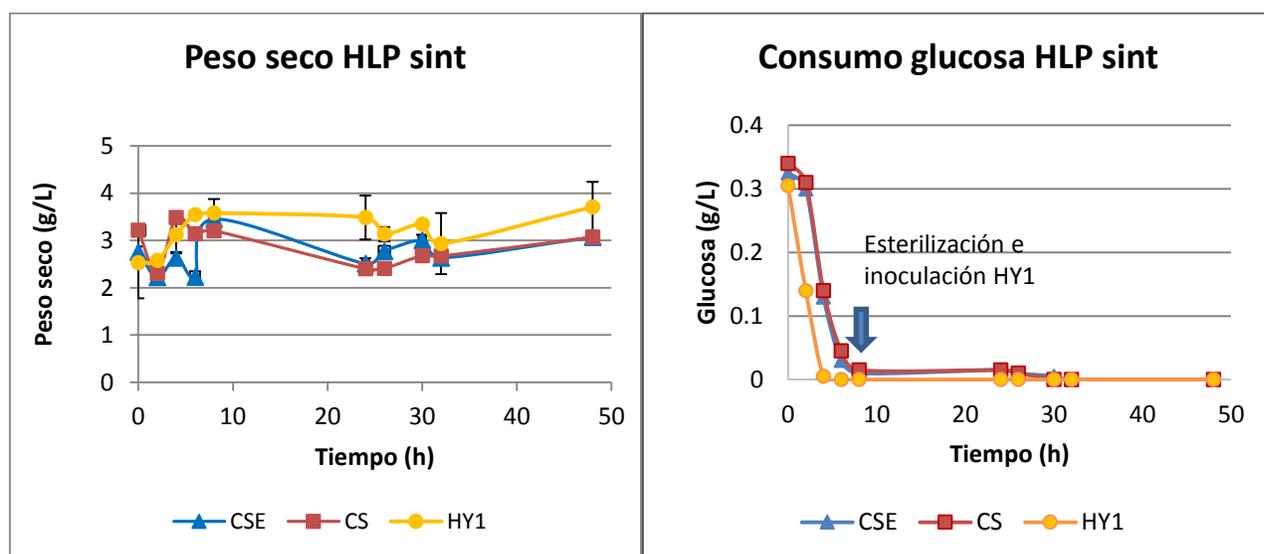


Figura 52. Cultivos secuenciales en harina cítrica sintética

Otra posible explicación de la ausencia de glucosa en el medio después de las 8 h de cultivo secuencial CS podría estar relacionada con el consumo inmediato de los oligosacáridos producidos a partir de la celulosa pues por ejemplo, en el rumen se ha reportado una tasa baja de detección de oligosacáridos pues son consumidos por los microorganismos ruminales en cuanto se liberan (Taguchi et al., 2004). Sin embargo, en este experimento no observó incremento en el peso seco después de las 8 h,

En este medio sintético no fue posible la detección de etanol ni en los cultivos secuenciales (CSE y CS) ni en el cultivo individual, por lo que se procedió a realizar el cultivo mixto empleando harina de limón como sustrato.

8.1.2 Cultivo mixto en HLP

Se variaron las proporciones de los inóculos para realizar cultivos mixtos con la bacteria *Bacillus* sp. Xer-19 y la levadura *K. marxianus* HY1 empleando como sustrato harina de limón persa suplementada con sales minerales, el inóculo de ambas cepas se realizó de manera simultánea al inicio de la fermentación. Las fermentaciones realizadas fueron las siguientes: Cepa HY1 100%, 70% HY1 y 30% Xer-19, 50% Hy1 y 50% Xer-19; 30% HY1 y 70% Xer-19.

La población de las cepas *K. marxianus* HY1 y *Bacillus* sp. Xer-19, así como la producción de etanol a lo largo del tiempo de cultivo se muestran en la Figura 53. En la fermentación de HLP con la cepa de levadura *K. marxianus* HY1 (individual, Figura 53a) se pudo observar un rápido incremento en el número inicial de células hasta alcanzar 51×10^6 cel/ml, sin embargo, a las 8 h de fermentación se presentó una disminución en el número celular y un nuevo incremento a partir de las 30h de cultivo. Este comportamiento es similar en todas las fermentaciones realizadas, es decir, disminución del número celular entre las 8 y las 30 h y posterior incremento. Lo anterior pudo ser ocasionado porque los microorganismos frecuentemente se enfrentan con cambios drásticos en su hábitat, siendo la disponibilidad de nutrientes y de oxígeno una de las más importantes, en este caso se tiene una concentración inicial de glucosa libre menor a 1 g/L (ver Figura 54) que se agota rápidamente. Estas fluctuaciones traen consigo cambios en su metabolismo celular, tales como ajustes en las rutas metabólicas y en las velocidades de utilización de las fuentes de carbono, en el flujo de electrones para el mantenimiento del balance redox, en los mecanismos para la producción de energía y en ciertas reacciones biosintéticas (Nakano y Zuber, 1998). Para cepas de *Kluyveromyces* se ha reportado la presencia de β -glucosidasas, que son enzimas de la familia de las β -glucanasas, y son responsables del catabolismo de una amplia gama de hidratos de carbono; pueden ser endo o exoglucanasas, cuya diferencia es el punto por el que inician la

hidrólisis del polisacárido (Schomburg y Schomburg, 2003) y que la cepa *K. marxianus* HY1 podría estar sintetizando para la hidrólisis de la celobiosa presente en la HLP.

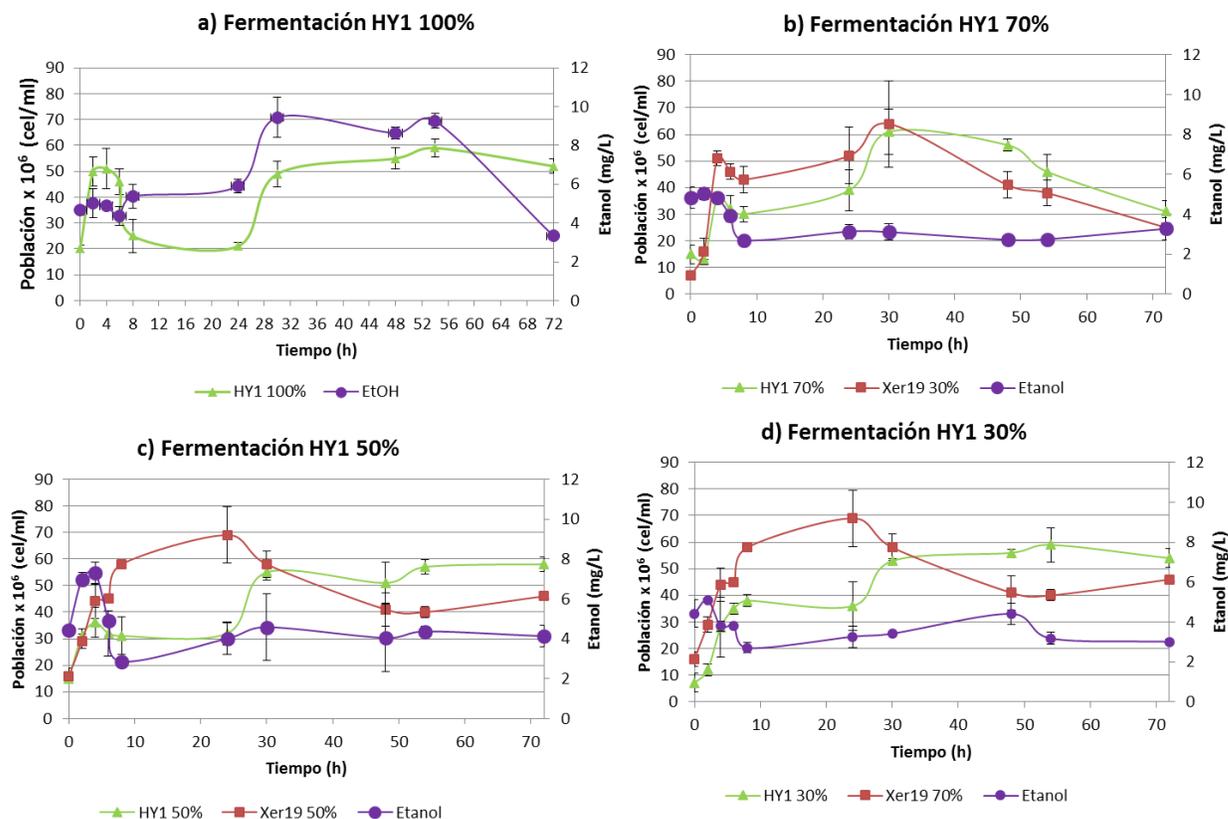


Figura 53. Población y producción de alcohol durante la fermentación de HLP, condiciones de cultivo: 40°C, 100 rpm, pH 6.0

En los cultivos mixtos en diferentes proporciones (Figura 53 b,c,d) se corroboró que la cepa *Bacillus* sp. Xer-19 presentó mayor velocidad de crecimiento que la levadura *K. marxianus* HY1, pues independientemente de su número inicial repunta rápidamente para superar en número a *Kluyveromyces*, aunque a mayor cantidad inicial de *Bacillus* sp. Xer-19 (Figura 53d) el tiempo de duplicación también se incrementa. También es de notar que durante los tiempos 8 a 30h se alcanzó la mayor población de Xer-19 y es cuando se da la disminución de la población de HY1, esto pudo ser ocasionado por la competencia que se da por los nutrientes del medio o bien a la producción de algún compuesto inhibitor por parte de la cepa bacteriana. Se ha reportado que las especies de *Bacillus* tales como *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* utilizan más del 8% de su equipamiento genético para sintetizar una amplia variedad de compuestos antimicrobianos entre los que se pueden mencionar enzimas líticas,

lantibióticos y una variedad de (lipo)péptidos y policétidos (Chenet al., 2009; Rückert et al., 2011, Cawoy et al., 2014). En particular, se sabe que *Bacillus subtilis* produce numerosos péptidos con actividad antifúngica y contra levaduras (por ejemplo, *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*), entre estos compuestos se incluyen Alboleutina, Bacitracina, Botrycidina, Clorotetaina, Fengycina, Iturinas y Rhizocitinas (Chitarra et al. 2003; Cawoy et al., 2014).

La producción de alcohol en HLP fue mayor cuando la cepa de levadura *K. marxianus* HY1 creció individualmente (Figura 53a), alcanzándose hasta 9.45 mg/L a las 30h de cultivo ($P_{max}= 0.315$ mg/L.h), con un $Y_{p/s}$ de 0.012 y una eficiencia fermentativa de 2.38%. Durante la cinética se observó una disminución en el contenido de etanol, que fue menor en el cultivo individual, esta reducción puede deberse a que los microorganismos estén asimilando el alcohol como fuente de carbono, lo cual ha sido reportado previamente para los dos géneros microbianos empleados.

En la figura 54 se presenta el consumo de glucosa en el cultivo mixto de la cepa *Bacillus* sp. Xer-19 y *K. marxianus* HY1, se puede observar que se tiene muy poca glucosa libre (menos de 1 g/L) y que este contenido no se incrementó con el tiempo (como ocurre en las hidrólisis químicas o enzimáticas), por lo que si existiera alguna liberación de este monosacárido sería utilizada rápidamente por los microorganismos involucrados en el cultivo mixto.

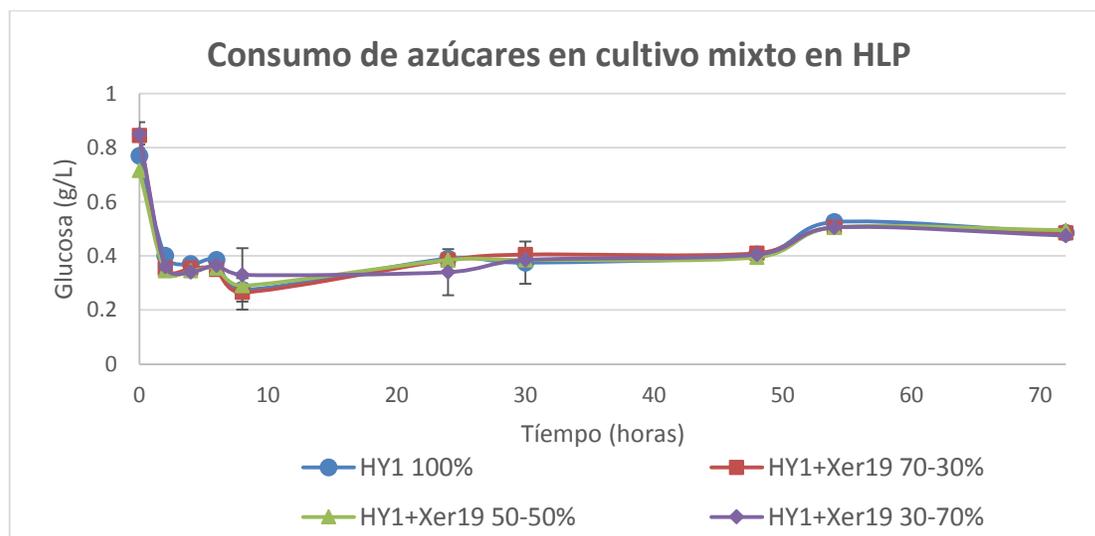


Figura 544. Consumo de glucosa durante la fermentación de HLP con diferentes proporciones de microorganismos.

Dado que la finalidad es obtener la mayor cantidad de etanol a partir de sustratos lignocelulósicos y que el tanto el cultivo individual como el cultivo mixto realizado no fueron eficientes en este aspecto, se decidió evaluar la fermentación de un hidrolizado enzimático de la harina de limón, con la finalidad de comparar los rendimientos obtenidos con la harina sin hidrolizar.

8.1.3 Fermentación de HLP hidrolizada enzimáticamente

Se obtuvo un hidrolizado de HLP mediante un proceso de sacarificación enzimática utilizando una enzima comercial (Celluclast) a 10 UPF en buffer citrato con pH 4.8 y una relación 1:20 (Lizardi-Jimenez et al., 2017), el cual fue utilizado para realizar una fermentación a nivel bioreactor de 3L. El hidrolizado obtenido se inoculó con la levadura *K. marxianus* HY1 (20×10^6 cel/ml) y se realizó un seguimiento de la producción de etanol por esta cepa. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 55.

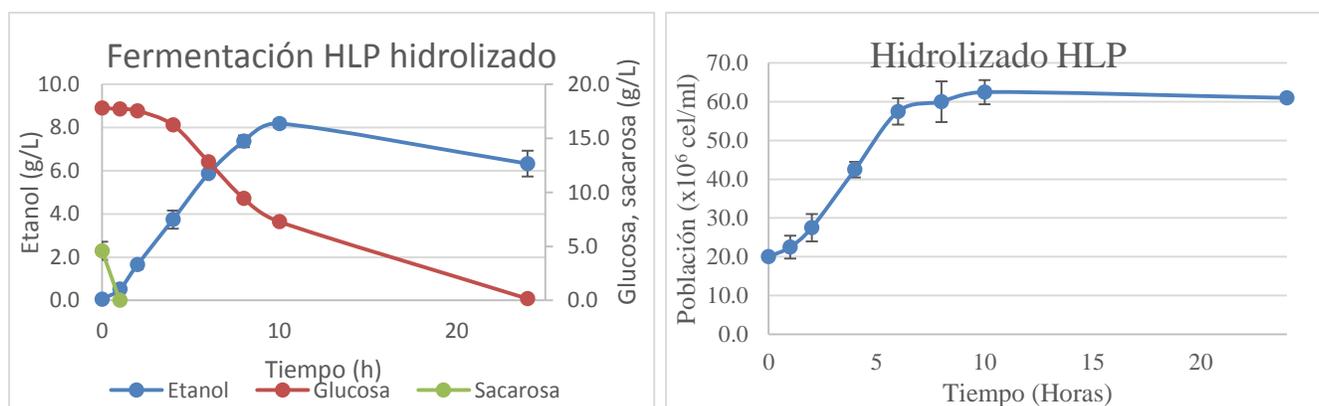


Figura 55. Cinética de fermentación de hidrolizado de HLP

La mayor cantidad de alcohol producida por la cepa *K. marxianus* HY1 en el hidrolizado de HLP fue de 8.18 ± 0.19 g/L a las 10h de cultivo, posteriormente se observó un ligero descenso en la concentración de este metabolito, lo cual puede atribuirse al consumo de este como fuente de energía por la levadura (Zhao et al., 2008). De igual forma, Abbi et al.,

(1996) reportaron el consumo de este metabolito por la levadura *Candida shehatae* NCL-3501.

En el hidrolizado enzimático se encontró un contenido de 23.54 g/L de azúcares (sumatoria de glucosa y sacarosa), y el consumo a las 10h fue de 16.27 g/L, lo que permitió obtener un rendimiento de producto en base a sustrato (Y_p/s) de 0.50 y una eficiencia de fermentación del 98.07%, mientras que la productividad máxima fue de 0.82 g/L.h Esta eficiencia fermentativa fue mucho mayor que cuando se realizó el cultivo de la cepa *K. marxianus* HY1 en HLP sin hidrolizar, sin embargo esta podría mejorarse al liberar mayor cantidad de azúcares, pues Domínguez-López (2014) reportó la liberación de 510 g de glucosa por Kg de harina de limón persa.

Estudios previos en residuos de cítricos han mostrado hidrólisis exitosas de cáscara de naranja y toronja, encontrándose glucosa, fructosa, galactosa, xilosa, arabinosa, ramnosa y ácido galacturónico empleando diferentes mezclas enzimáticas y la posterior fermentación de dichos hidrolizados a etanol utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* recombinante o una combinación de *S. cerevisiae* y *K. marxianus* (Grohmann et al., 1994, 1996; Wilkins et al., 2007a,b).

Los resultados obtenidos de la fermentación del hidrolizado de harina de limón fueron menores a los reportados por Oberoi et al., (2011), quienes realizan un hidrolizado de mandarina Kinnow utilizando celulasas y pectinasas y después de la optimización liberan 103.20 g/L de azúcares reductores (49.30 g/L de glucosa) y la fermentación con *S. cerevisiae* permitió obtener 42 g/L de etanol y una productividad de 3.5 g/L.h. Sin embargo estos resultados pueden deberse a la mayor eficiencia en la liberación de azúcares que indican Oberoi et al. (2011).

Los resultados aquí encontrados indican que la cepa *K. marxianus* HY1 podría aprovecharse para la fermentación eficiente de hidrolizados de residuos citrícolas o de otros de hidrolizados biomásico, mientras que la cepa *Bacillus* sp. Xer-19 podría emplearse para la obtención de enzimas celulolíticas y xilanolíticas que puedan posteriormente incorporarse a procesos de sacarificación y fermentación simultánea.

9. CONCLUSIONES

Los factores pH, temperatura y velocidad de agitación, así como sus interacciones, tienen influencia sobre los parámetros cinéticos de crecimiento y producción de las levaduras silvestres estudiadas, siendo particular para cada una de ellas las condiciones de cultivo que les permitan crecer y fermentar de manera más eficiente.

Cuando se desea tener mayor población, peso seco y velocidad de crecimiento, así como menor tiempo de duplicación, es necesario utilizar condiciones de cultivo que incluyan agitación (250 rpm), pues estas favorecen la producción de biomasa. Los parámetros de productividad se ven afectados por los distintos factores, que también están relacionados con la cepa utilizada, siendo el principal la agitación.

Las mejores condiciones para el crecimiento de las levaduras silvestres *K. marxianus* MG, API-2 y L4B, *C. glabrata* N1 y *W. anomalus* API-1, correspondieron a 30 °C, pH 5.5 y 250 rpm, mientras que para la cepa *K. marxianus* HY1 se podrían emplear las condiciones de 30 °C, pH 5.5 y 250 rpm o bien, 40 °C, pH 5.5 y 250 rpm, pues ambas son iguales estadísticamente. La mejor condición para la fermentación de todas las levaduras silvestres estudiadas fue 40 °C, pH 4.5 y 0 rpm.

Durante el crecimiento de las bacterias ruminales *B. subtilis* Xer-15, Xer-18 y Xer-28 y *Bacillus* sp. Xer-19 en medio sintético con celobiosa como fuente de carbono, se encontró que los factores temperatura y pH, así como su interacción, tuvieron efecto estadísticamente significativo sobre las respuestas: población (ΔP_{ob}), biomasa (ΔX) y velocidad de consumo de sustrato (r_s).

Las mejores condiciones para el crecimiento de las cepas *B. subtilis* Xer-15, Xer-18 y Xer-28 fueron 40 °C y pH 6.0, mientras que para la cepa *Bacillus* sp. Xer-19 fueron 40°C y pH 7.0, aunque para ésta última también podría considerarse el crecimiento a 40°C y pH 5.0, porque fueron iguales estadísticamente.

Las cepas más prometedoras en cuanto a producción de etanol a partir de diferentes fuentes de carbono fueron *K. marxianus* HY1 y L4B, pues además de los azúcares

CONCLUSIONES

tradicionalmente asimilados pueden utilizar galactosa, aunque destacó la cepa *K. marxianus* L4B por producir la mayor cantidad de este metabolito en los diferentes azúcares, sin embargo se seleccionó la cepa *K. marxianus* HY1 por presentar mayor espectro de asimilación de monosacáridos.

Aun cuando algunas cepas pudieron utilizar la xilosa para el crecimiento ninguna presentó capacidad para producir alcohol a partir de este sustrato en las condiciones empleadas. Existió diferencia estadísticamente significativa (con un nivel de confianza del 95%) entre las diferentes variables respuesta estudiadas, tanto de crecimiento como de producción, siendo los valores alcanzados dependientes tanto de la fuente de carbono utilizada como de la cepa.

Las bacterias ruminales *Bacillus subtilis* Xer-15, Xer-18 y Xer-28, así como la cepa *Bacillus* sp. Xer-19 tuvieron capacidad de producir proteasas, así como celulasas, xilanasas y β -glucosidasas, destacando como la mejor productora la cepa *Bacillus* sp. Xer-19 al producir 12 mU/ml de celulasas y 28 mU/ml de xilanasas.

Los cultivos mixtos realizados tuvieron un muy bajo rendimiento de etanol a las condiciones empleadas, en donde se observó la dinámica poblacional durante la fermentación y considerando que la competencia por nutrientes o la posible producción de algún compuesto antimicrobiano por la cepa *Bacillus* sp. Xer-19 ocasionaron una disminución en la producción del metabolito, o bien la misma complejidad del medio de cultivo impidió la utilización de los azúcares ahí presentes.

Al realizar la fermentación de hidrolizados enzimáticos de limón persa con la cepa *K. marxianus* HY1 se alcanzó 8.18 g/L de etanol a las 10h de fermentación, con una alta eficiencia (98%), que indica que esta cepa podría utilizarse eficientemente para la fermentación de hidrolizados biomásicos.

10. RECOMENDACIONES

- 1) Aislar y purificar las hidrolasas producidas por las bacterias ruminales estudiadas para establecer su caracterización y poder producirlas en mayor cantidad en sustratos lignocelulósicos, como la cáscara de cítricos, para su utilización en las etapas de hidrólisis.
- 2) Evaluar nuevas tecnologías de pretratamiento para liberar la mayor cantidad de monosacáridos de la biomasa cítrica a fin de tenerlos disponibles para su fermentación por las levaduras silvestres.
- 3) Realizar cultivos mixtos con diferentes tipos de levaduras silvestres para incrementar la cantidad de alcohol obtenido al asimilar diferentes mono y disacáridos, mediante diferentes rutas metabólicas.
- 4) Realizar la cuantificación de xilitol y ácidos orgánicos mediante técnicas cromatográficas para tener un perfil más amplio de los metabolitos producidos por los microorganismos en estudio.

11. ANEXO 1. Análisis estadístico

a) Análisis de varianza y gráfico de interacción para el parámetro población levaduras silvestres

Cepa MG Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temp	66693.1	1	66693.1	470.94	0.0000
B:pH	1660.56	1	1660.56	11.73	0.0076
C:Agitación	48510.1	1	48510.1	342.54	0.0000
AB	6440.06	1	6440.06	45.47	0.0001
AC	10557.6	1	10557.6	74.55	0.0000
BC	105.063	1	105.063	0.74	0.4114
Error total	1274.56	9	141.618		
Total (corr.)	135241.	15			

Gráfico de Interacciones

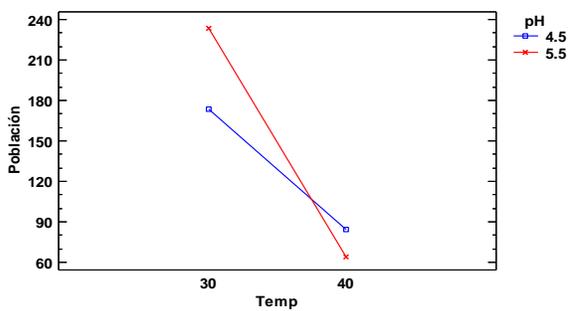
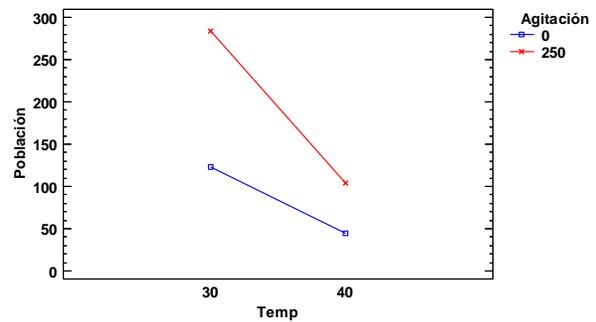


Gráfico de Interacciones



Cepa HY1 Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temp	6724.0	1	6724.0	1.40	0.2677
B:pH	31684.0	1	31684.0	6.58	0.0304
C:Agitación	981090.	1	981090.	203.69	0.0000
AB	47524.0	1	47524.0	9.87	0.0119
AC	11772.3	1	11772.3	2.44	0.1524
BC	37830.3	1	37830.3	7.85	0.0206
Error total	43350.3	9	4816.69		
Total (corr.)	1.15998E6	15			

Gráfico de Interacciones

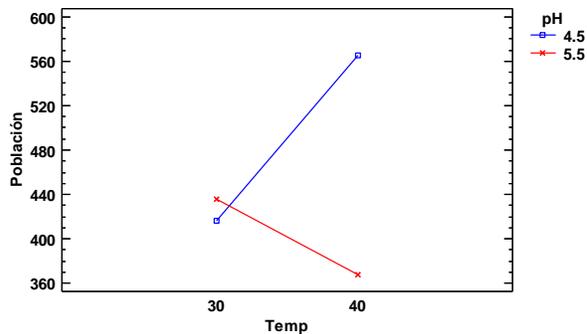
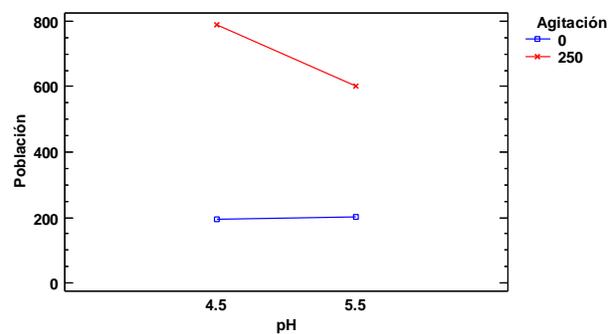


Gráfico de Interacciones

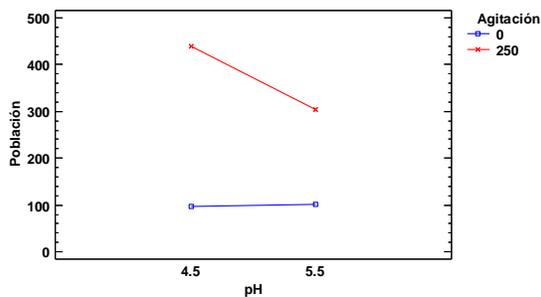


ANEXO 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cepa API-2 Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temp	4257.56	1	4257.56	3.85	0.0814
B:pH	16835.1	1	16835.1	15.22	0.0036
C:Agitación	295121.	1	295121.	266.78	0.0000
AB	3393.06	1	3393.06	3.07	0.1138
AC	280.563	1	280.563	0.25	0.6266
BC	19251.6	1	19251.6	17.40	0.0024
RESIDUOS	9956.06	9	1106.23		
TOTAL (CORREGIDO)	349094.	15			

Gráfico de Interacciones



Cepa API-1 Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	80899.2	1	80899.2	1404.50	0.0000
B:pH	2305.63	1	2305.63	40.03	0.0004
C:Agitación	183553.	1	183553.	3186.68	0.0000
INTERACCIONES					
AB	1888.13	1	1888.13	32.78	0.0007
AC	15904.8	1	15904.8	276.13	0.0000
BC	10944.3	1	10944.3	190.01	0.0000
RESIDUOS	403.2	7	57.6		
TOTAL (CORREGIDO)	363190.	13			

Cepa N1 Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	24806.3	1	24806.3	3.93	0.0786
B:pH	25440.3	1	25440.3	4.04	0.0755
C:Agitación	1.76358E6	1	1.76358E6	279.75	0.0000
INTERACCIONES					
AB	75625.0	1	75625.0	12.00	0.0071
AC	218556.	1	218556.	34.67	0.0002
BC	102080.	1	102080.	16.19	0.0030
RESIDUOS	56737.0	9	6304.11		
TOTAL (CORREGIDO)	2.26683E6	15			

b) Análisis de varianza y gráfico de interacciones para el parámetro peso seco para levaduras silvestres

Cepa MG

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
--------	-------------------	----	----------------	---------	---------

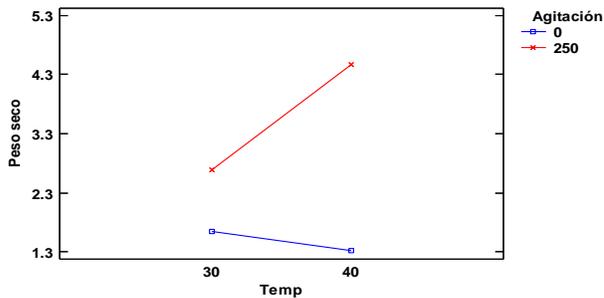
ANEXO 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A:Temp	3.19219	1	3.19219	57.02	0.0000
B:pH	0.0782037	1	0.0782037	1.40	0.2675
C:Agitación	7.20026	1	7.20026	128.62	0.0000
AB	0.0897906	1	0.0897906	1.60	0.2371
AC	0.000100015	1	0.000100015	0.00	0.9672
BC	0.00941273	1	0.00941273	0.17	0.6914
Error total	0.503835	9	0.0559817		
Total (corr.)	11.0738	15			

Cepa HY1

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temp	2.18249	1	2.18249	51.73	0.0001
B:pH	0.0425843	1	0.0425843	1.01	0.3413
C:Agitación	17.6765	1	17.6765	418.94	0.0000
AB	0.0284396	1	0.0284396	0.67	0.4329
AC	4.3848	1	4.3848	103.92	0.0000
BC	0.157101	1	0.157101	3.72	0.0857
Error total	0.379744	9	0.0421938		
Total (corr.)	24.8516	15			

Gráfico de Interacciones



Cepa API-2

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temp	0.116268	1	0.116268	0.77	0.4058
B:pH	0.290473	1	0.290473	1.92	0.2028
C:Agitación	27.8832	1	27.8832	184.69	0.0000
AB	0.361156	1	0.361156	2.39	0.1605
AC	0.208617	1	0.208617	1.38	0.2736
BC	0.0546994	1	0.0546994	0.36	0.5639
Error total	1.20776	8	0.15097		
Total (corr.)	31.2254	14			

API-1

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	5.14863	1	5.14863	85.34	0.0000
B:pH	0.926287	1	0.926287	15.35	0.0058
C:Agitación	4.23281	1	4.23281	70.16	0.0001
INTERACCIONES					
AB	0.00300878	1	0.00300878	0.05	0.8297
AC	0.34345	1	0.34345	5.69	0.0485
BC	0.0169531	1	0.0169531	0.28	0.6124
RESIDUOS	0.422334	7	0.0603334		
TOTAL (CORREGIDO)	13.4388	13			

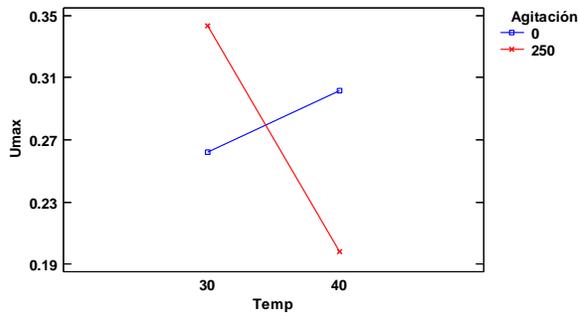
ANEXO 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

c) Análisis de varianza y gráfico de interacción para el parámetro μ_{max} levaduras silvestres

MG Análisis de Varianza para Umax - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.0112802	1	0.0112802	3.22	0.1064
B:pH	0.0158763	1	0.0158763	4.53	0.0622
C:Agitación	0.000498461	1	0.000498461	0.14	0.7148
INTERACCIONES					
AB	0.00107422	1	0.00107422	0.31	0.5933
AC	0.034028	1	0.034028	9.71	0.0124
BC	0.000272522	1	0.000272522	0.08	0.7866
RESIDUOS	0.0315364	9	0.00350404		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0945661	15			

Gráfico de Interacciones



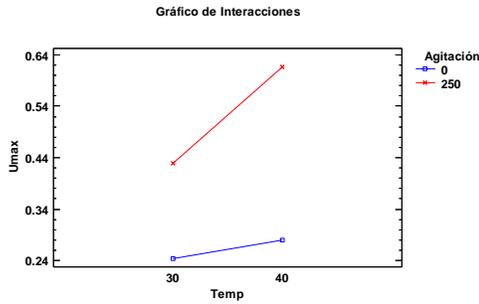
HY1 Análisis de Varianza para Umax - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.17075	1	0.17075	16.99	0.0026
B:pH	0.0363117	1	0.0363117	3.61	0.0898
C:Agitación	0.282228	1	0.282228	28.08	0.0005
INTERACCIONES					
AB	0.0377052	1	0.0377052	3.75	0.0848
AC	0.0458813	1	0.0458813	4.56	0.0614
BC	0.0444074	1	0.0444074	4.42	0.0649
RESIDUOS	0.0904719	9	0.0100524		
TOTAL (CORREGIDO)	0.707756	15			

API-2 Análisis de Varianza para Umax - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.0446388	1	0.0446388	12.82	0.0072
B:pH	0.0105725	1	0.0105725	3.04	0.1195
C:Agitación	0.242784	1	0.242784	69.75	0.0000
INTERACCIONES					
AB	0.018246	1	0.018246	5.24	0.0513
AC	0.0203539	1	0.0203539	5.85	0.0420
BC	0.000848658	1	0.000848658	0.24	0.6347
RESIDUOS	0.0278476	8	0.00348095		
TOTAL (CORREGIDO)	0.373115	14			

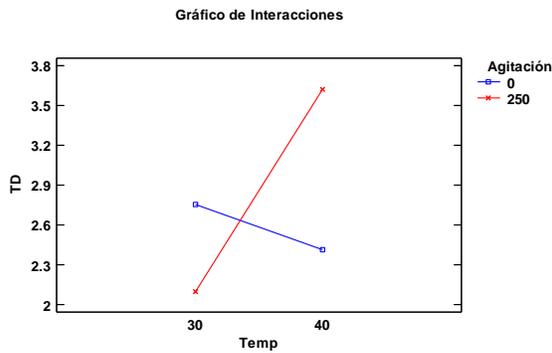
ANEXO 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO



d) Análisis de varianza para el parámetro TD levaduras silvestres

MG Análisis de Varianza para TD - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	1.39192	1	1.39192	3.36	0.1002
B:pH	0.952434	1	0.952434	2.30	0.1640
C:Agitación	0.294901	1	0.294901	0.71	0.4209
INTERACCIONES					
AB	0.0362683	1	0.0362683	0.09	0.7741
AC	3.47635	1	3.47635	8.38	0.0177
BC	0.117308	1	0.117308	0.28	0.6077
RESIDUOS	3.73241	9	0.414712		
TOTAL (CORREGIDO)	10.0016	15			



HY1 Análisis de Varianza para TD - Suma de Cuadrados Tipo III

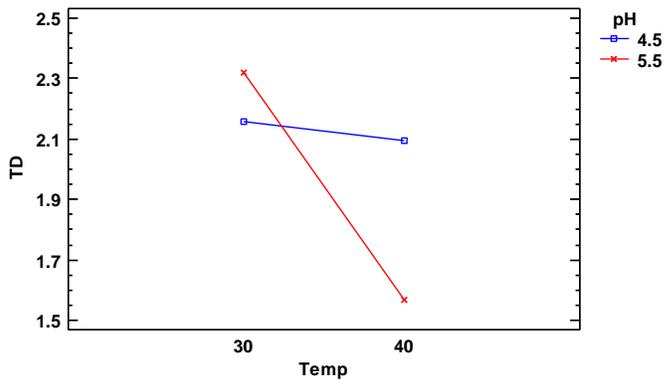
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	1.54351	1	1.54351	11.97	0.0072
B:pH	0.0432919	1	0.0432919	0.34	0.5765
C:Agitación	3.01989	1	3.01989	23.43	0.0009
INTERACCIONES					
AB	0.361753	1	0.361753	2.81	0.1282
AC	0.027414	1	0.027414	0.21	0.6556
BC	0.337545	1	0.337545	2.62	0.1401
RESIDUOS	1.16015	9	0.128905		
TOTAL (CORREGIDO)	6.49355	15			

ANEXO 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

API-2 Análisis de Varianza para TD - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.604401	1	0.604401	8.49	0.0195
B:pH	0.119071	1	0.119071	1.67	0.2319
C:Agitación	5.94548	1	5.94548	83.56	0.0000
INTERACCIONES					
AB	0.423822	1	0.423822	5.96	0.0405
AC	0.0153817	1	0.0153817	0.22	0.6544
BC	0.00689294	1	0.00689294	0.10	0.7636
RESIDUOS	0.569194	8	0.0711492		
TOTAL (CORREGIDO)	7.8672	14			

Gráfico de Interacciones

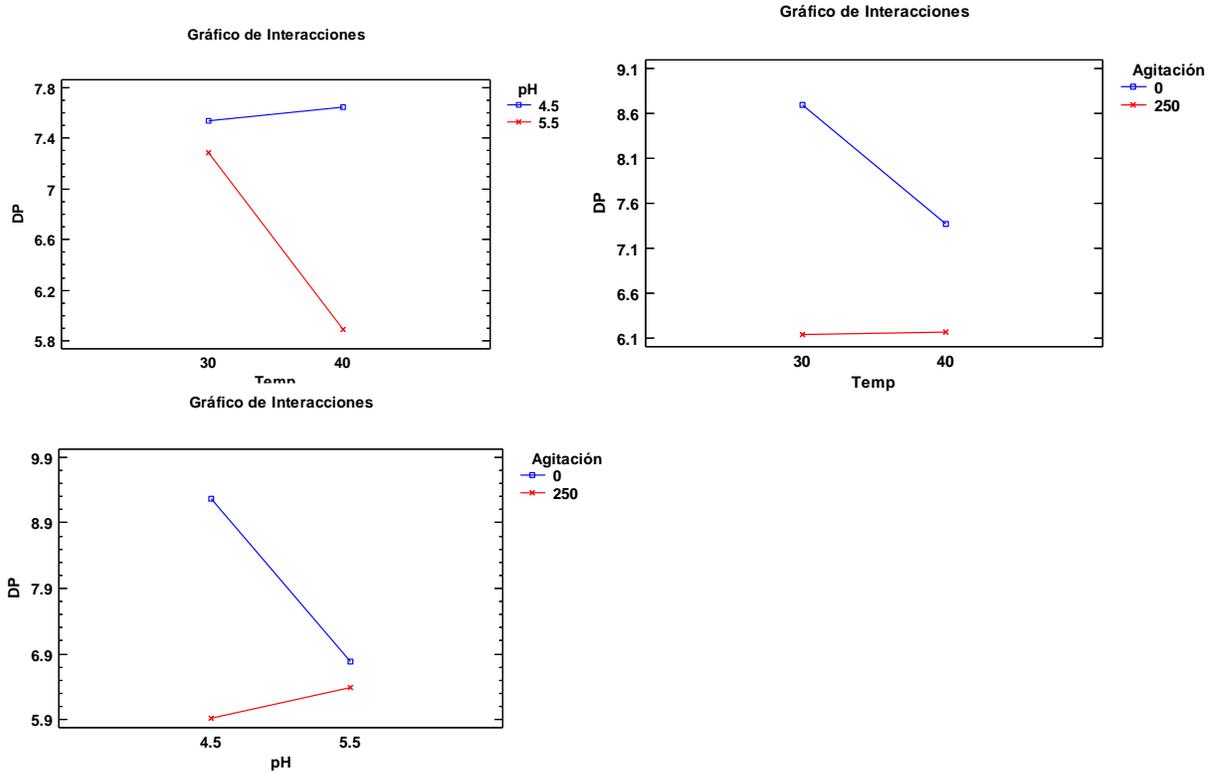


e) Análisis de varianza para el parámetro ΔP levaduras silvestres

MG Análisis de Varianza para DP - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	1.6612	1	1.6612	5.77	0.0397
B:pH	4.02787	1	4.02787	14.00	0.0046
C:Agitación	14.049	1	14.049	48.83	0.0001
INTERACCIONES					
AB	2.25922	1	2.25922	7.85	0.0206
AC	1.83296	1	1.83296	6.37	0.0326
BC	8.62996	1	8.62996	30.00	0.0004
RESIDUOS	2.58934	9	0.287705		
TOTAL (CORREGIDO)	35.0496	15			

ANEXO 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO



HY1 Análisis de Varianza para DP - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	1.52394	1	1.52394	13.38	0.0053
B:pH	7.55048	1	7.55048	66.27	0.0000
C:Agitación	7.31563	1	7.31563	64.21	0.0000
INTERACCIONES					
AB	0.0411055	1	0.0411055	0.36	0.5629
AC	0.162911	1	0.162911	1.43	0.2623
BC	0.419575	1	0.419575	3.68	0.0872
RESIDUOS	1.02545	9	0.113938		
TOTAL (CORREGIDO)	18.0391	15			

API-2 Análisis de Varianza para DP - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.714329	1	0.714329	6.76	0.0354
B:pH	1.31962	1	1.31962	12.48	0.0096
C:Agitación	0.233649	1	0.233649	2.21	0.1807
INTERACCIONES					
AB	0.184996	1	0.184996	1.75	0.2274
AC	0.0942061	1	0.0942061	0.89	0.3766
BC	0.113841	1	0.113841	1.08	0.3339
RESIDUOS	0.73989	7	0.105699		
TOTAL (CORREGIDO)	3.33985	13			

ANEXO 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

f) Análisis de varianza para el parámetro Pmax levaduras silvestres

MG Análisis de Varianza para Pmax - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.168401	1	0.168401	330.21	0.0000
B:pH	0.00485384	1	0.00485384	9.52	0.0130
C:Agitación	0.009248	1	0.009248	18.13	0.0021
INTERACCIONES					
AB	0.0805558	1	0.0805558	157.96	0.0000
AC	0.058309	1	0.058309	114.34	0.0000
BC	0.028486	1	0.028486	55.86	0.0000
RESIDUOS	0.00458979	9	0.000509977		
TOTAL (CORREGIDO)	0.354443	15			

Gráfico de Interacciones

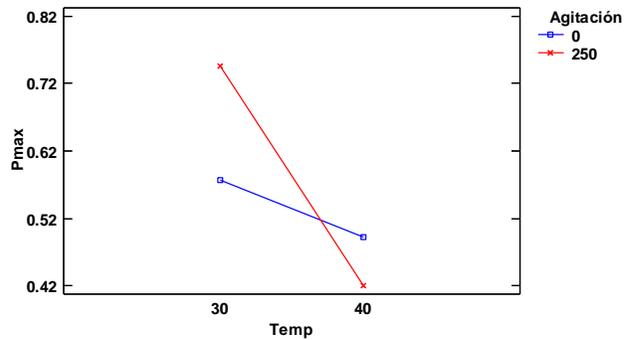
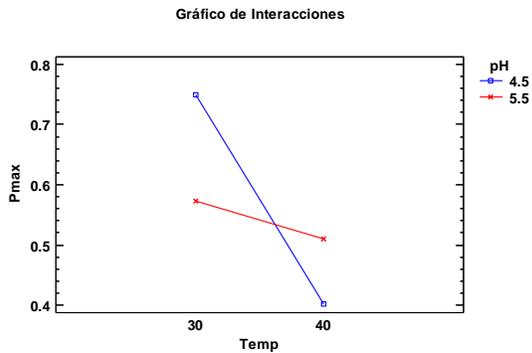
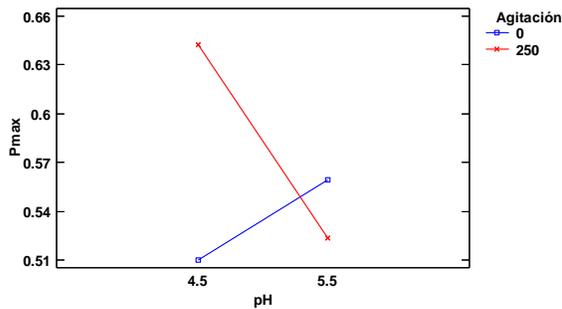


Gráfico de Interacciones



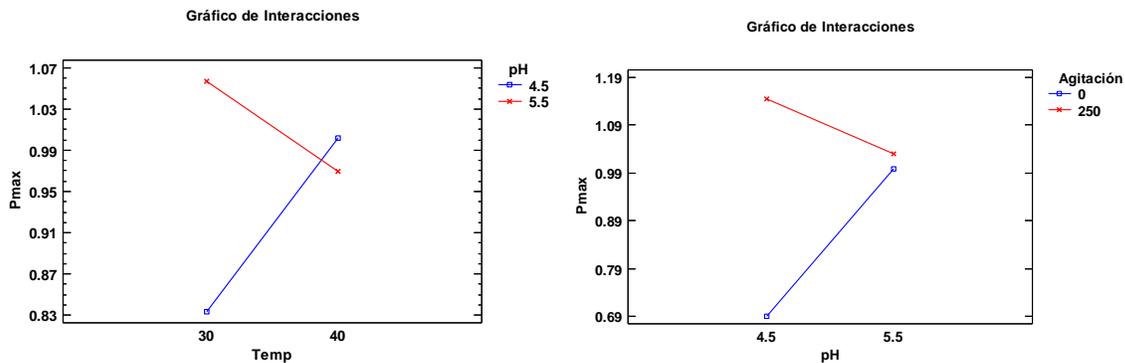
HY1 Análisis de Varianza para Pmax - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.321061	1	0.321061	14.89	0.0039
B:pH	0.00185634	1	0.00185634	0.09	0.7758
C:Agitación	0.0608658	1	0.0608658	2.82	0.1272
INTERACCIONES					
AB	0.00402901	1	0.00402901	0.19	0.6757
AC	0.0192619	1	0.0192619	0.89	0.3692
BC	0.0996307	1	0.0996307	4.62	0.0601
RESIDUOS	0.194018	9	0.0215575		
TOTAL (CORREGIDO)	0.700723	15			

ANEXO 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

API-2 Análisis de Varianza para Pmax - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.0065281	1	0.0065281	2.14	0.1771
B:pH	0.0365335	1	0.0365335	12.00	0.0071
C:Agitación	0.235205	1	0.235205	77.26	0.0000
INTERACCIONES					
AB	0.0654007	1	0.0654007	21.48	0.0012
AC	0.000855731	1	0.000855731	0.28	0.6088
BC	0.178385	1	0.178385	58.60	0.0000
RESIDUOS	0.0273989	9	0.00304433		
TOTAL (CORREGIDO)	0.550307	15			



g) Análisis de varianza para el parámetro Ptotal levaduras silvestres

MG Análisis de Varianza para Ptotal - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.000169143	1	0.000169143	0.08	0.7895
B:pH	0.00558398	1	0.00558398	2.50	0.1485
C:Agitación	0.0304314	1	0.0304314	13.61	0.0050
INTERACCIONES					
AB	0.0105708	1	0.0105708	4.73	0.0577
AC	0.00468041	1	0.00468041	2.09	0.1819
BC	0.00315327	1	0.00315327	1.41	0.2654
RESIDUOS	0.0201265	9	0.00223628		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0747155	15			

HY1 Análisis de Varianza para Ptotal - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.00060231	1	0.00060231	0.41	0.5370
B:pH	0.000049572	1	0.000049572	0.03	0.8580
C:Agitación	0.0467098	1	0.0467098	31.94	0.0003
INTERACCIONES					
AB	0.00213014	1	0.00213014	1.46	0.2582
AC	0.00165919	1	0.00165919	1.13	0.3145
BC	0.000121384	1	0.000121384	0.08	0.7798
RESIDUOS	0.01316	9	0.00146222		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0644324	15			

ANEXO 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

API-2 Análisis de Varianza para Ptotal - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.00620156	1	0.00620156	5.54	0.0431
B:pH	0.000885062	1	0.000885062	0.79	0.3972
C:Agitación	0.0409051	1	0.0409051	36.51	0.0002
INTERACCIONES					
AB	0.0000765625	1	0.0000765625	0.07	0.7997
AC	0.000715562	1	0.000715562	0.64	0.4448
BC	0.0000765625	1	0.0000765625	0.07	0.7997
RESIDUOS	0.0100836	9	0.0011204		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0589439	15			

h) Análisis de varianza para el parámetro rP levaduras silvestres

MG Análisis de Varianza para rP - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.000881793	1	0.000881793	0.09	0.7656
B:pH	0.00525538	1	0.00525538	0.56	0.4723
C:Agitación	0.00153464	1	0.00153464	0.16	0.6947
INTERACCIONES					
AB	0.000199318	1	0.000199318	0.02	0.8871
AC	0.0219299	1	0.0219299	2.35	0.1598
BC	0.00632494	1	0.00632494	0.68	0.4318
RESIDUOS	0.0840491	9	0.00933879		
TOTAL (CORREGIDO)	0.120175	15			

HY1 Análisis de Varianza para rP - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.000244585	1	0.000244585	0.02	0.9050
B:pH	0.0425628	1	0.0425628	2.62	0.1399
C:Agitación	0.110422	1	0.110422	6.80	0.0284
INTERACCIONES					
AB	0.0182421	1	0.0182421	1.12	0.3168
AC	0.0712993	1	0.0712993	4.39	0.0656
BC	0.0104308	1	0.0104308	0.64	0.4435
RESIDUOS	0.146146	9	0.0162384		
TOTAL (CORREGIDO)	0.399348	15			

API-2 Análisis de Varianza para rP - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.060025	1	0.060025	5.36	0.0459
B:pH	0.0257603	1	0.0257603	2.30	0.1638
C:Agitación	0.385641	1	0.385641	34.42	0.0002
INTERACCIONES					
AB	0.00765625	1	0.00765625	0.68	0.4298
AC	0.024649	1	0.024649	2.20	0.1722
BC	0.0244922	1	0.0244922	2.19	0.1734
RESIDUOS	0.100842	9	0.0112047		
TOTAL (CORREGIDO)	0.629066	15			

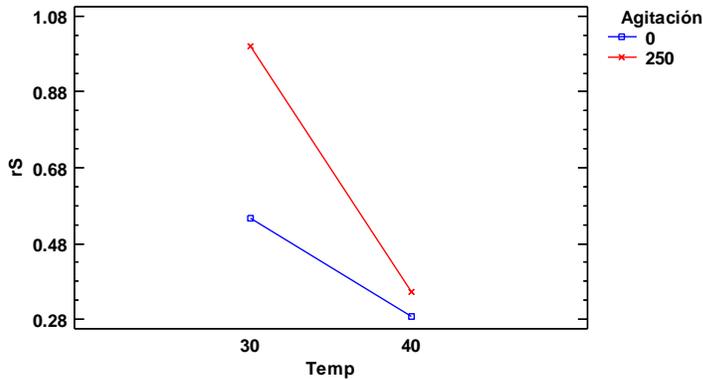
ANEXO 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

i) Análisis de varianza para el parámetro rS levaduras silvestres

MG Análisis de Varianza para rS - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.825288	1	0.825288	32.18	0.0003
B:pH	0.0771176	1	0.0771176	3.01	0.1169
C:Agitación	0.270581	1	0.270581	10.55	0.0100
INTERACCIONES					
AB	0.000637588	1	0.000637588	0.02	0.8782
AC	0.151484	1	0.151484	5.91	0.0380
BC	0.000886729	1	0.000886729	0.03	0.8566
RESIDUOS	0.230788	9	0.0256431		
TOTAL (CORREGIDO)	1.55678	15			

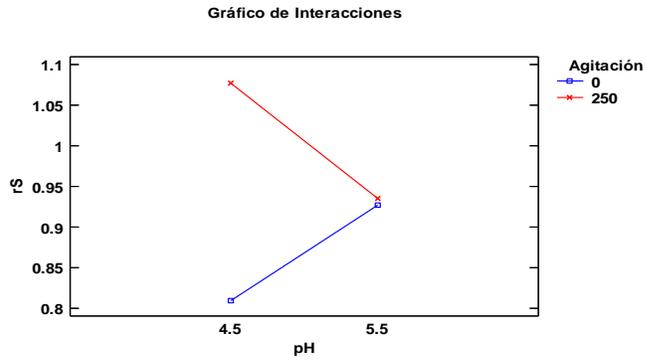
Gráfico de Interacciones



HY1 Análisis de Varianza para rS - Suma de Cuadrados Tipo III

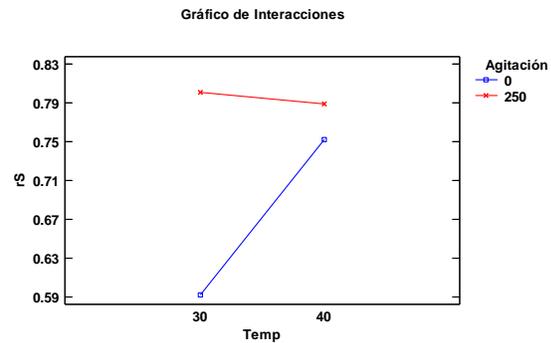
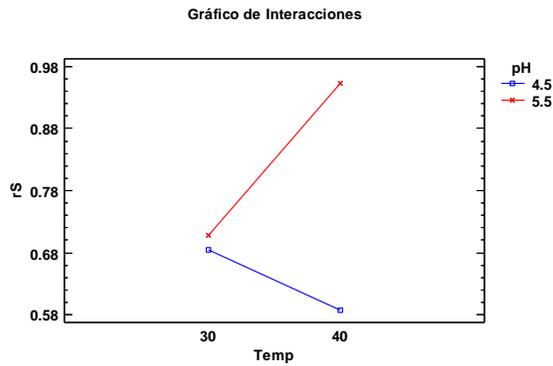
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.0725024	1	0.0725024	16.11	0.0030
B:pH	0.000624052	1	0.000624052	0.14	0.7182
C:Agitación	0.0758286	1	0.0758286	16.85	0.0027
INTERACCIONES					
AB	0.0136192	1	0.0136192	3.03	0.1159
AC	0.00411699	1	0.00411699	0.91	0.3638
BC	0.0675511	1	0.0675511	15.01	0.0038
RESIDUOS	0.0404964	9	0.0044996		
TOTAL (CORREGIDO)	0.274739	15			

ANEXO 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO



API-2 Análisis de Varianza para rS - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.021904	1	0.021904	4.49	0.0631
B:pH	0.151321	1	0.151321	31.03	0.0003
C:Agitación	0.0607623	1	0.0607623	12.46	0.0064
INTERACCIONES					
AB	0.117306	1	0.117306	24.05	0.0008
AC	0.029584	1	0.029584	6.07	0.0360
BC	0.005329	1	0.005329	1.09	0.3231
RESIDUOS	0.0438933	9	0.00487703		
TOTAL (CORREGIDO)	0.4301	15			



ANEXO 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Análisis de varianza multifactorial para la cepa Xer-15 Etapa 1

Análisis de Varianza para D Pob - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	13804.1	1	13804.1	8.65	0.0259
B:pH	118639.	2	59319.3	37.17	0.0004
INTERACCIONES					
AB	458629.	2	229315.	143.67	0.0000
RESIDUOS	9576.5	6	1596.08		
TOTAL (CORREGIDO)	600648.	11			

Análisis de Varianza para D X - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	1.75568	1	1.75568	145.60	0.0000
B:pH	1.37127	2	0.685633	56.86	0.0001
INTERACCIONES					
AB	1.5162	2	0.7581	62.87	0.0001
RESIDUOS	0.07235	6	0.0120583		
TOTAL (CORREGIDO)	4.71549	11			

Análisis de Varianza para umax - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.00130208	1	0.00130208	0.07	0.8011
B:pH	0.00382817	2	0.00191408	0.10	0.9046
INTERACCIONES					
AB	0.0928352	2	0.0464176	2.47	0.1647
RESIDUOS	0.112625	6	0.0187709		
TOTAL (CORREGIDO)	0.210591	11			

Análisis de Varianza para Td - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.243675	1	0.243675	0.19	0.6756
B:pH	0.16895	2	0.084475	0.07	0.9359
INTERACCIONES					
AB	5.39865	2	2.69933	2.14	0.1988
RESIDUOS	7.56635	6	1.26106		
TOTAL (CORREGIDO)	13.3776	11			

Análisis de Varianza para Rendimiento - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.222224	1	0.222224	1.64	0.2475
B:pH	0.113656	2	0.0568278	0.42	0.6753
INTERACCIONES					
AB	0.114268	2	0.0571341	0.42	0.6739
RESIDUOS	0.812791	6	0.135465		
TOTAL (CORREGIDO)	1.26294	11			

Análisis de Varianza para rs - Suma de Cuadrados Tipo III

ANEXO 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.185754	1	0.185754	272.07	0.0000
B:pH	0.380016	2	0.190008	278.30	0.0000
INTERACCIONES					
AB	0.11885	2	0.0594251	87.04	0.0000
RESIDUOS	0.0040965	6	0.00068275		
TOTAL (CORREGIDO)	0.688717	11			

Análisis de varianza para la cepa Xer-18 Etapa 1

Análisis de Varianza para D Pob - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	58800.0	1	58800.0	25.46	0.0023
B:pH	174501.	2	87250.3	37.78	0.0004
INTERACCIONES					
AB	77426.0	2	38713.0	16.76	0.0035
RESIDUOS	13857.0	6	2309.5		
TOTAL (CORREGIDO)	324584.	11			

Análisis de Varianza para D X - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.178608	1	0.178608	1.24	0.3073
B:pH	1.17161	2	0.585806	4.08	0.0760
INTERACCIONES					
AB	1.07155	2	0.535773	3.73	0.0885
RESIDUOS	0.861108	6	0.143518		
TOTAL (CORREGIDO)	3.28287	11			

Análisis de Varianza para umax - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.087723	1	0.087723	0.62	0.4593
B:pH	0.177211	2	0.0886057	0.63	0.5639
INTERACCIONES					
AB	0.261919	2	0.13096	0.93	0.4438
RESIDUOS	0.842227	6	0.140371		
TOTAL (CORREGIDO)	1.36908	11			

Análisis de Varianza para Td - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	5.10647	1	5.10647	2.00	0.2073
B:pH	11.817	2	5.9085	2.31	0.1802
INTERACCIONES					
AB	3.9828	2	1.9914	0.78	0.5003
RESIDUOS	15.3382	6	2.55637		
TOTAL (CORREGIDO)	36.2445	11			

Análisis de Varianza para Rendimiento - Suma de Cuadrados Tipo III

ANEXO 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.203581	1	0.203581	3.79	0.0996
B:pH	0.0469385	2	0.0234693	0.44	0.6651
INTERACCIONES					
AB	0.279031	2	0.139515	2.60	0.1540
RESIDUOS	0.322411	6	0.0537351		
TOTAL (CORREGIDO)	0.85196	11			

Análisis de Varianza para rs - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.165205	1	0.165205	15.42	0.0077
B:pH	0.201346	2	0.100673	9.40	0.0142
INTERACCIONES					
AB	0.0640482	2	0.0320241	2.99	0.1257
RESIDUOS	0.064279	6	0.0107132		
TOTAL (CORREGIDO)	0.494879	11			

Análisis de varianza para la cepa Xer-19 Etapa 1

Análisis de Varianza para D Pob - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	13872.0	1	13872.0	9.91	0.0199
B:pH	271532.	2	135766.	96.99	0.0000
INTERACCIONES					
AB	126655.	2	63327.3	45.24	0.0002
RESIDUOS	8399.0	6	1399.83		
TOTAL (CORREGIDO)	420457.	11			

Análisis de Varianza para D X - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.165675	1	0.165675	2.91	0.1388
B:pH	2.5022	2	1.2511	21.99	0.0017
INTERACCIONES					
AB	2.7854	2	1.3927	24.48	0.0013
RESIDUOS	0.34135	6	0.0568917		
TOTAL (CORREGIDO)	5.79462	11			

Análisis de Varianza para umax - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.0435608	1	0.0435608	0.57	0.4781
B:pH	0.134772	2	0.0673861	0.88	0.4605
INTERACCIONES					
AB	0.133085	2	0.0665423	0.87	0.4644
RESIDUOS	0.456879	6	0.0761466		
TOTAL (CORREGIDO)	0.768297	11			

ANEXO 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Análisis de Varianza para Td - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.50512	1	0.50512	2.27	0.1829
B:pH	0.735561	2	0.36778	1.65	0.2685
INTERACCIONES					
AB	0.758193	2	0.379096	1.70	0.2598
RESIDUOS	1.337	6	0.222833		
TOTAL (CORREGIDO)	3.33587	11			

Análisis de Varianza para Rendimiento - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.0179413	1	0.0179413	0.35	0.5732
B:pH	0.293252	2	0.146626	2.90	0.1315
INTERACCIONES					
AB	0.467101	2	0.233551	4.62	0.0611
RESIDUOS	0.303453	6	0.0505755		
TOTAL (CORREGIDO)	1.08175	11			

Análisis de Varianza para rs - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.339697	1	0.339697	258.93	0.0000
B:pH	0.173073	2	0.0865366	65.96	0.0001
INTERACCIONES					
AB	0.0693995	2	0.0346998	26.45	0.0011
RESIDUOS	0.0078715	6	0.00131192		
TOTAL (CORREGIDO)	0.590041	11			

Análisis de varianza para la cepa Xer-28 Etapa 1

Análisis de Varianza para D Pob - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	91002.1	1	91002.1	54.66	0.0003
B:pH	92220.5	2	46110.3	27.70	0.0009
INTERACCIONES					
AB	108347.	2	54173.6	32.54	0.0006
RESIDUOS	9988.5	6	1664.75		
TOTAL (CORREGIDO)	301558.	11			

Análisis de Varianza para D X - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.516675	1	0.516675	7.04	0.0378
B:pH	2.58495	2	1.29248	17.61	0.0031
INTERACCIONES					
AB	1.38035	2	0.690175	9.41	0.0141
RESIDUOS	0.44025	6	0.073375		
TOTAL (CORREGIDO)	4.92223	11			

Análisis de Varianza para umax - Suma de Cuadrados Tipo III

ANEXO 1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.00385208	1	0.00385208	0.10	0.7644
B:pH	0.188336	2	0.0941681	2.40	0.1710
INTERACCIONES					
AB	0.214232	2	0.107116	2.74	0.1431
RESIDUOS	0.234987	6	0.0391644		
TOTAL (CORREGIDO)	0.641407	11			

Análisis de Varianza para Td - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.170647	1	0.170647	0.36	0.5685
B:pH	3.01563	2	1.50782	3.21	0.1126
INTERACCIONES					
AB	2.82609	2	1.41305	3.01	0.1243
RESIDUOS	2.81525	6	0.469208		
TOTAL (CORREGIDO)	8.82762	11			

Análisis de Varianza para Rendimiento - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.211471	1	0.211471	1.81	0.2268
B:pH	0.0480572	2	0.0240286	0.21	0.8193
INTERACCIONES					
AB	0.275824	2	0.137912	1.18	0.3690
RESIDUOS	0.699768	6	0.116628		
TOTAL (CORREGIDO)	1.23512	11			

Análisis de Varianza para rs - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Temp	0.0440441	1	0.0440441	3.56	0.1081
B:pH	0.143503	2	0.0717516	5.80	0.0396
INTERACCIONES					
AB	0.194451	2	0.0972256	7.86	0.0211
RESIDUOS	0.0742345	6	0.0123724		
TOTAL (CORREGIDO)	0.456233	11			

12. ENTREGABLES

1. Actividades académicas

A) Formación de Recursos Humanos a nivel Posgrado

Nombre del alumno: Yoselin Guadalupe Ávila Lizárraga. Grado: Maestría en Ciencia en Innovación Biotecnológica. Título de la tesis: Evaluación in vitro del efecto prebiótico de la fibra soluble contenida en los residuos agroindustriales de la desfibración de *Agave fourcroydes*. Tipo de participación: Directora. Estatus: En proceso, actualmente cursando el segundo semestre.

Nombre del alumno: José Isabel Martínez Castillo. Grado: Maestría en Ciencia en Innovación Biotecnológica. Título de la tesis: Aprovechamiento de pectinas cítricas de alto metoxilo de toronja (*Citrus paradisi*) y mandarina (*Citrus reticulata*) como agentes encapsulantes de extractos acuosos de hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Tipo de participación: Asesora. Estatus: En proceso, actualmente cursando el segundo semestre.

Nombre del alumno: Nelly Carolina Medina Torres. Grado: Maestría en Ciencia en Innovación Biotecnológica. Título de la tesis: Evaluación de la actividad antibacteriana y antioxidante de polifenoles encapsulados con nanopartículas de quitosano, obtenidos de residuos de cáscaras de limón y camarón procedentes de la Península de Yucatán. Tipo de participación: Asesora. Estatus: En proceso, actualmente cursando el cuarto semestre.

Nombre del alumno: José Vicente Góngora Cauich. Grado: Maestría en Ciencia y Tecnología. Título de la tesis: Establecimiento de un proceso de hidrólisis a partir de cladodios frescos y secos de nopal (*Opuntia* spp.) para la obtención de azúcares fermentables. Tipo de participación: Asesora. Fecha de examen: 9 Diciembre 2016.

Nombre del alumno: Raziel Jesús Estrada Martínez. Grado: Maestría en Ciencia y Tecnología. Título de la tesis: Estudio de la capacidad fermentativa de microorganismos silvestres en cultivo mixto para la producción de alcohol a partir de residuos cítricos. Tipo de participación: Asesora. Fecha de examen: Diciembre 2013.

B) Participación en Congresos

XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Junio 2015. Presentación cartel: Fermentación de distintas fuentes de carbono por levaduras silvestres aisladas de residuos agroindustriales. Tania González-Flores, Neith Pacheco-López, Ángeles Sánchez-Contreras, Ingrid Rodríguez-Buenfil.

1st Biotechnology World Symposium-9º Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN. Octubre 2014. Presentación cartel: Alcohol production in synthetic medium added with different sugars. Tania González-Flores, María de los Ángeles Sánchez-Contreras, Neith Aracely Pacheco López and Ingrid Rodríguez-Buenfil.

V Simposio Internacional del Carbono en México. Junio 2014. Presentación oral: Capacidad fermentadora de levaduras silvestres a partir de diferentes fuentes de carbono. Tania González Flores, María de los A. Sánchez Contreras, Neith A. Pacheco López e Ingrid M. Rodríguez Buenfil.

XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Junio 2013. Presentación cartel: Alcohol production by wild strains *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida stellata* isolated from tequila factories. Tania González Flores, Ángeles Sánchez Contreras, Ingrid Rodríguez Buenfil.

VI Congreso de Biotecnología y Bioingeniería del Sureste. Octubre 2012. Efecto de las condiciones de fermentación en cepas silvestres aisladas de tequileras. Tania González Flores, Ángeles Sánchez Contreras, Ingrid Rodríguez Buenfil.

XIV Seminario Nacional de Investigación del Posgrado Interinstitucional en Ciencia y tecnología. Agosto 2011. Avances de tesis. Tania González Flores.

C) Publicaciones

Artículos divulgación

González Flores, T.; Sánchez-Contreras, M.A.; Pacheco-López N.A.; Rodríguez-Buenfil, IM (2014). Alcohol production in synthetic medium added with different sugars. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*; Special issue, Section D; 30 Nov 2014, Vol. 4, No. 5, 91 (Abstract only)

Memorias in extenso

Medina-Torres, N.C., Covarrubias-Cárdenas, A.G., Herrera-Pool, I.E., Sánchez-Contreras, M. A., González-Flores, T., Ayora-Talavera, T. R. Figueroa-Hernández, C.Y., Pacheco-López N.A. (2016). Physicochemical, Microbiological and Sensory Analysis of Combined Effect of Chitosan and Freezing in preservation of fresh cut mango. En: *PROCEEDINGS Latin Food 2016 IAFP's 5th Latin American Symposium in Food Safety, 7th Food Science, Biotechnology and Safety Meeting*. Guadalupe Virginia Nevárez-Morillón (Ed.) Asociación Mexicana de Ciencia de los Alimentos, A.C. y AMEPAL A.C. pp. 704-708

González-Flores Tania; Sánchez-Contreras María de los A.; Pacheco-López Neith A. y Rodríguez-Buenfil Ingrid M. (2015) Capacidad fermentadora de levaduras silvestres a partir de diferentes fuentes de carbono. En: *Serie Síntesis Nacionales: Estado actual del conocimiento del ciclo del carbono y sus interacciones en México. Síntesis a 2014*. Fernando Paz Pellat (Ed.). ISBN: 978-607-96490-2-9.

Capítulos de libros

González-Flores Tania, Fabela-Morón Miriam F, Pacheco-López Neith, Sánchez-Contreras Ángeles (2016). Capítulo VII. Consumo de miel en fresco y sus diferentes aplicaciones. En: *Producción y comercialización de miel y sus derivados en México: Desafíos y oportunidades para la exportación*. Ana Luisa Ramos Díaz y Neith Aracely Pacheco López (Eds). CIATEJ, Mérida, México. pp. 144-165. ISBN 978-607-97421-2-6

D) Impartición cursos Posgrado

Química de alimentos. Maestría en Ciencias en Innovación Biotecnológica

Microbiología. Tema: Maestría en Ciencias en Innovación Biotecnológica. 12 h. Agosto 2015-enero 2016

Productos naturales de origen natural. Tema: Triterpenos. Maestría en Ciencias en Innovación Biotecnológica. 9.98 h. Agosto 2015-enero 2016

Bioquímica. Tema: Carbohidratos y metabolismo de carbohidratos. Maestría en Ciencias en Innovación Biotecnológica. 9.98 h. Agosto 2015-enero 2016

2. Actividades de Investigación

Establecimiento a nivel piloto de un proceso para la obtención de extractos bioactivos de subproductos de cítricos. En vinculación con empresa Frutech International Corporation de México, S.A. de C.V. Convocatoria Programa Estímulos a la Innovación 2015. Líder de proyecto. Proyecto concluido.

Mejora en el Proceso Extractivo de Hesperidina y Validación de su Aplicación en la Formulación de Bebidas Regionales Funcionales. En vinculación con empresa Grupo R3 S.A. de C.V. Convocatoria Programa Estímulos a la Innovación 2017. Líder de proyecto. Proyecto en proceso de ejecución.

3. Actividades de vinculación

Diplomados

Instructora. Diplomado de Inocuidad Alimentaria. CIATEJ Unidad Guadalajara y Zapopan. Horas de participación: 7 h. Marzo, 2017.

Instructora. Diplomado en producción comercial de chile habanero con denominación de origen. Junio 2013. Tópico de buenas prácticas de manufactura en el procesamiento de chile habanero.

Patente

Proceso para la obtención de un desinfectante de frutas a partir de subproductos de frutas. Inventores: Tania González Flores, Santiago Gallegos Tintoré, Ingrid Mayanín Rodríguez Buenfil. Título: 331837. Fecha de obtención: 15 de junio 2015

4. Otras actividades

Revisora de trabajos libres de congreso. XVII Congreso Internacional Inocuidad de Alimentos. 5-7 Noviembre 2015. Nuevo Vallarta. Nayarit, México.

Revisora de trabajos libres de investigación. XVIII Congreso Internacional Inocuidad de Alimentos. 30 de septiembre y 1 de Octubre 2016. Guadalajara, Jalisco, México.

13. BIBLIOGRAFÍA

Adhyaru DN, Bhatt NS, Modi HA. (2014) Enhanced production of cellulase-free, thermo-alkali-solvent-stable xylanase from *Bacillus altitudinis* DHN8, its characterization and application in sorghum straw saccharification. *Biocat and Agric Biotechnol.* 2014;3:182–190

Ali, S.S., Wu, J., Xie, R., Zhou, F., Sun, J. and Huang, M., 2017. Screening and characterizing of xylanolytic and xylose-fermenting yeasts isolated from the wood-feeding termite, *Reticulitermes chinensis*. *PloS one*, 12(7), p.e0181141.

Annamalai, N., Rajeswari, M. V., & Balasubramanian, T. (2014). Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from *Bacillus alveayuensis* CAS 5 using marine wastes. *Food and Bioproducts Processing*, 92(4), 335-342.

Arellano J., Ilich S., Salazar M., Rodríguez I., Torres P. y Alarcón W. (2015). Producción de pectinasas por *Bacillus* spp. a partir de cáscaras de naranja y de toronja como fuente de carbono. *REBIOL* 35(1): 62-69, Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. ISSN: 2313-3171 (En Línea)

Arellano M, Pelayo C, Ramírez J, Rodríguez I (2008). Characterization of kinetic parameters and the formation of volatile compounds during the tequila fermentation by wild yeasts isolated from agave juice. *J Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35:835–841.

Arrollo-López FN, Orlic S, Querol A, Barrio E (2009). Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *Int. J. Food Microbiol.* 131:120-127.

Aubert J, 1988. *Biochemistry and genetics of cellulose degradation.* Academic press. USA

Behera B.C., Parida S., Dutta S.K., Thatoi H.N. (2014). Isolation and Identification of Cellulose Degrading Bacteria from Mangrove Soil of Mahanadi River Delta and Their Cellulase Production Ability. *American Journal of Microbiological Research*, 2(1): 41-46

Cadete, R.M., Melo, M.A., Dussan, K.J., Rodrigues, R.C., Silva, S.S., Zilli, J.E., Vital, M.J., Gomes, F.C., Lachance, M.A. and Rosa, C.A., 2012. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian forest. *PLoS One*, 7(8), p.e43135.

Calvo, P., & Zúñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecologia aplicada*, 9(1-2), 31-39.

Carrillo L (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta. ISBN 987-9381-19-X

Casablanca-Alarcón E., Ríos Manríquez N., Terrazas Siles E., Álvarez Aliaga M.T. (2011) Producción de β -glucosidasas por cultivos de bacterias termófilas indígenas del altiplano boliviano. *Rev.Colomb.Biotecnol.*, Volumen 13, Número 1, p. 66-72. ISSN electrónico 1909-8758. ISSN impreso 0123-3475.

Demain AL, Newcomb M, Wu JHD (2005) Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiol Mol Biol Rev* 69:124–154

Dias, M., Melo, M. M., Schwan, R. F., & Silva, C. F. (2015). A new alternative use for coffee pulp from semi-dry process to β -glucosidase production by *Bacillus subtilis*. *Letters in applied microbiology*, 61(6), 588-595.

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

Espinosa-De-Los-Monteros, J., Martinez, A., & Valle, F. (2001). Metabolic profiles and aprE expression in anaerobic cultures of *Bacillus subtilis* using nitrate as terminal electron acceptor. *Applied microbiology and biotechnology*, 57(3), 379-384.

Fan, B., Blom, J., Klenk, H.-P., & Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* Species Complex. *Frontiers in Microbiology*, 8, 22. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022>

Fonseca, G. G., de Carvalho, N. M. B., & Gombert, A. K. (2013). Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(11), 5055-5067.

Goel A, J Ferronce, J Jeong, MM Atai 1993. Analysis of metabolic fluxes in batch and continuous cultures of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.* 42:686-696.

Gracida Rodriguez, Jorge Noel y Perez-Diaz, Baruc. Factores previos involucrados en la producción de bioetanol, aspectos a considerar. *Rev. Int. Contam. Ambient* [online]. 2014, vol.30, n.2 [citado 2017-06-21], pp.213-227. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992014000200008&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0188-4999.

Grohmann, K., Baldwin, E.A., Buslig, B.S., 1994. Production of ethanol from enzymatically hydrolysed orange peel by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 45 (46), 315–327.

Grohmann, K., Cameron, R.G., Buslig, B.S., 1996. Fermentation of orange peel hydrolysates by ethanologenic *Escherichia coli*. Effects of nutritional supplements. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 57–58, 383–388.

Howard R, Abot E, Rensburg J, Howard S (2003) Lignocellulose Biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology.* 2: 602-619

Jang, J. S., Cho, Y., Jeong, G. T., & Kim, S. K. (2012). Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, *Saccharina japonica*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 35(1-2), 11-18.

Josephine, F. S., Ramya, V. S., Devi, N., Ganapa, S. B., & Vishwanatha, T. (2017). Isolation, production and characterization of protease from *Bacillus Sp* isolated from soil sample. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2(1), 163-168.

Khatiwada, P., Ahmed, J., Sohag, M. H., Islam, K., & Azad, A. K. (2016). Isolation, Screening and Characterization of Cellulase Producing Bacterial Isolates from Municipal Solid Wastes and Rice Straw Wastes. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 6, 280-285.

Kimura, A., Sato, S., Kato, T., Ikuta, K., Yamagishi, N., Okada, K., ... & Ito, K. (2012). Relationship between pH and temperature in the ruminal fluid of cows, based on a radio-transmission pH-measurement system. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(8), 1023-1028.

Lynd L, Van Zyl W, MacBride J, Laser M (2005). Consolidated bioprocessing of cellulosic on celulosic biomass: an update. *Curr Opin Biotechnol.* 66:506-577

Lynd, L., Weimer P., Zyl H, Pretorius I, 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology, microbiology and molecular Biology Reviews. 16: 577-583.

Malherbe S y Cloete, TE 2002. Fundamentals and applications. *Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology* 1:105-114.

Manabe, K., Kageyama, Y., Morimoto, T., Shimizu, E., Takahashi, H., Kanaya, S., ... & Ogasawara, N. (2013). Improved production of secreted heterologous enzyme in *Bacillus subtilis* strain MGB874 via modification of glutamate metabolism and growth conditions. *Microbial cell factories*, 12(1), 18.

Mansfield S, Mooney C, Saddler J (1999) Substrate and enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis. *Biotechnol. Prog.* 15:804-816

Nakamura LK, MS Roberts, FM Cohan 1999. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. Nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1211-1215

Nakano, M. M., & Zuber, P. (1998). Anaerobic growth of a “strict aerobe” (*Bacillus subtilis*). *Annual Reviews in Microbiology*, 52(1), 165-190.

Nkohla, A., Okaiyeto, K., Olaniran, A., Nwodo, U., Mabinya, L., & Okoh, A. (2017). Optimization of growth parameters for cellulase and xylanase production by *Bacillus* species isolated from decaying biomass. *Journal of Biotech Research* [ISSN: 1944-3285], 8, 33-47.

Oberoi, H. S., Vadlani, P. V., Nanjundaswamy, A., Bansal, S., Singh, S., Kaur, S., & Babbar, N. (2011). Enhanced ethanol production from Kinnow mandarin (*Citrus reticulata*) waste via a statistically optimized simultaneous saccharification and fermentation process. *Bioresource technology*, 102(2), 1593-1601.

Pratima Gupta, Kalpana Samant, and Avinash Sahu. *International Journal of Microbiology* Volume 2012 (2012), Article ID 578925, 5 pages Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulolytic Potential

Rao, R. S., Bhadra, B., & Shivaji, S. (2008). Isolation and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks. *Letters in applied microbiology*, 47(1), 19-24.

Ribéreau, P., Dubourdiou, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (2006). *Handbook of enology: The microbiology of wine and vinifications*, John Wiley & Sons.

Rodrigues F., Ludovico P., Leão C. (2006) Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. In: Péter G., Rosa C. (eds) *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook*. Springer, Berlin, Heidelberg

Rodrussamee, N., Lertwattanasakul, N., Hirata, K. et al. (2011). Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 90: 1573.

Rosenfeld, E., Beauvoit, B., Blondin, B., Salmon, J. (2003). Oxygen consumption by anaerobic *Sacharomyces cerevisiae* in enological conditions: effect on fermentation kinetics. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 113-121.

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* 82(4): 377-381.

Sehnem, N. T., Hickert, L. R., da Cunha-Pereira, F., de Morais, M. A., & Ayub, M. A. Z. (2017). Bioconversion of soybean and rice hull hydrolysates into ethanol and xylitol by furaldehyde-tolerant strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus*, and their cofermentations. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 7(2), 199-206.

Shine, K., Kanimozhi, K., Panneerselvam, A., Muthukumar, C., & Thajuddin, N. (2016). Production and optimization of alkaline protease by *Bacillus cereus* RS3 isolated from desert soil. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci*, 3(7), 193-202.

Silveira, W. B., Passos, F. J. V., Mantovani, H. C., & Passos, F. M. L. (2005). Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: a flux analysis of oxidoreductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(7), 930-936.

Singh, S., & Bajaj, B. K. (2017). Agroindustrial/forestry residues as substrates for production of thermoactive alkaline protease from *Bacillus licheniformis* K-3 having multifaceted hydrolytic potential. *Waste and Biomass Valorization*, 8(2), 453-462.

Sreedevi, S., Sajith, S., & Benjamin, S. (2013). Cellulase producing bacteria from the wood-yards on Kallai river bank. *Advances in Microbiology*, 3(04), 326

Vasudeo Z, Lew C (2011) Optimization of Culture Conditions for Production of Cellulase by a Thermophilic *Bacillus* Strain (pp. 521-527) *Journal of Chemistry and Chemical Engineering* 5 (6), 521

Wilkins, M.R., Suryawati, L., Maness, N.O., Chrz, D., 2007a. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of orange-peel oil. *World J. Microb. Biotechnol.* 23, 1161–1168.

Wilkins, M.R., Widmer, W.W., Grohmann, K., 2007b. Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. *Process. Biochem.* 42, 1614–1619.

Zhao, L., Zhang, X., & Tan, T. (2008). Influence of various glucose/xylose mixtures on ethanol production by *Pachysolen tannophilus*. *Biomass and Bioenergy*, 32(12), 1156-1161.