

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Selección de cepas de *Cryptococcus humicola* OJ-31 mejoradas
genéticamente**

T E S I S

Que presenta

JESSICA QUINTANA NÁJERA

Para obtener el grado

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de tesis

Dra. Ma. Teresa Ponce Noyola

Ciudad de México

Diciembre, 2016

Créditos

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Genética Microbiana del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco (CINVESTAV-Zacatenco), bajo la dirección de la Dra. María Teresa Ponce Noyola.

El trabajo realizado fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Proyecto 236895).

Este trabajo se presentó en el Congreso Internacional Bio.Iberoamérica 2016: Biotecnología Integrando Continentes, en la modalidad de presentación oral con el título: “Producción de bioetanol a partir de celobiosa por la cepa *Cryptococcus humicola* OJ-31 mejorada genéticamente”. Autores: Quintana Nájera Jessica, Poggi Varaldo Héctor Mario, Ramos Valdivia Ana Carmela y Ponce Noyola María Teresa. El congreso se llevó a cabo del 5 al 8 de junio de 2016 en Salamanca, España.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada

A la Dra. Ma. Teresa Ponce Noyola por aceptarme en su grupo de trabajo y brindarme todo el apoyo y asesoría durante la realización de mi proyecto de maestría.

A mis asesores, Dr. Héctor Mario Poggi Varaldo y Dra. Ana C. Ramos Valdivia por su apoyo y aportación intelectual al desarrollo de este proyecto.

A mi familia, mi madre por ser la persona que me ha guiado y apoyado toda la vida y por su amor incondicional. Mis hermanos Ana Lucía e Iván por su apoyo y cariño.

A Jaime, por ser mi mejor amigo y compañero. Por su cariño y siempre darme el aliento que necesito.

A la MC Odilia Pérez Avalos auxiliar de laboratorio por siempre tener una gran disposición en apoyarme en el trabajo experimental.

A Verónica Soto por su apoyo durante mi estancia en el departamento.

A mis compañeros de laboratorio, Javier, Citlalli, Enrique, Jimena, Lina, Lety por todo el apoyo y amistad que me brindaron y por los buenos momentos que pasamos juntos.

A mis compañeros de generación Bruno, Mariana, Brenda, Cynthia, Israel, Martin, Yoselin, por su amistad.

Índice

	Página
Índice de figuras	viii
Índice de tablas	xi
Notación	xii
Resumen	1
Abstract	2
I Introducción	3
1.1 Bioetanol	3
1.2 Residuos lignocelulósicos	6
1.3 Degradación enzimática de la celulosa y la hemicelulosa	9
1.4 Microorganismos involucrados en la degradación y producción de etanol a partir de celulosa y hemicelulosa	13
1.4 <i>Cryptococcus humicola</i>	17
1.5 Mejoramiento genético por mutagénesis	18
II Justificación	21
III Hipótesis	22
IV Objetivos	23
4.1 Objetivo general	23
4.2 Objetivos específicos	23
V Materiales y métodos	24
5.1. Microorganismos empleados y condiciones de cultivo	24
5.2 Medios de cultivo	24

5.2.1 Medio YM	24
5.2.2 Medio Breus	24
5.2.3 Medio Kulakovskaya	25
5.2.4 Medio Basal	25
5.2.5 Medio M10	25
5.3 Preparación del inóculo	25
5.4 Cinéticas de crecimiento aerobio de <i>C. humicola</i> OJ-31 a partir de diferentes fuentes de carbono	25
5.5 Evaluación de medios de cultivo mínimos para la fermentación con <i>C. humicola</i> OJ-31	26
5.6 Localización de la β -glucosidasa de <i>C. humicola</i> OJ-31	26
5.7 Rompimiento mecánico de las células	27
5.8 Mutagénesis de <i>C. humicola</i> OJ-31	27
5.9 Selección de mutantes fermentadoras de xilosa	28
5.10 Selección de mutantes fermentadoras de celobiosa	29
5.11 Obtención de sacarificados de bagazo de caña (SBC)	30
5.11.1 Obtención del concentrado enzimático de <i>C. flavigena</i> PR-22	30
5.11.2 Sacarificados de bagazo de caña obtenidos con enzimas de <i>C. flavigena</i> PR-22	30
5.11.3 Sacarificados de bagazo de caña obtenidos con las enzimas comerciales Celluclast ^(MR)	31
5.12 Fermentaciones con <i>C. humicola</i>	31
5.12.1 Fermentaciones en lote en reactores tanque agitado	31

(Sixfors) con <i>C. humicola</i> OJ-31	
5.12.2 Fermentación en lote en frascos serológicos con <i>C. humicola</i> OJ-31 y QN-52	32
5.12.3 Fermentación en lote alimentado en frascos serológicos con <i>C. humicola</i> OJ-31 y QN-52	32
5.13 Determinación de azúcares reductores	33
5.14 Medición de azúcares y etanol en HPLC	33
5.15 Determinación de proteína celular	33
5.16 Determinación de actividades enzimáticas	34
5.16.1 Actividad de β -glucosidasa	34
5.16.2 Actividad sobre papel filtro (PFasa)	35
5.16.3 Actividad de xilanasas	35
5.16.4 Actividad de CMCasas	35
VI Resultados y Discusión	37
6.1 Cinéticas de crecimiento de <i>C. humicola</i> OJ-31	37
6.2 Producción de etanol por <i>C. humicola</i> OJ-31 en reactores tipo tanque agitado (Sixfors)	39
6.2.1 Fermentación en lote de glucosa-celobiosa-xilosa	39
6.2.2 Fermentación en lote de xilosa	41
6.3 Evaluación del crecimiento de <i>C. humicola</i> OJ-31 en medios de cultivo mínimos	44
6.4 Localización de la actividad de β -glucosidasa de <i>C. humicola</i> OJ-31	46
6.5 Producción de etanol a partir de celobiosa y xilosa con <i>C.</i>	48

humicola OJ-31

6.6 Producción de etanol a diferentes concentraciones de celobiosa con <i>C. humicola</i> OJ-31	52
6.7 Mutagénesis y selección de mutantes de <i>C. humicola</i> OJ-31 productoras de etanol a partir de xilosa	54
6.8 Mutagénesis y selección de mutantes de <i>C. humicola</i> OJ-31 productoras de etanol a partir de celobiosa	58
6.9 Determinación de la capacidad fermentativa de las mutantes de <i>C. humicola</i> OJ-31 y QN-52	61
6.9.1 Producción de etanol a partir de diferentes concentraciones de celobiosa con <i>C. humicola</i> OJ-31 y QN-52	61
6.9.2 Determinación de la actividad de β -glucosidasa de <i>C. humicola</i> OJ-31 y QN-52 en la fermentación de celobiosa a diferentes concentraciones	67
6.9.3 Producción de etanol a partir de celobiosa en cultivo en lote alimentado con <i>C. humicola</i> OJ-31 y QN-52	70
6.9.4 Determinación del efecto inhibitorio de la concentración de etanol en la capacidad fermentativa de <i>C. humicola</i> OJ-31 y QN-52	75
6.9.5 Producción de etanol a partir de los azúcares de bagazo de caña sacarificado con Celluclast ^(MR)	79
6.9.6 Producción de etanol con <i>C. humicola</i> OJ-31 y QN-52 a partir de sacarificado de bagazo de caña obtenido con el	82

concentrado enzimático de <i>C. flavigena</i> PR-22	91
VII Conclusiones	92
VIII Perspectivas	93
IX Bibliografía	

Índice de figuras

Figura	Descripción	Página
1	Producción de etanol a nivel mundial en 2015	5
2	Estructura de la lignocelulosa	7
3	Estructura química de la celulosa	8
4	Estructura del xilano y los sitios de hidrólisis de las enzimas xilanolíticas	9
5	Ruta metabólica de glucosa y xilosa para levaduras	12
6	Cinética de crecimiento y consumo de sustrato de <i>Cryptococcus humicola</i> OJ-31	38
7	Producción de etanol y consumo de azúcares por <i>C. humicola</i> OJ-31 en reactores tipo tanque agitado (Sixfors) con medio YM glucosa-xilosa-celobiosa.	40
8	Producción de etanol y consumo de azúcares por <i>C. humicola</i> OJ-31 en reactores tipo tanque agitado (Sixfors) con medio YMX	42
9	Rutas involucradas y balance de las reacciones para la transformación de xilosa en etanol	44
10	Cinética de crecimiento de <i>C. humicola</i> OJ-31 a partir de los medios mínimos Breus, Kulakovskaya y Basal, con 10 g/L de glucosa como fuente de carbono	45
11	Consumo de sustrato, producción de etanol y xilitol a partir	49

	de celobiosa y xilosa en condiciones anaerobias, por <i>C. humicola</i> OJ-31	
12	Producción de etanol y consumo de celobiosa a diferentes concentraciones de sustrato en fermentación en lote con <i>C. humicola</i> OJ-31	54
13	Aislamiento de mutantes de <i>C. humicola</i> OJ-31 en medio YMX	56
14	Crecimiento aerobio de <i>C. humicola</i> OJ-31 y sus mutantes en medio YMX + 0.5 % 2-DG	57
15	Producción de etanol y consumo de sustrato por <i>C. humicola</i> en fermentación en lote en medio Breus con 30 g/L de celobiosa durante 48 y 72 h	63
16	Producción de etanol y consumo de sustrato por <i>C. humicola</i> en fermentación en lote de medio Breus con 40 g/L de celobiosa durante 48 y 72 h	64
17	Comportamiento de la actividad de β -glucosidasa de <i>C. humicola</i> OJ-31 y QN-52 al final de la fermentación de diferentes concentraciones de celobiosa en medio Breus.	70
18	Producción de etanol a partir de celobiosa por cultivo en lote alimentado con <i>C. humicola</i>	74
19	Efecto de la adición de etanol sobre la fermentación alcohólica con <i>C. humicola</i>	78
20	Fermentación de sacarificado de bagazo de caña obtenido con las enzimas Celluclast 1.5 L. Perfil y consumo de	80

	azúcares presentes en el sacarificado con <i>C. humicola</i>	
21	Fermentación de sacarificado de bagazo de caña obtenido con las enzimas Celluclast 1.5 L. Actividad β -glucosidasa, consumo de azúcares totales y producción de etanol con <i>C. humicola</i>	81
22	Fermentación del sacarificado de bagazo de caña adicionado con celobiosa a 20 g/L. Producción de etanol y consumo de azúcares reductores totales y celobiosa con las mutantes de <i>C. humicola</i>	83
23	Fermentación del sacarificado de bagazo de caña adicionado con celobiosa a 8 g/L. Producción de etanol y consumo de azúcares reductores totales y celobiosa con las mutantes de <i>C. humicola</i> .	85
24	Fermentación del sacarificado de bagazo de caña adicionado con celobiosa a 20 g/L. Producción de etanol y consumo de azúcares reductores totales y celobiosa con las mutantes de <i>C. humicola</i>	86
25	Fermentación del sacarificado de bagazo de caña adicionado con celobiosa a 20 g/L. Producción de etanol y consumo de azúcares reductores totales y celobiosa con las mutantes de <i>C. humicola</i>	90

Índice de tablas

Tabla	Descripción	Página
1	Microorganismos productores de etanol a partir de celobiosa	15
2	Microorganismos productores de xilanasas	16
3	Levaduras fermentadoras de xilosa	17
4	Fuentes de carbono asimilables por <i>Cryptococcus humicola</i>	18
5	Compuestos químicos utilizados comúnmente en mutagénesis de microorganismos	20
6	Actividad de β -glucosidasa de <i>C. humicola</i> OJ-31	47
7	Fermentación en medio YMX con <i>C.humicola</i> OJ-31 y sus mutantes	58
8	Estimación de la capacidad fermentativa por producción de CO ₂ de las mutantes <i>C. humicola</i> OJ-31 en la primera etapa de selección por fermentación de celobiosa	60
9	Determinación de las capacidades fermentativas de las mutantes de <i>C. humicola</i> OJ-31 durante la segunda etapa de selección por producción de etanol a partir de celobiosa	61
10	Comparación de la capacidad de producir etanol de las mutantes de <i>C. humicola</i> OJ-31 y QN-52 en medio Breus con diferentes concentraciones de celobiosa y tiempos de fermentación	65

Notación

2-DG	2-desoxi glucosa
ATP	Adenosín trifosfato
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NTG	N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina
PPP	Vía de las pentosas fosfato
XDH	Xilitol deshidrogenasa
XR	Xilosa reductasa

Resumen

La producción de etanol a partir de celobiosa por la levadura *Cryptococcus humicola* OJ-31 se encuentra limitada por concentraciones del sustrato > 30 g/L. Se llevó a cabo el mejoramiento genético de la cepa con el agente N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) a 150 µL/mL durante 20 min, obteniendo una mutante con mejor capacidad de fermentar celobiosa a concentraciones \geq 30 g/L. Esta mutante a la que se denominó *C. humicola* QN-52, produjo 12.73 g/L de etanol en la fermentación de 40 g/L de celobiosa, este valor fue 88 % mayor al valor obtenido para su cepa madre OJ-31. Mientras que en la fermentación de sacarificados de bagazo de caña adicionados con 30 g/L de celobiosa, la producción de etanol de *C. humicola* QN-52 superó a OJ-31 en un 92 %, con valores de 14.36 y 7.46 g/L, respectivamente. Aunque, a concentraciones de celobiosa \geq 30 g/L ninguna mutante tuvo un consumo completo del azúcar. La β -glucosidasa, enzima responsable de la hidrólisis de la celobiosa se encuentra intracelularmente y es inducida por su sustrato, sin embargo a concentraciones \geq 30 g/L se presenta un efecto inhibitorio. La actividad de β -glucosidasa de *C. humicola* OJ-31 disminuyó 29.33 y 33.68 % en la fermentación de 30 y 40 g/L de celobiosa. Mientras que la disminución de la actividad en *C. humicola* QN-52 en las mismas condiciones fue de 7.41 y 18.34 %, respectivamente. Por lo anterior la β -glucosidasa de la mutante *C. humicola* QN-52 pudo haber sufrido una modificación que le permite una mayor tolerancia a inhibición de la actividad y por lo tanto mayor capacidad de producción de etanol a \geq 30 g/L de celobiosa en comparación con su cepa madre OJ-31.

Abstract

The production of ethanol from cellobiose by the yeast *Cryptococcus humicola* OJ-31 was found to be limited by substrate concentrations > 30 g/L. The strain was genetically improved by treatment with $150 \mu\text{L/mL}$ of the mutagen N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) for 20 min, obtaining a mutant with an increased capacity to ferment cellobiose at concentrations ≥ 30 g/L. This mutant was named *C. humicola* QN-52 and in fermentations containing 40 g/L of cellobiose, was able to produce 12.73 g/L of ethanol, representing an increase of 88% over the value obtained by its parental strain OJ-31. While in fermentations of saccharified sugar cane bagasse supplemented with 30 g/L of cellobiose, the ethanol production of *C. humicola* QN-52 exceeded OJ-31 by 92%, with a value of 14.36 g/L compared to 7.46 g/L. However, at cellobiose concentrations ≥ 30 g/L no mutant demonstrated a complete consumption of sugars. β -glucosidase, the enzyme responsible for the hydrolysis of cellobiose is found intracellularly and is induced by its substrate, however at concentrations ≥ 30 g/L there is an inhibitory effect. The β -glucosidase activity of *C. humicola* OJ-31 decreased 29.33 and 33.68% in fermentations with 30 and 40 g/L of cellobiose. While in the same conditions, the decrease in the activity of *C. humicola* QN-52 was only 7.41 and 18.34%, at the respective concentrations. Therefore, compared to its parent strain OJ-31, the β -glucosidase of the mutant *C. humicola* QN-52 could have undergone a modification that allows a greater tolerance to enzymatic inhibition by substrate and therefore allows greater capacity for ethanol production at ≥ 30 g/L of cellobiose.

I. Introducción

1.1 Bioetanol

El consumo de energía ha incrementado constantemente durante el último siglo al crecer la población mundial y la industrialización de más países y se espera alcanzar cerca de los 10.5 mil millones de personas para 2050 (de Souza et al. 2014). Además, existen serias preocupaciones de tipo ambiental y debido al agotamiento de los combustibles fósiles. Por lo que existe una búsqueda de compuestos sustentables y renovables para la generación de energía que ayuden en la reducción de la emisión de gases de efecto invernadero y el subsecuente calentamiento global. Los recursos renovables y procesos de bajo impacto ambiental tienen el potencial para establecer las bases de un futuro más sustentable; que abarque la biomasa como materia prima y la valorización de residuos y tecnologías más ecológicas para la producción de energía (Hahn-Hägerdal et al. 2007; Rubin 2008; de Souza et al. 2014).

Los biocombustibles son productos biotecnológicos que atraen la atención de la investigación por ser fuentes de energía renovable y sustentable. El término biocombustible se atribuye a cualquier combustible alternativo que se derive de materia orgánica, como energía a partir de cultivos (e.g. maíz, trigo, caña de azúcar, remolacha de azúcar, entre otros), residuos de cultivos (e.g. paja y cáscara de arroz, rastrojo de maíz, bagazo de caña), o biomasa de desecho (e.g. desechos de alimentos, ganado, papel, madereros, entre otros). De todos los biocombustibles, el

bioetanol es considerado un combustible alternativo para el futuro y ya es producido en diferente escala en todo el mundo (Bajpai 2013).

El uso de bioetanol provee un gran número de beneficios. Es fácilmente biodegradable en el ambiente y produce muchos menos contaminantes en la combustión interna de motores que los combustibles provenientes del petróleo. Posee baja toxicidad y es miscible en gasolina en cualquier proporción, hasta 10 % sin ninguna modificación en los vehículos actuales de combustión interna. Esto incluye al combustible oxigenado E10, comúnmente llamado gasohol. Mientras que mezclas con mayores porcentajes de etanol sólo pueden ser utilizados en vehículos modificados, como es el caso de E85 con 85 % de etanol (Bajpai 2013). Además, se ha encontrado que el reemplazo de la gasolina por bioetanol reduce la producción de gases de efecto invernadero, ya que al crecer la biomasa vegetal que sirve como materia prima para los biocombustibles remueve dióxido de carbono de la atmósfera. Debido a esto, al bioetanol se le asigna un crédito de disminución de carbono suficientemente grande que deja a la emisión total de los gases de efecto invernadero de los biocombustibles en menor cantidad que la de los combustibles fósiles (Searchinger et al. 2008).

La materia prima utilizada para la producción de bioetanol es principalmente azúcar de caña en áreas tropicales como la India, Brasil y Colombia, mientras que el maíz predomina en otras áreas como Estados Unidos, la Unión Europea y China (Cheng y Timilsina 2011). La producción mundial de etanol en 2015 fue de 25,682 millones de galones (**Figura 1**), encontrándose Estados Unidos y Brasil como los principales productores. El proceso de producción de etanol depende del material a utilizar, lo cual comúnmente se realiza en tres pasos principales: (1) la obtención de

una solución que contenga azúcares fermentables; (2) conversión de los azúcares a etanol por fermentación y (3) separación y purificación del etanol, usualmente por destilación-rectificación, deshidratación (Lin y Tanaka 2006).

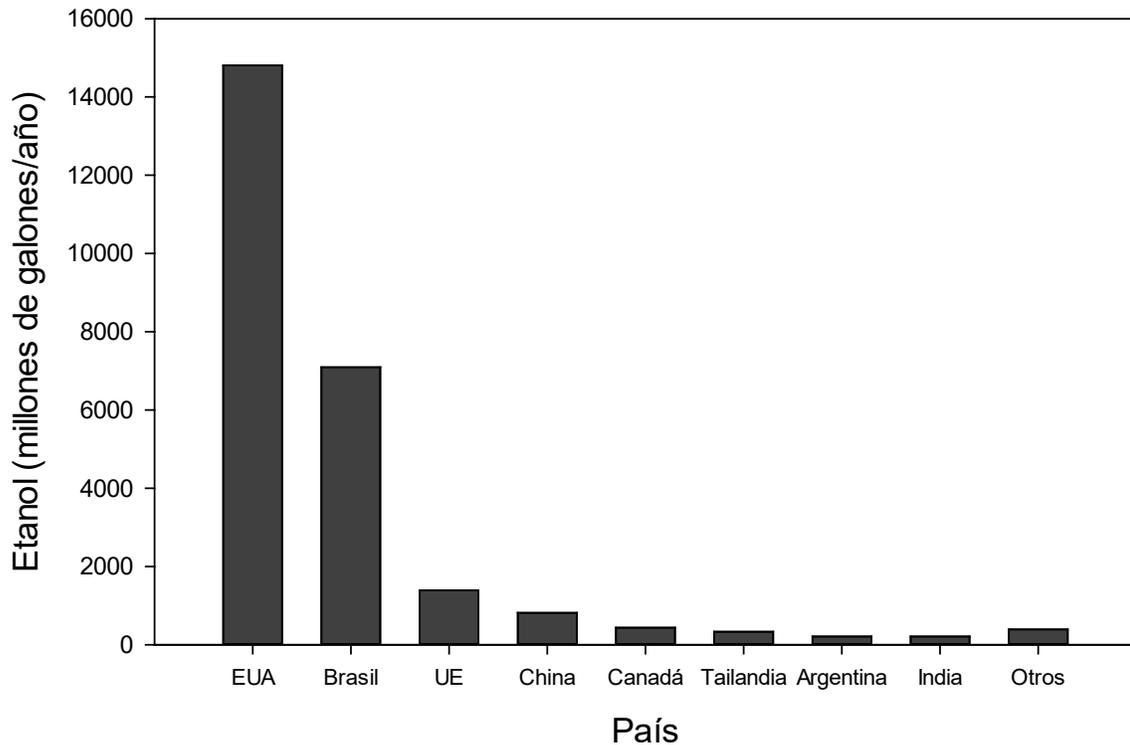


Figura 1. Producción de etanol a nivel mundial en 2015 (RFA, 2015).

La producción actual de bioetanol es de primera generación, el cual es obtenido a partir de cultivos primarios, principalmente maíz y caña de azúcar. Sin embargo, no se puede abastecer la demanda mundial de bioetanol con estos cultivos debido a su valor como alimento, ya que al destinarlo a la producción de etanol se tienen problemas en los precios y seguridad de los alimentos básicos. (Sarkar et al. 2012). En el caso de México, el maíz y el azúcar de caña son productos básicos de la alimentación mexicana, lo que hace de los biocombustibles de primera generación

una opción no viable para el país. Una manera de evitar la problemática anterior es utilizando otras materias primas que no afecten a la seguridad alimentaria, lo que conlleva al desarrollo de los combustibles de segunda generación (Tanino et al., 2010; CONADESUCA, 2015).

Los combustibles de segunda generación se producen generalmente a partir de biomasa lignocelulósica no comestible. Ejemplo de ello son la biomasa lignocelulósica de agrorresiduos (e.g. rastrojo de maíz, paja de trigo y cebada), los subproductos de los procesos agrícolas (e.g. fibra de maíz, bagazo de caña de azúcar, torta de semillas, etc.), la biomasa maderera (madera blanda y dura) y la biomasa de la planta entera como pasto o árboles sembrados con el propósito exclusivo de utilizarse en la producción de biocombustibles. Estas materias primas no compiten con los alimentos y la seguridad alimentaria, por lo que se consideran fuentes renovables para la producción de etanol (Banerjee et al. 2010).

Debido a que existen muchos retos para llevar al bioetanol de segunda generación a la aplicación comercial, se ha realizado un gran esfuerzo en la investigación de tecnologías avanzadas que hagan al proceso económicamente viable (Cheng y Timilsina 2011).

1.2 Residuos lignocelulósicos

La pared celular de las plantas está formada por lignocelulosa, la cual consiste en tres componentes principales: celulosa, hemicelulosa y lignina (**Figura 2**). A su vez, la composición y porcentajes de estos 3 constituyentes varían entre las especies de plantas, incluso entre la edad y la etapa de crecimiento (Jeffries 1994; Demirbas

2005). La celulosa y la hemicelulosa son los componentes mayoritarios y en el caso del bagazo de caña constituyen el 40.2 y 21.1%, respectivamente (Zhao et al. 2012).

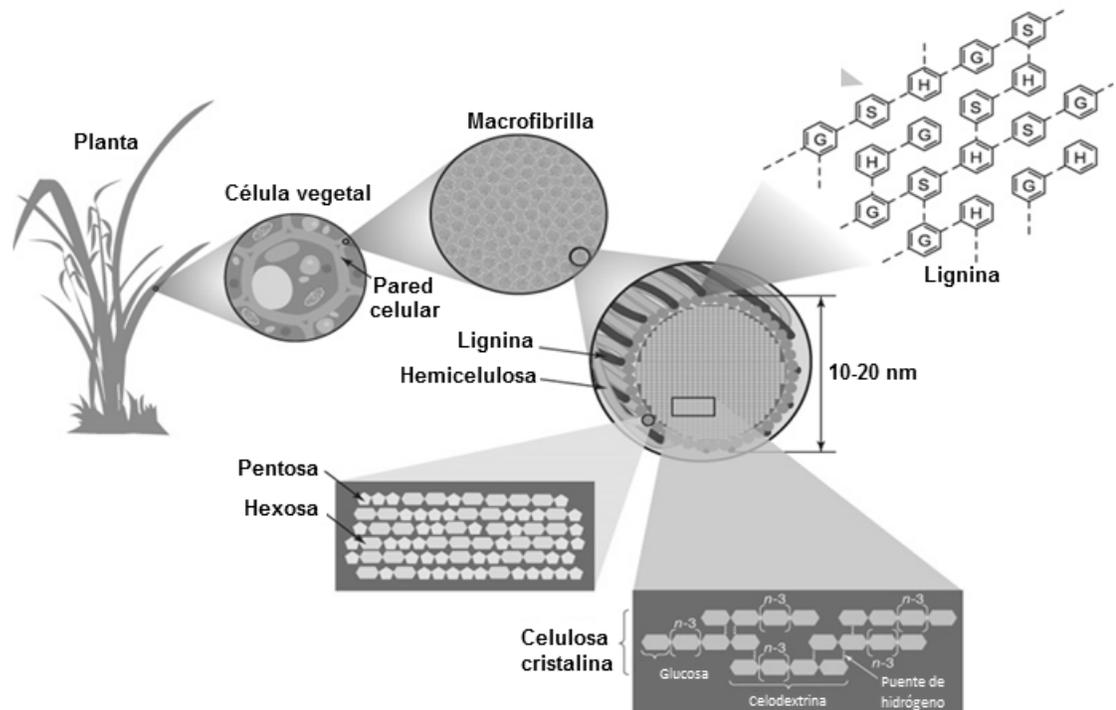


Figura 2. Estructura de la lignocelulosa. Modificado de Rubin (2008)

La celulosa es un polisacárido que consiste en cadenas lineales de varios cientos o miles de unidades de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos $\beta(1\rightarrow4)$ (**Figura 3**). Estas cadenas insolubles llamadas microfibrillas se estructuran de manera lineal unidas intramolecularmente por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. Las microfibrillas forman una estructura cristalina resistente a la hidrólisis, además de regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Béguin y Aubert 1994; Ovando-Chacón y Waliszewsk 2005).

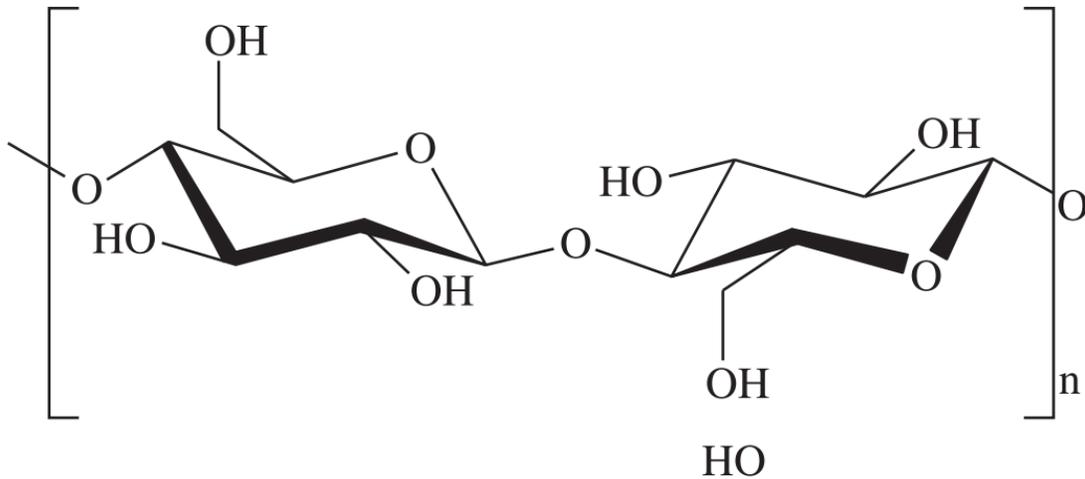


Figura 3. Estructura química de la celulosa (Coma 2013).

La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas unidas por enlaces β -1,4 y ocasionalmente por enlaces β -1,3, además de algunos ácidos como 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico (**Figura 4**) (Pérez et al. 2002). Las diferentes clases de hemicelulosa se nombran de acuerdo al principal azúcar que las compone. Por lo tanto, cuando un polímero es hidrolizado y como principal azúcar se obtiene xilosa, es un xilano, de igual manera otras hemicelulosas como el glucomanano, xiloglucano, arabinogalactano y arabinano (de Vries y Visser 2001; Polizeli et al. 2005). El xilano es el tipo de hemicelulosa más común en la naturaleza e interactúa con la lignina y la celulosa por enlaces covalentes y no covalentes, con la finalidad de proteger a las microfibrillas de celulosa en contra de la biodegradación (Beg et al. 2001).

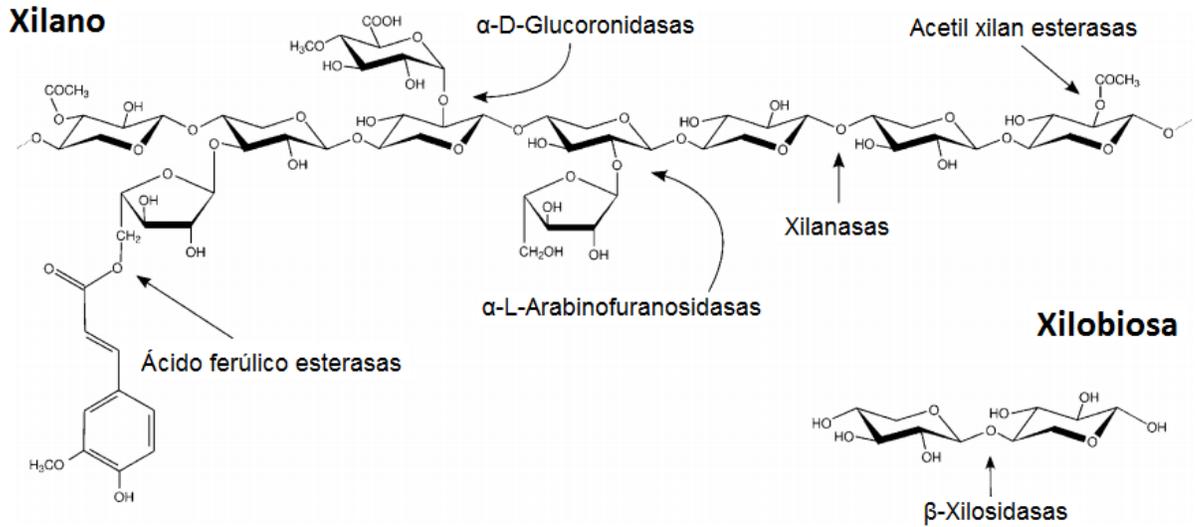


Figura 4. Estructura del xilano y los sitios de hidrólisis de las enzimas xilanolíticas. Modificado de Polaina y MacCabe (2007).

Por otro lado, la lignina es un heteropolímero amorfo y ramificado, formado por alcoholes aromáticos que da soporte estructural, rigidez, impermeabilidad, protección a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y es altamente resistente a la degradación química y biológica (Aro et al. 2005). La presencia de la lignina crea una barrera protectora que previene la destrucción de la biomasa vegetal.

1.3 Degradación enzimática de la celulosa y la hemicelulosa

Para la conversión de la biomasa a bioetanol primeramente se debe eliminar la lignina y posteriormente degradar la celulosa y la hemicelulosa a sus correspondientes monómeros para su fermentación. Esto se logra en dos pasos previos, pretratamiento y sacarificación, el objetivo del pretratamiento es romper la lignina y la hemicelulosa, así como la estructura cristalina de la celulosa, de manera

que las enzimas puedan acceder a los polímeros e hidrolizarlos (Mosier et al. 2005). Durante los últimos años se han desarrollado un gran número de pretratamientos que incluyen métodos con álcali, ácido, amonía, biológicos, entre otros (Kumar et al. 2009a).

La degradación enzimática de la celulosa a glucosa, la fuente de azúcares fermentables de mayor interés, se logra por la acción sinérgica de las tres clases de enzimas: endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas. Las endoglucanasas catalizan el rompimiento al azar de enlaces internos en las cadenas de celulosa, mientras que las exoglucanasas atacan los extremos de las cadenas liberando celobiosa. La celobiosa es un disacárido compuesto por dos moléculas de glucosa unidas por un enlace $\beta(1\rightarrow4)$, el cual es hidrolizado por la enzima β -glucosidasa (Kumar et al. 2008; Singhania et al. 2013). Por último la glucosa entra a la ruta Embden-Meyerhof y se hidroliza hasta piruvato, el cual en condiciones anaerobias se convierte en etanol y CO_2 (Nelson et al. 2008).

Debido a la heterogeneidad y naturaleza compleja de la hemicelulosa, su completa hidrólisis requiere de la acción de una variedad de enzimas que se clasifican en dos grupos principales, las xilanasas y las β -xilosidasas. Las xilanasas actúan en la cadena primaria de xilosa rompiendo los enlaces internos del polímero de xilano, dando como producto una mezcla de xilooligosacáridos. Mientras que las β -xilosidasas hidrolizan la xilobiosa y los xilooligosacáridos de cadenas cortas generados por la acción de las xilanasas con la finalidad de liberar la xilosa (**Figura 4**). Por otra parte, la remoción de las cadenas laterales del xilano es catalizada por α -L-arabinofuranosidasas, α -D-glucoronidasas, acetil xilanesterasas, esterasas de ácido ferúlico y de ácido p-cumárico (Polaina y MacCabe 2007).

La completa utilización de los azúcares contenidos en la lignocelulosa es importante para la bioconversión de biomasa vegetal para la producción de productos químicos y combustibles líquidos (Saha 2003; Gírio et al. 2010; Kuhad et al. 2011). Sin embargo, las pentosas no son tan fácilmente utilizadas por las levaduras etanológicas como la glucosa (Kuhn y Zyl 1995). La ruta metabólica de la xilosa implica una vía oxido-reductiva también llamada de la xilosa reductasa-xilitol deshidrogenasa (XR-XDH) (**Figura 5**). La XR realiza la reducción de la xilosa a xilitol utilizando como cofactor NADH o NADPH, el xilitol es oxidado a D-xilulosa por la XDH utilizando NAD⁺. Posteriormente, la D-xilulosa es fosforilada utilizando ATP por la xiluloquinasa (XK) dando lugar a la D-xilulosa-5-fosfato, la cual pasa como un intermediario hacia la vía de las pentosas fosfato para su completa metabolización hacia etanol (Liang et al. 2014).

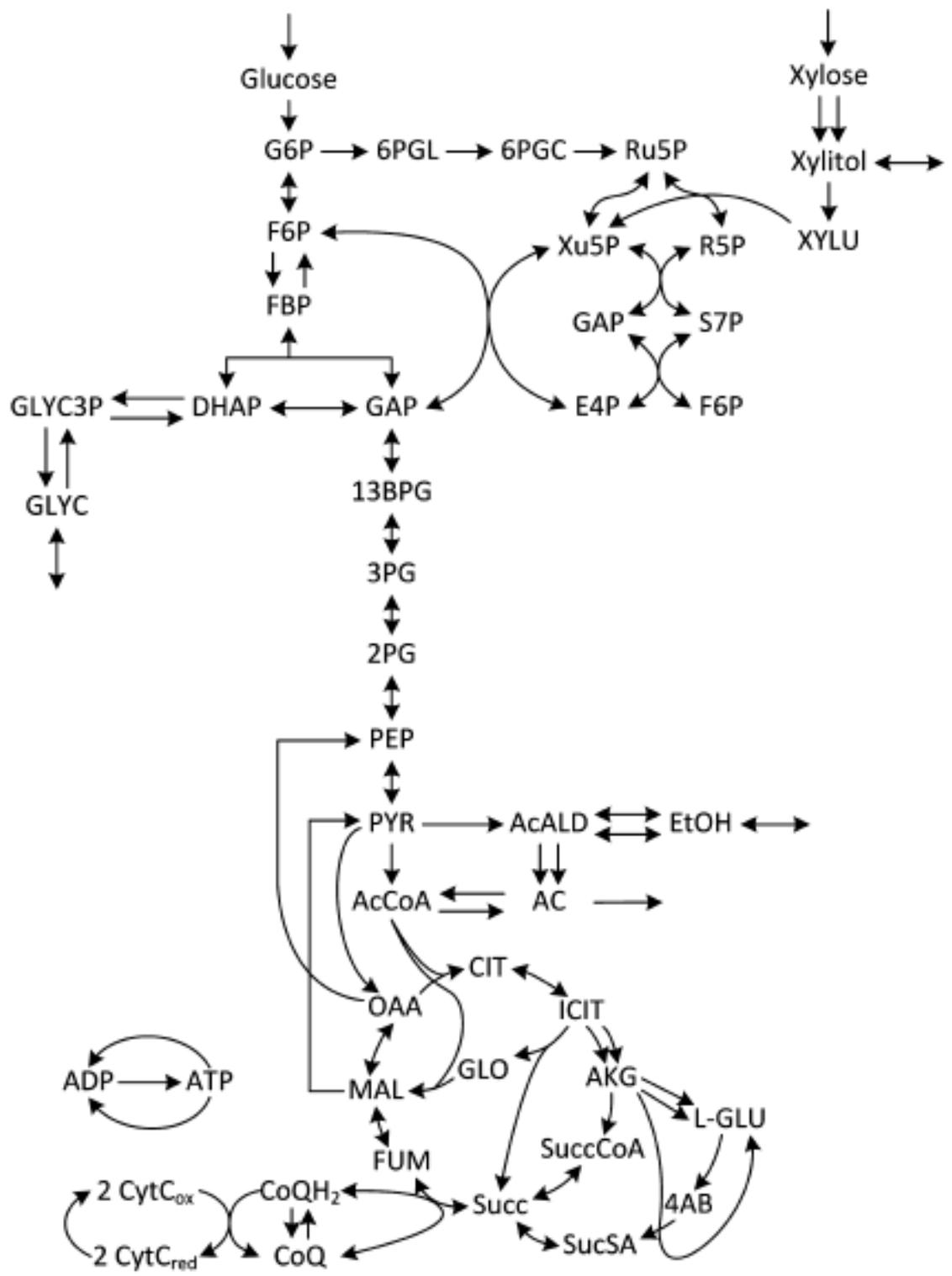


Figura 5. Ruta metabólica de glucosa y xilosa para levaduras (Liang et al. 2014).

1.4 Microorganismos involucrados en la degradación y producción de etanol a partir de celulosa y hemicelulosa

Las celulasas son altamente específicas y un gran número de microorganismos como bacterias y hongos son capaces de producirlas (Kuhad et al. 1997; Kalogeris et al. 2003). Los microorganismos más estudiados son los hongos responsables de la pudrición de la madera (Cuervo et al. 2009), dentro de los que destacan los basidiomicetos *Phanerochaete chrysosporium* (Deswal et al. 2011), *Sclerotium rolfsii*, *Volvariella volvacea*, *Schizophyllum commune* (Duff y Murray 1996), *Pycnoporus sanguineus*, *Bjerkandera adusta* (Quiroz-Castañeda et al. 2009), y algunos ascomicetos como *Trichoderma reesei* (Sternberg 1976) y especies de *Aspergillus*, y *Penicillium* (Sternberg 1976; Esterbauer et al. 1991; Sun y Cheng 2002). Mientras que entre las bacterias se encuentran una gran cantidad de especies dentro de los géneros *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* y *Streptomyces* (Bisaria y Martin 1991).

Se ha evaluado la capacidad de degradar celulosa de una gran cantidad de microorganismos, sin embargo son relativamente pocos los seleccionados por su potencial de producción de celulasas (Das et al. 2007; Yu et al. 2007). Por lo que se han elegido sólo aquellos microorganismos que produzcan niveles apropiados de endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas para una eficiente degradación de la celulosa (Wojtczak et al. 1987; Kumar et al. 2008). Las celulasas de los hongos aerobios son las que más atención han recibido y actualmente dominan la producción de celulasas a nivel industrial (Mohite y Patil 2016). En particular las celulasas de *Trichoderma reesei* son las más estudiadas y utilizadas (Reese et al.

1950; Reese 1956; Mohite y Patil 2016). Por otra parte, dentro de la gran variedad de bacterias celulolíticas aerobias y anaerobias reportadas, la mayoría de la investigación se ha enfocado en la producción aerobia con las bacterias *Cellulomonas fimi*, *Thermomonospora fusca* y *Cellulomonas flavigena* (Sternberg 1976; Ponce-Noyola y de la Torre 1995; Sun y Cheng 2002). Lo anterior debido principalmente a que las bacterias anaerobias como *Clostridium thermocellum* y *Bacteroides cellulosolvens* presentan velocidades de crecimiento y producción de enzimas catalíticas a niveles más bajos en comparación con las bacterias aerobias (Duff y Murray 1996).

Por otra parte, la actividad de la β -glucosidasa de los microorganismos productores de celulasas no es suficiente para hidrolizar toda la celobiosa resultante de la degradación de la celulosa, por lo que se recurre a la adición exógena de otras fuentes de esta enzima (Sun y Cheng 2002). Esto representa otro gasto en el proceso, por lo que el uso de microorganismos con la capacidad de hidrolizar y fermentar celobiosa es bastante atractivo. Una gran variedad de fuentes microbianas productoras de etanol a partir de celobiosa han sido estudiadas y algunas se resumen en la **Tabla 1**. La β -glucosidasa de los microorganismos celulolíticos puede ser exportada al exterior de la célula para hidrolizar la celobiosa del medio o puede encontrarse de manera intracelular, por lo que requiere primeramente transportar la celobiosa a su interior. Se ha reportado el paso de celobiosa al interior de la célula por medio del transportador lactosa permeasa en *Kluyveromyces lactis* (Ha et al. 2013) y los transportadores de celodextrinas en levaduras como *Scheffersomyces stipitis* (Sadie et al. 2011) y el hongo *Neurospora Crassa* (Galazka et al. 2010). Sin

embargo, el mecanismo exacto de la manera en que estos transportadores llevan a la celobiosa al interior de la célula no ha sido totalmente estudiado (Kim et al. 2014).

Tabla 1. Microorganismos productores de etanol a partir de celobiosa

Microorganismo	Fuente
<i>Brettanomyces custersii</i>	(Spindler et al. 1992)
<i>Candida lusitanae</i>	(Maleszka et al. 1982)
<i>Candida queiroziae</i>	(Santos et al. 2011)
<i>Candida wickerhamii</i>	(Skory et al. 1996)
<i>Clavispora sp</i>	(Liu et al. 2012)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	(Yu et al. 2014)
<i>Debaryomyces pseudopolymorphus</i>	(Villena e Iranzo 2006)
<i>Dekkera intermedia</i>	(Blondin y Ratomahenina 1983)
<i>Neurospora crassa</i>	(Tian y Beeson 2009)
<i>Penicillium oxalicum</i>	(Li et al. 2013b)
<i>Pichia wickerhamii</i>	(Maleszka et al. 1982)
<i>Spathaspora passalidarum</i>	(Long e t al. 2012)

De igual manera, existe una gran variedad de especies de levaduras, hongos y bacterias que son capaces de producir enzimas xilanolíticas y fermentar xilosa de manera natural. Dentro de los microorganismos productores de las enzimas xilanolíticas, en la **Tabla 2** se muestran los más importantes.

En la fermentación de pentosas, las bacterias más comunes son *Bacillus macerans*, *Bacillus polymyxa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium acetobutylicum*, *Aeromonas hydrophila*, *Aerobacter sp.*, *Erwinia sp.*, *Escherichia sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* y *Zymomonas mobilis*. Sin embargo, su baja tolerancia a etanol y la formación de otros productos durante la fermentación hace de las bacterias una opción no viable comercialmente (Kuhad et al. 2011). También existen varias especies de hongos como *Chalara*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Neurospora*, *Paecilomyces* y *Trichoderma* con el potencial de fermentar xilosa. Aunque poseen diversas desventajas fisiológicas como alta viscosidad y largos periodos de fermentación, baja productividad de etanol y elevada formación de productos secundarios (Hahn-Hägerdal et al. 2007; Kuhad et al. 2011). Debido a lo anterior, las levaduras son los microorganismos más utilizados para la fermentación de xilosa (**Tabla 3**), y la investigación se ha enfocado en el aislamiento de nuevas levaduras fermentadoras de D-xilosa y mejoramiento de las ya existentes (Cho y Jeffries 1999).

Tabla 2. Microorganismos productores de xilanasas.

Bacteria	Hongos	Levaduras
<i>Acidobacterium capsulatum</i>	<i>Acrophialophora nainiana</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>
<i>Bacillus sp</i>	<i>Aspergillus sp</i>	<i>Cryptococcus albidus</i>
<i>Cellulomonas sp</i>	<i>Cephalosporium sp</i>	<i>Trichosporon cutaneum</i>
<i>Micrococcus sp</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Streptomices sp</i>

<i>Staphylococcus sp</i>	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	<i>Thermomonospora curvata</i>
<i>Thermotoga maritima</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	

Adaptado de Beg et al. (2001)

Tabla 3. Levaduras fermentadoras de xilosa

Levadura	Fuente	Levadura	Fuente
<i>Candida albicans</i>	(Harcus et al. 2013)	<i>Hansenula polymorpha</i>	(Fonseca et al. 2008)
<i>Candida shehatae</i>	(Kurtzman 2011)	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	(Rao et al. 2008)
<i>Candida boidinii</i>	(Morais et al., 2013)	<i>Pachysolen tannophilus</i>	(Jeffries 2006)
<i>Candida cellulocola</i>	(Morais et al., 2013)	<i>Scheffersomyces</i>	(Harcus et al. 2013)
<i>Candida tropicalis</i>	(Morais et al., 2013)	<i>queiroziae</i>	
<i>Candida intermedia</i>	(Morais et al., 2013)	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	(Kurtzman 2011)
<i>Candida queiroziae</i>	(Morais et al., 2013)	<i>Spathaspora</i>	(Wohlbach et al.
<i>Candida utilis</i>	(Kuhad et al. 2011)	<i>passalidarum</i>	2011)
<i>Cryptococcus</i>	(Ocampo-Ortega,	<i>Sugiyamaella sp.</i>	(Morais et al. 2013)
<i>humicola</i>	2011)	<i>Sugiyamaella xylanicola</i>	(Morais et al. 2013)
<i>Dreissena polymorpha</i>	(Kuhad et al. 2011)	<i>Wickerhamomyces pijperi</i>	(Morais et al. 2013)

1.4 *Cryptococcus humicola*

Las levaduras basidiomicetas del género *Cryptococcus* pueden ser encontradas en diferentes hábitats que incluyen suelo, aire, residuos de materia orgánica, flores y frutas (Wanderley y Torres 2004), lo que les confiere la capacidad de asimilar diferentes fuentes de carbono (**Tabla 4**).

Cryptococcus humicola, cepa utilizada en este trabajo, fue aislada de mostos de mezcal provenientes del estado de Oaxaca. Es anaerobia facultativa y forma

colonias blanquecinas con un diámetro de 2-3 mm, que al microscopio se observan con una forma ovalada y alargada. Además, es capaz de asimilar la mezcla de azúcares presentes en los hidrolizados del material lignocelulósico (González-García, 2009), ya que asimila la xilosa y la celobiosa, capacidad que no posee la levadura etanológica más utilizada, *Saccharomyces cerevisiae* (Matsushika et al., 2009; Ocampo-Ortega, 2011).

Tabla 4. Fuentes de carbono asimilables por *Cryptococcus humicola*. Adaptado de Takashima et al. (2001)

Fuente de carbono		
Utilizadas		No siempre utilizadas
L-sorbosa	Ribitol Salicina	Rafinosa
Trihalosa	Glucono δ-lactona	Etanol
Melibiosa	Inositol	Hexadecano
Melezitosa	Sacarosa	Butano 2,3-diol
D-arabinosa	Xilitol	
L-ramnosa	L-arabitol	
Eritritol	Metil α-D-glucósido	

1.5 Mejoramiento genético por mutagénesis

El mejoramiento genético de microorganismos es importante para el desarrollo de procesos de interés industrial y la mutagénesis tradicional es una de las técnicas

más utilizadas. Esta incluye métodos físicos y químicos en combinación con tecnologías racionales de selección, con la finalidad de inducir cambios en la secuencia del genoma del microorganismo a trabajar y obtener así cepas con una mayor producción de compuestos de interés (Qureshi et al. 2007; Harner et al. 2015). Tanto el uso de compuestos químicos o luz UV para el mejoramiento de microorganismos, poseen el potencial de generar mutaciones con ganancia de función que pueden producir considerables mejoras en rendimientos. Por ejemplo, un sólo cambio de pares de bases en una enzima puede alterar la especificidad por su sustrato o que sea constitutivamente activa (Bose 2016). Estas técnicas pueden proporcionar un método relativamente fácil de generación de mutantes para aquellos investigadores con poca experiencia en manipulación genética y biología molecular (Bose 2016).

Dentro de las técnicas físicas de mutagénesis se encuentra la exposición a luz UV, la cual conduce a daño en el ADN, tanto directamente como por estrés oxidativo. Esto se da a través de la generación de especies reactivas de oxígeno, donde la activación de moléculas como riboflavina, triptófano y porfirina, activan a su vez el oxígeno celular (Ikehata y Ono 2011). Mientras que la mutagénesis química se puede realizar utilizando una variedad de productos químicos (**Tabla 5**) que causan daño en el ADN, dando lugar a cambios y/o deleciones en la secuencia de nucleótidos (Bose 2016). Uno de los compuestos químicos con mayor espectro y más ampliamente utilizado en la mutagénesis, es el agente N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), el cual induce un relativo amplio espectro de mutaciones al alquilar las purinas y pirimidinas. Aunque la NTG posee especificidad hacia cierto tipo de sustituciones, las cuales son principalmente el cambio de las bases nucleotídicas G-C→A-T y en un

menor grado A-T→G-C y A-T→C-G (Ohnishi et al. 2008; Li et al. 2013a). Estas técnicas han logrado resultados más significativos en la productividad y rendimiento de etanol a partir de xilosa que los métodos racionales como ingeniería genética, mutagénesis sitio dirigida, evolución directa de proteínas, así como silenciamiento, sobreexpresión o introducción de genes (Kim et al. 2012).

Tabla 5. Compuestos químicos utilizados en la mutagénesis de microorganismos.

Compuesto químico	Mutación
Acriflavina	Intercalación de DNA que lleva a deleciones o cambio del marco abierto de lectura
Etil metanosulfonato (EMS)	Alquilación de guanina que genera mutaciones puntuales
Dietil sulfato	Etilación del DNA que genera mutaciones puntuales
NTG	Alquilación del DNA que genera mutaciones puntuales

Adaptado de Bose (2016).

II Justificación

La producción de bioetanol a partir de residuos agroindustriales es una opción para afrontar el agotamiento de los combustibles fósiles y la creciente demanda energética. Los principales azúcares obtenidos después de la sacarificación de la biomasa lignocelulósica son celobiosa y xilosa. Azúcares que *Saccharomyces cerevisiae*, la levadura etanológica más utilizada no es capaz de asimilar. Es económicamente deseable el máximo aprovechamiento de los azúcares presentes en los residuos lignocelulósicos, por lo que la búsqueda y mejoramiento de levaduras que si tengan la capacidad de asimilarlos es bastante atractiva.

Cryptococcus humicola es una levadura capaz de asimilar los azúcares presentes en los sacarificados de la biomasa lignocelulósica, y en condiciones de fermentación puede producir etanol. Sin embargo, los niveles de producción de etanol por *C. humicola* son muy bajos para un proceso biotecnológico. Por lo que su mejora por medio de mutagénesis química podría ayudar a incrementar la producción de etanol a partir del material lignocelulósico.

III Hipótesis

Mutantes de *C. humicola* OJ-31 producirán mayor cantidad de etanol a partir de xilosa que su cepa madre.

Mutantes de *C. humicola* OJ-31 producirán una mayor cantidad de etanol a partir de celobiosa que su cepa madre.

IV Objetivos

4.1 Objetivo general

Obtener mutantes de *C. humicola* OJ-31 que presenten una mejor producción de etanol a partir de la fermentación de celobiosa y xilosa presente en los sacarificados de bagazo de caña, con respecto a su cepa madre.

4.2 Objetivos específicos

Caracterizar el crecimiento de *C. humicola* OJ-31 a partir de diferentes fuentes de carbono.

Seleccionar cepas mutantes de *C. humicola* OJ-31 con una mejor capacidad de producir etanol a partir de xilosa.

Seleccionar cepas mutantes de *C. humicola* OJ-31 con una mejor capacidad de producir etanol a partir de celobiosa.

V Materiales y métodos

5.1. Microorganismos empleados y condiciones de cultivo

En el presente trabajo se utilizó la levadura basidiomiceta *Cryptococcus humicola* OJ-31, obtenida por mejoramiento de la cepa silvestre, con el agente mutagénico N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) (Ocampo-Ortega, 2011). Las condiciones de crecimiento fueron 30 °C y 150 rpm en medio YM o sus variantes.

Se utilizó *Cellulomonas flavigena* PR-22 para la obtención de sacarificados (Rojas-Rejón et al. 2011). Para su crecimiento se utilizó el medio M10 con bagazo de caña como fuente de carbono y, las condiciones de cultivo fueron 37 °C y 150 rpm durante 24 h.

5.2 Medios de cultivo

5.2.1 Medio YM

Composición en g/L: bactopectona 5; extracto de levadura 3; extracto de malta 3 y glucosa 10. Los medios YMX y YMC poseen la misma composición, pero con xilosa y celobiosa como fuente de carbono, respectivamente.

5.2.2 Medio Breus

Composición en g/L: extracto de levadura 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 y glucosa 10 (Breus et al. 2012). El medio Breus-celobiosa posee la misma composición, a excepción de la fuente de carbono que se sustituye por celobiosa.

5.2.3 Medio Kulakovskaya

Composición en g/L: extracto de levadura 0.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 10.9, ácido cítrico 7.3 y glucosa 10.

5.2.4 Medio Basal

Composición en g/L: extracto de levadura 1, NaNO_3 3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, KH_2PO_4 0.3 y glucosa 10.

5.2.5 Medio M10

Composición en g/L: NaCl 5.5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5, PO_4^{3-} 3.5, MgSO_4 0.1, CaCl_2 0.1, extracto de levadura 0.2, bagazo de caña pretratado 10. Se aforan a 1 L con agua corriente.

5.3 Preparación del inóculo

Se tomó una colonia de *C. humicola* OJ-31 para inocular un matraz de 250 mL con 50 mL del medio YM con la fuente de carbono correspondiente, se incubó durante 16 h a 30 °C y 150 rpm. Se tomó 10 % (v/v) de este preinóculo para inocular un matraz con medio YM y se incubó bajo las mismas condiciones. Posteriormente, se lavaron las células dos veces al centrifugarlas a 8000 rpm durante 10 min y resuspender el paquete celular en agua destilada estéril al volumen original.

5.4 Cinéticas de crecimiento aerobio de *C. humicola* OJ-31 a partir de diferentes fuentes de carbono

Se utilizaron matraces de 500 mL con 100 mL de los medios de cultivo YM, YMC y YMX, los cuales se inocularon con 10 % (v/v) de un preinóculo de *C. humicola*

OJ-31 incubado en sus medios de cultivo correspondientes como se describió anteriormente. Los cultivos se realizaron por duplicado y se incubaron durante 22 h tomando 2 mL de muestra cada dos horas; las muestras se guardaron en refrigeración a 4 °C hasta su análisis posterior. Se determinó el crecimiento celular por medición de densidad óptica a 660 nm. Posteriormente, 1 mL de muestra se centrifugó a 6000 rpm durante 5 min, y se cuantificaron los azúcares reductores presentes en el sobrenadante para determinar el sustrato residual.

5.5 Evaluación de medios de cultivo mínimos para la fermentación con *C. humicola* OJ-31

Matraces de 500 mL conteniendo 100 mL de los medios Breus, Kulakovskaya y Basal con glucosa como fuente de carbono, fueron inoculados con *C. humicola* OJ-31. Los cultivos se incubaron a las condiciones descritas anteriormente. Se tomó muestra a las 0, 6 y 24 h para determinar el crecimiento celular mediante densidad óptica a 660 nm. Las pruebas se realizaron por duplicado.

5.6 Localización de la β -glucosidasa de *C. humicola* OJ-31

Se incubó *C. humicola* OJ-31 para su crecimiento en matraces de 500 mL con 100 mL de medio YMC y 100 mL de medio YM durante 16 h. Se cosecharon las células por centrifugación a 8000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se guardó para la evaluación de la actividad de β -glucosidasa. El botón celular se resuspendió en 400 μ L de regulador fosfatos 0.1 M pH 7.2. Se guardó una alícuota en refrigeración a 4 °C para la determinación de la actividad de la β -glucosidasa y el resto se llevó a rompimiento mecánico para la obtención del extracto crudo libre de células.

5.7 Rompimiento mecánico de las células

La suspensión celular se pasó un tubo Eppendorf y se llevó a congelación a -20 °C durante 30 min. Posteriormente se descongelaron las células y se añadieron 0.3 g de arena de vidrio y 150 µL de 2-mercaptoetanol 0.1 M, se agitó en vortex durante 30 min para el rompimiento celular. El lisado se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min y se separaron el extracto crudo libre de células y los restos celulares.

Se determinó la actividad de β-glucosidasa y proteína celular de las células intactas, del sobrenadante del medio de cultivo y del extracto crudo libre de células para localizar la fracción con mayor actividad.

5.8 Mutagénesis de *C. humicola* OJ-31

Se sometió a *C. humicola* OJ-31 a mutagénesis por la metodología descrita por Lawrence (1991), utilizando 150 µg/mL de NTG durante 20 min, para obtener una tasa de letalidad mayor al 90% (Ocampo-Ortega, 2011).

25 mL de un cultivo de *C. humicola* OJ-31 a mitad de su fase exponencial se centrifugó y lavó dos veces con 25 mL de agua destilada estéril a 8000 rpm durante 10 min. El paquete celular se resuspendió en 25 mL de agua estéril, se adicionó la NTG y se incubó durante 20 min a 30 °C y 150 rpm. Posteriormente, el cultivo se centrifugó para eliminar la NTG y se resuspendió en 25 mL de tiosulfato de sodio estéril al 2% para neutralizar al agente mutagénico, seguido de otra centrifugación. Al cultivo mutagenizado se le realizó una serie de lavados con 25 mL de agua estéril en 4 repeticiones para eliminar los restos del agente mutagénico. Por último, se

resuspendió el botón celular en 25 mL de medio YM y se incubó durante 2 h para permitir que las células se recuperaran del estrés ocasionado por la NTG.

5.9 Selección de mutantes fermentadoras de xilosa

Después de la mutagénesis y recuperación como se describió anteriormente, los 25 mL de cultivo se centrifugaron a 8000 rpm durante 15 min, se resuspendieron en 25 mL de agua destilada estéril y se distribuyeron en 5 frascos serológicos de 25 mL con medio YMX y un volumen de operación de 20 mL. Se llevaron a fermentación a 30 °C durante 72 h con el propósito de promover la supervivencia de las mutantes con mejores capacidades de adaptación a condiciones anaerobias y xilosa como fuente de carbono. Después de la fermentación, se centrifugaron las mutantes y resuspendieron en agua destilada estéril. Se realizaron diluciones decimales de las células para sembrar en placas de medio YMX y poder elegir las colonias aisladas de células individuales que presentaran un mejor crecimiento.

Las células aisladas se sembraron por picadura en placas de medio YMX + 0.5 % de 2-desoxiglucosa (2-DG) y se llevaron a incubación a 30 °C durante 72 h. Se seleccionaron las mutantes que presentaron un mejor crecimiento y con ellas se inocularon tubos Durham de 25 mL con 5 mL de medio YMX durante 24 h para su crecimiento. Estas mutantes se utilizaron como inóculo al 10 % (v/v) en tubos de Durham de 25 mL con un volumen de operación de 5 mL de medio YMX + 0.5 % de 2-DG y se incubaron durante 24 h. Se determinó la densidad celular a 660 nm a las 0 y 24 h, se seleccionaron las mutantes que presentaron un mejor crecimiento. Estas se llevaron a fermentación en frascos serológicos de 10 mL en medio YMX y posteriormente en medio Breus-xilosaelobiosa para elegir la mejor mutante.

5.10 Selección de mutantes fermentadoras de celobiosa

Después de la recuperación del cultivo mutagenizado de *C. humicola* OJ-31 en medio YM, se centrifugaron y lavaron las células con 25 mL de agua destilada estéril. Se centrifugaron una vez más y se resuspendieron en 20 mL de medio YMC, para ser llevadas a un frasco serológico de 25 mL estéril. Los cultivos se sometieron a anaerobiosis durante 16 h; este paso se repitió tres ocasiones. Inmediatamente después de la adaptación, el cultivo mutagenizado fue centrifugado y lavado con agua destilada estéril. Este se repartió equitativamente en 5 frascos serológicos de 10 mL con un volumen de operación de 9 mL de medio Breus, inóculo y diferentes concentraciones de celobiosa (20, 30 y 40 g/L). Los frascos se incubaron a 30 °C sin agitación durante 24 h y se estimó la capacidad fermentativa por producción de CO₂, al conectar los frascos sellados a tubos de Durham llenos de agua para medir el volumen de agua desplazado por el CO₂ en cada uno de los frascos.

Las mutantes que desplazaron más CO₂ en la etapa anterior se seleccionaron y estas fueron centrifugadas y lavadas con agua destilada estéril e incubadas en medio YMC durante 5 h a 30 °C y 150 rpm. Posteriormente el cultivo se centrifugó y lavó para ser utilizado en una fermentación en frascos serológicos de 10 mL con medio Breus, 40 g/L de celobiosa y un inóculo de 2×10^8 células/mL. Se utilizaron seis frascos serológicos que se incubaron a 30 °C durante 24 h. Se cuantificó la celobiosa consumida y el etanol producido.

5.11 Obtención de sacarificados de bagazo de caña (SBC)

5.11.1 Obtención del concentrado enzimático de *C. flavigena* PR-22

Se cultivó *C. flavigena* PR-22 en matraces de 1 L con 200 mL de medio M10 durante 24 h. Estos cultivos se utilizaron para inocular dos reactores de mesa tipo tanque agitado (Applikon) en una relación 10 % (v/v) con un volumen nominal de 3 L y un volumen de operación de 2 L. Las condiciones de operación fueron 37 °C, 0.5 vvm y 500 rpm durante 24 h para el crecimiento celular y producción de enzimas. Después de este tiempo, se recuperó el caldo de cultivo y se eliminó el bagazo de caña residual con ayuda de una malla de acero y una posterior centrifugación a 7,000 rpm durante 15 min, para eliminar el resto de bagazo fino y las células. El sobrenadante se concentró 10X con ayuda de un ultrafiltro (Amicon 4800, 30 KDa) para eliminar las sales del medio M10 y concentrar las enzimas. Por último, se determinó la actividad final de xilanasas y CMCasas.

5.11.2 Sacarificados de bagazo de caña obtenidos con enzimas de *C. flavigena* PR-22

Se utilizó un reactor de mesa tipo tanque agitado (Applikon) de 3 L, con un volumen de operación de 2 L de agua destilada y 3 % (p/v) de bagazo de caña molido y pretratado con NaOH 1.5 %. Para la sacarificación se utilizó el concentrado enzimático de *C. flavigena* PR-22 obtenido previamente, ajustando la actividad

enzimática a 10,000 UI de xilanasas/L. Las condiciones de operación fueron 300 rpm a 40 °C durante 24 h y 50 °C durante las siguientes 24 h.

5.11.3 Sacarificados de bagazo de caña obtenidos con las enzimas comerciales Celluclast^(MR)

Se utilizó un matraz de 500 mL con un volumen de operación de 100 mL de regulador citratos 25 mM pH 4.8 y 2 % (p/v) de bagazo de caña pretratado. Se ajustó la actividad enzimática del concentrado enzimático comercial Celluclast^(MR) 1.5 L (Novozymes) a 30 UFP/g de celulosa (Sarkar et al. 2012). Se incubó la mezcla a 50 °C y 150 rpm durante 24 h. Posteriormente se recuperó el sacarificado y se removió el bagazo de caña residual al pasar el medio por una malla de acero y posterior centrifugado del sobrenadante a 7000 rpm durante 15 min. Se utilizaron los azúcares obtenidos para la fermentación con *C. humicola* OJ-31 y QN-52 en viales de 10 mL con medio Breus y como se describió anteriormente.

5.12 Fermentaciones con *C. humicola*

5.12.1 Fermentación en lote en reactores tanque agitado (Sixfors) con *C. humicola* OJ-31

Se utilizaron reactores de mesa (Sixfors) de 500 mL con un volumen de operación de 400 mL, de los cuales 360 mL corresponden al medio de cultivo a evaluar y 40 mL del inóculo descrito anteriormente. Se utilizó el medio YM con dos composiciones diferentes de fuente de carbono. Para el primero se utilizó medio YM con glucosa, celobiosa y xilosa a una concentración de 5 g/L de cada uno. Para el segundo se utilizó medio YMX con 10 g/L de xilosa. Una vez inoculados los

reactores, se burbujearon con nitrógeno gaseoso filtrado para promover la anaerobiosis. Se tomaron muestras en el tiempo 0 h y cada 12 h durante 96 h. Las muestras se guardaron a 4 °C hasta su análisis posterior. Los experimentos se realizaron por duplicado y se cuantificaron los azúcares residuales y el etanol producido.

5.12.2 Fermentación en lote en frascos serológicos con *C. humicola* OJ-31 y QN-52

Se utilizaron frascos serológicos de 10 mL con 9 mL de medio de cultivo Breus, inóculo y la concentración de azúcares a trabajar. *C. humicola* se incubó durante 6 h para alcanzar la mitad de su fase exponencial. El inóculo utilizado se ajustó a una concentración de 2×10^8 células/mL. Se sellaron los frascos y se incubaron a 30 °C durante el tiempo determinado. Las fermentaciones se realizaron por triplicado y las muestras se analizaron al final del proceso. Se cuantificaron azúcares y etanol por HPLC y azúcares reductores por DNS.

Se realizaron fermentaciones a diferentes concentraciones y mezclas de las fuentes de carbono: celobiosa, glucosa, xilosa y sacarificados de bagazo de caña.

5.12.3 Fermentación en lote alimentado en frascos serológicos con *C. humicola* OJ-31 y QN-52

Se utilizaron frascos serológicos de 25 mL con un volumen de operación inicial de 15 mL con medio Breus, 10 g/L de celobiosa y un inóculo de 2×10^8 células/mL. Se sellaron los frascos y se incubaron a 30 °C. A las 16, 32 y 48 h de fermentación se añadieron pulsos de celobiosa de un concentrado estéril con ayuda de una jeringa

estéril para ajustar su concentración a 10 g/L. Se tomaron muestras al inicio, al final y cada 16 h. Las fermentaciones se realizaron por triplicado y las muestras se analizaron al final del proceso. Se cuantificaron azúcares y etanol por HPLC y azúcares reductores por DNS.

5.13 Determinación de azúcares reductores

A las muestras de 100 μ L de la dilución respectiva, se añadieron 400 μ L de agua destilada y 1.5 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS). Se llevaron los tubos a ebullición en baño María por 5 min y se enfriaron en un baño de agua a temperatura ambiente. Se adicionaron 3 mL de agua destilada a cada una de las muestras y se midió la absorbancia a 550 nm (Miller 1959). La concentración de azúcares se determinó con una curva estándar para cada uno de los azúcares evaluados (glucosa, xilosa o celobiosa).

5.14 Medición de azúcares y etanol en HPLC

Se utilizó un equipo HPLC-IR (Agilent Technologies modelo 1260 Infinity); columna Hi-plex H⁺ 300 x 7.7 mm (Agilent) y una precolumna Hi-plex Guard Column 50 x 7.7 mm (Agilent). La fase móvil fue H₂SO₄ 5 mM en agua desionizada, con un flujo de 0.6 ml/min, temperatura de detector de 50°C y temperatura en columna de 65°C. Las muestras fueron previamente centrifugadas y filtradas con un acrodisco de 1.3 cm de diámetro y un tamaño de poro de 0.45 μ m (PALL).

5.15 Determinación de proteína celular

La proteína celular se determinó por el método de Lowry et al. (1951) con modificaciones por Herbert et al. (1971) usando 50 μL de suspensión celular o extracto crudo.

En tubos de ensaye se mezclaron 50 μL de muestra con 450 μL de agua destilada y 500 μL de NaOH 1N; se llevaron a ebullición en baño María durante 5 min. Se dejó enfriar y se agregaron 2.5 mL de reactivo C (preparado con 50 mL de Na_2CO_3 al 5 %, 1 mL de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1 % y 1 mL de tartrato de sodio y potasio al 2 %), se agitó y se dejó reposar 10 min. Se añadieron 500 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N (Sigma-Aldrich) y se agitó vigorosamente, se dejó reposar 30 min y se leyó la absorbancia a 750 nm. Se utilizó una curva estándar realizada con albúmina de suero bovino en un intervalo de 0-2 mg/mL.

5.16 Determinación de actividades enzimáticas

5.16.1 Actividad de β -glucosidasa

La actividad de la β -glucosidasa fue estimada espectofotométricamente midiendo la liberación de p-nitrofenol (pNP) mediante la hidrólisis de p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG).

Se mezclaron 0.1 mL de la muestra de extracto enzimático con 1 mL de pNPG 1mM en regulador fosfatos 25 mM pH 6.2. Se incubaron a 40 °C durante 15 min y la reacción se detuvo por la adición de 1 mL de Na_2CO_3 1 M (modificado de Kim and Pack, 1989). Se leyó la absorbancia a 405 nm y se calculó la concentración de pNP liberado con ayuda de una curva estándar. Una unidad de actividad de β -glucosidasa se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol de pNP por minuto en las condiciones estándar de ensayo.

5.16.2 Actividad sobre papel filtro (PFasa)

Se mezcló el papel filtro de 0.25 x 10 cm enrollado con 0.5 mL de extracto enzimático diluido y 0.5 mL de regulador de citratos pH 4.8 50 mM, se agitó y se incubó a 50 °C durante 1 h. Se añadió 1.5 mL de DNS, se agitó y se llevó a ebullición en baño María durante 5 min. Se enfrió, se agregaron 2.5 mL de agua destilada y se leyó la absorbancia a 550 nm contra un testigo de reactivo (sin muestra y sin sustrato), un testigo de enzima (sin sustrato) y un testigo de sustrato (sin muestra) (Ghose 1987). La actividad se expresa como unidades de papel filtro (PFasa), es decir, los micromoles de glucosa liberada por minuto de la hidrólisis de 25 mg de papel filtro Whatman No. 1.

5.16.3 Actividad de xilanasas

Las xilanasas se determinaron en una mezcla de 0.98 mL de regulador citratos fosfatos pH 7, 50 mM, 500 µL de xilana al 1 % en agua destilada y 20 µL de muestra. La mezcla se incubó a 40 °C durante 5 min. Se detuvo la reacción con 1.5 mL de DNS, se llevó a baño María durante 5 min y se enfrió a temperatura ambiente. Se añadieron 2 mL de agua destilada, se homogenizó y se leyó la absorbancia a 550 nm contra un testigo de reactivo, un testigo de enzima y un testigo de sustrato. Una unidad de xilanasas se representa como los µmol de xilosa liberada por minuto bajo las condiciones estándar de ensayo.

5.16.4 Actividad de CMCasas

Se utilizó una mezcla de 0.15 mL de regulador Tris-HCl 50 mM pH 7.0, 0.25 mL de CMC 1 % en el mismo regulador y 0.10 mL de muestra. La mezcla se incubó a 50 °C durante 3 min. Se añadió 1.5 mL de DNS para detener la reacción, se agitó y se llevó a baño María durante 5 min. Se enfrió a temperatura ambiente, se agregaron 3 mL de agua destilada, se agitó y se leyó su absorbancia a 550 nm contra el testigo de reactivo, testigo de enzima y testigo de sustrato. Una unidad de CMCase se representa como los μmol de celobiosa liberada por minuto bajo las condiciones estándar de ensayo.

VI Resultados y Discusión

6.1 Cinéticas de crecimiento de *C. humicola* OJ-31

Se realizaron cinéticas del crecimiento de *C. humicola* OJ-31 en los medios YM, YMC y YMX con el propósito de evaluar su capacidad de asimilar y crecer a partir de diferentes fuentes de carbono. En el caso del medio YM, *C. humicola* OJ-31 presentó una velocidad específica de crecimiento de 0.40 h^{-1} , consumiendo casi la totalidad de la glucosa en las primeras 4 h de cultivo y alcanzando el estado estacionario a las 10 h con una biomasa final de 3.95 g/L y un rendimiento de $0.35 \text{ g biomasa/g glucosa consumida}$ (**Figura 6a**). El comportamiento cinético de *C. humicola* OJ-31 en medio YMC, fue muy similar al obtenido con glucosa con una biomasa y rendimiento final de 4.23 g/L y $0.39 \text{ g biomasa/g celobiosa consumida}$, respectivamente (**Figura 6b**). Por otra parte, el comportamiento cinético en el medio YMX fue muy diferente al de los dos casos anteriores, con una velocidad específica de crecimiento mucho menor (0.10 h^{-1}) y alcanzando el estado estacionario hasta las 18 h de cultivo. Además, con un tiempo de cultivo más prolongado, a las 22 h se obtuvo un máximo de biomasa de 3.75 g/L con un rendimiento de $0.44 \text{ g biomasa/g xilosa consumida}$ (**Figura 6c**).

Los resultados anteriores indican que *C. humicola* OJ-31 posee la capacidad de asimilar y crecer en glucosa y celobiosa de manera eficiente, mientras que el consumo y crecimiento a partir de xilosa se presenta, pero más lentamente que en los anteriores.

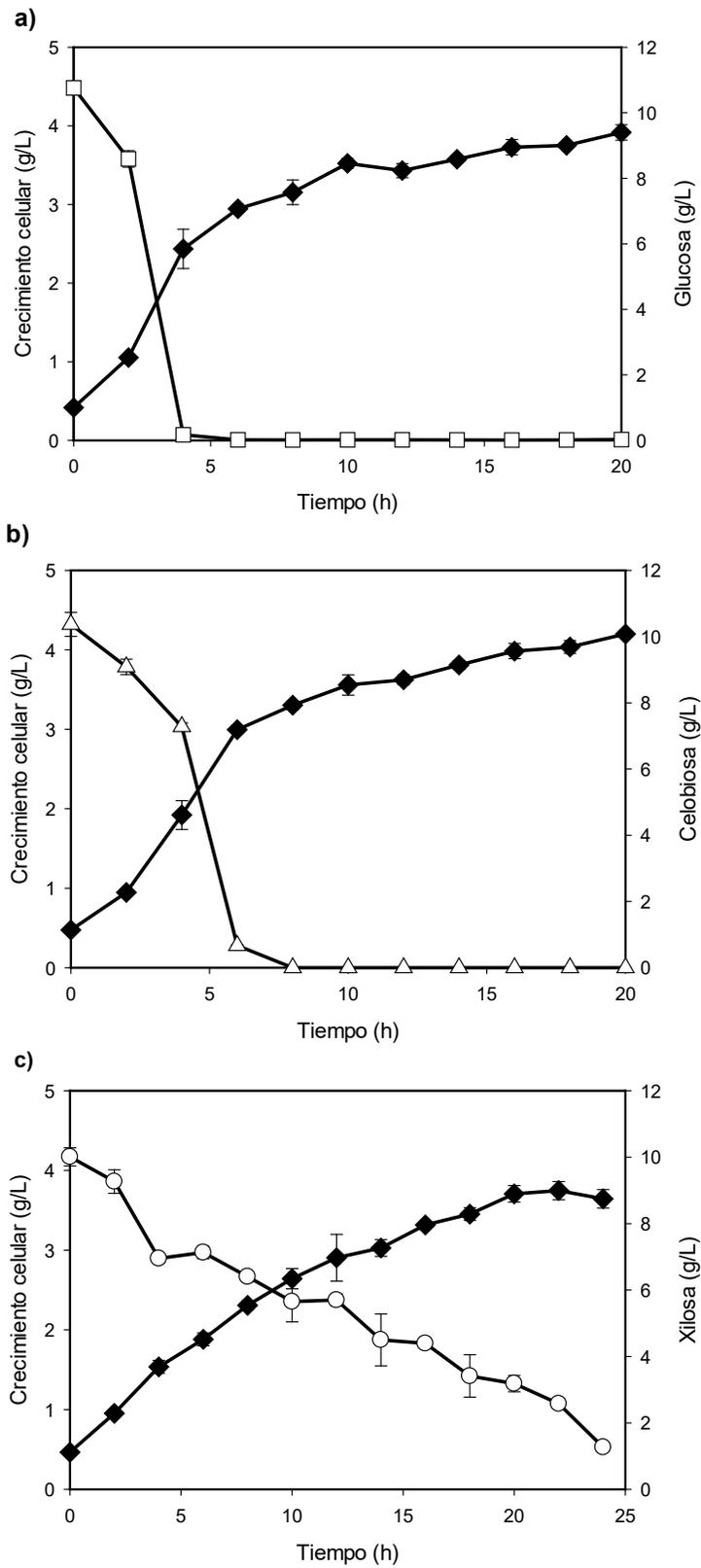


Figura 6. Cinética de crecimiento y consumo de sustrato con *Cryptococcus humicola* OJ-31 en medio: a) YM; b) YMC; c) YMX.

Claves: Crecimiento celular (—◆—); glucosa (—□—); celobiosa (—△—); xilosa (—○—).

Klimacek et al. (2010) reportaron que la velocidad específica de crecimiento de *S. cerevisiae* es mucho menor al utilizar xilosa en comparación con glucosa. Esto se debe a una dramática reducción de los metabolitos de la glucólisis, ya que el flujo de carbono a través de la glucólisis es de 25 a 30 veces mayor al crecer con glucosa en comparación con la xilosa.

A través de un análisis de flujo metabólico Klimacek et al. (2010) encontraron que la poza del primer intermediario del flujo de xilosa hacia la glucólisis, la fructosa 6-fosfato (Fru6F) es un punto crítico. Una baja concentración de Fru6F da como resultado una baja actividad de la Fosfofructocinasa (PFK), la cual transforma a la Fru6F en Fructosa 1,6-bifosfato (Fru(1,6)P₂). Esto lleva a la disminución de la tasa de formación de Fru(1,6)P₂ y por lo tanto la continuación de la glucólisis y la formación de su último intermediario, piruvato. Lo anterior da como resultado una baja producción de energía e intermediarios para el crecimiento celular a partir de xilosa.

6.2 Producción de etanol por *C. humicola* OJ-31 en reactores tipo tanque agitado (Sixfors)

6.2.1 Fermentación alcohólica en lote de glucosa-celobiosa-xilosa

Se evaluó la capacidad de *C. humicola* OJ-31 para producir etanol a partir de una mezcla de azúcares. Se utilizaron reactores de tanque agitado de mesa de 500 mL (Sixfors) y medio YM con la mezcla de azúcares glucosa-celobiosa-xilosa a 5 g/l de cada uno de ellos. Se observó que la glucosa se consume casi en su totalidad durante las primeras 12 h, obteniendo 2.42 g/L de etanol en este punto (**Figura 7**). El consumo de la celobiosa fue más gradual, a las 12 h su concentración disminuye

muy poco y es hasta que no hay glucosa presente en el medio que la velocidad de consumo aumenta, agotándose hasta las 48 h teniendo en ese momento 4.53 g/L de etanol.

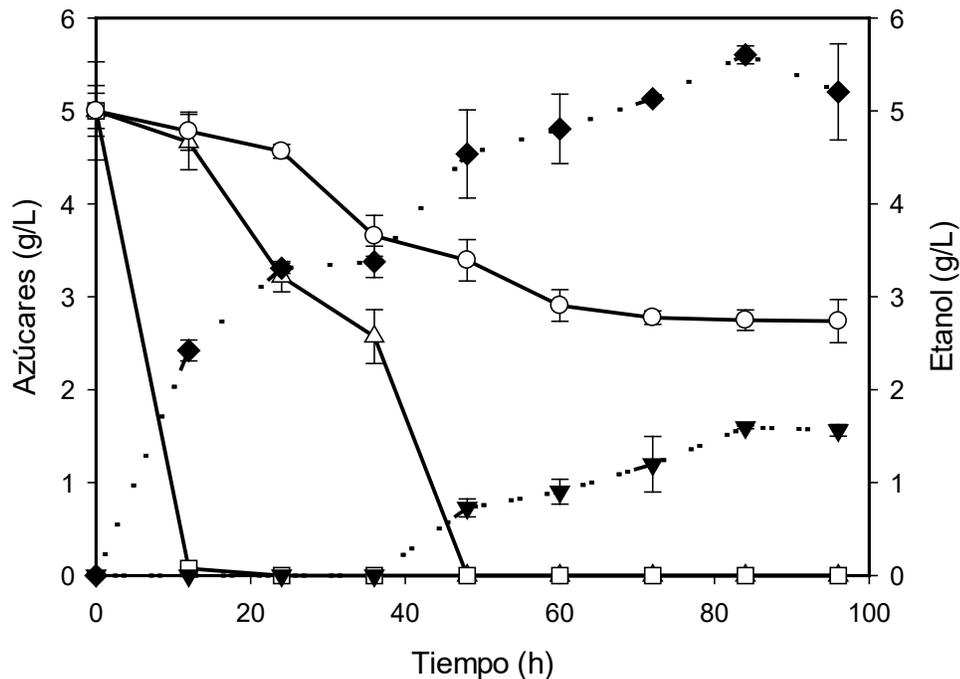


Figura 7. Producción de etanol y consumo de azúcares por *C. humicola* OJ-31 en reactores tipo tanque agitado (Sixfors) con medio YM glucosa-xilosa-celobiosa.

Claves: Glucosa (—□—); celobiosa (—△—); xilosa (—○—); etanol (-◆-); xilitol (-▼-)

Por otra parte, el consumo de la xilosa fue más lento que el de la glucosa y celobiosa, durante las primeras 24 h fue de sólo 0.44 g/L. A las 36 h se agotó la glucosa y cerca de la mitad de la celobiosa y es en este punto que aumenta el consumo de xilosa a 1.35 g/L. Sin embargo, al final de la fermentación sólo se consumieron 2.26 g/L de esta pentosa, de los cuales 1.56 g/L se fueron a la

formación de xilitol, el intermediario inmediato en la ruta de asimilación de xilosa. La producción de etanol fue incrementando conforme se consumieron los azúcares y el punto máximo se presentó a las 84 h con 5.6 g/L y un rendimiento de 0.53 g etanol/g azúcar consumido (**Figura 7**).

El orden de consumo de los azúcares se da de manera secuencial, observándose que el consumo de celobiosa y xilosa comienza una vez que se ha agotado la glucosa del medio, lo que indica que la glucosa puede estar ejerciendo cierta represión catabólica (Hahn-Hägerdal et al. 2007). En general las levaduras prefieren utilizar la glucosa, cuya producción de energía es más eficiente en comparación con otros azúcares y por lo tanto, en presencia de glucosa muchas células reprimen el metabolismo de otros azúcares (Harcus et al. 2013). Además, las enzimas requeridas para la utilización de fuentes de carbono alternativas, son sintetizadas a menores velocidades, o también puede presentarse una competencia por los transportadores que llevan a los azúcares al interior de la célula (Barnett y Entian 2005; Harner et al. 2015).

6.2.2 Fermentación alcohólica en lote de xilosa

Con la finalidad de evaluar la capacidad de *C. humicola* OJ-31 de producir etanol a partir de xilosa, se realizó la cinética de fermentación en medio YMX en reactor de 500 mL. En estas condiciones se observó que a las 12 h de la fermentación se consumieron 1.40 g/L de xilosa y se produjeron 1.02 g/L de etanol y 3.20 g/L de xilitol, estos valores se mantuvieron sin cambios significativos durante el resto de la fermentación (**Figura 8**). El punto máximo de producción de etanol fue a las 60 h con 1.05 g/L, valor que a las 72 h disminuyó a 0.99 g/L. Lo cual podría deberse a que el etanol es un sustrato ocasionalmente utilizado por *C. humicola*

(Takashima et al. 2001). El etanol producido pudo deberse a la gran cantidad de azúcares reductores presentes en el medio YM, ya que los componentes mayoritarios del extracto de malta son carbohidratos, principalmente glucosa y maltosa con 27.33 y 27.6 % de los sólidos secos totales, respectivamente (Heron 1966). La maltosa consiste en un disacárido intermediario en el rompimiento del almidón, formado por dos moléculas de glucosa unidas por un enlace $\alpha(1-4)$ (Lackie 2013).

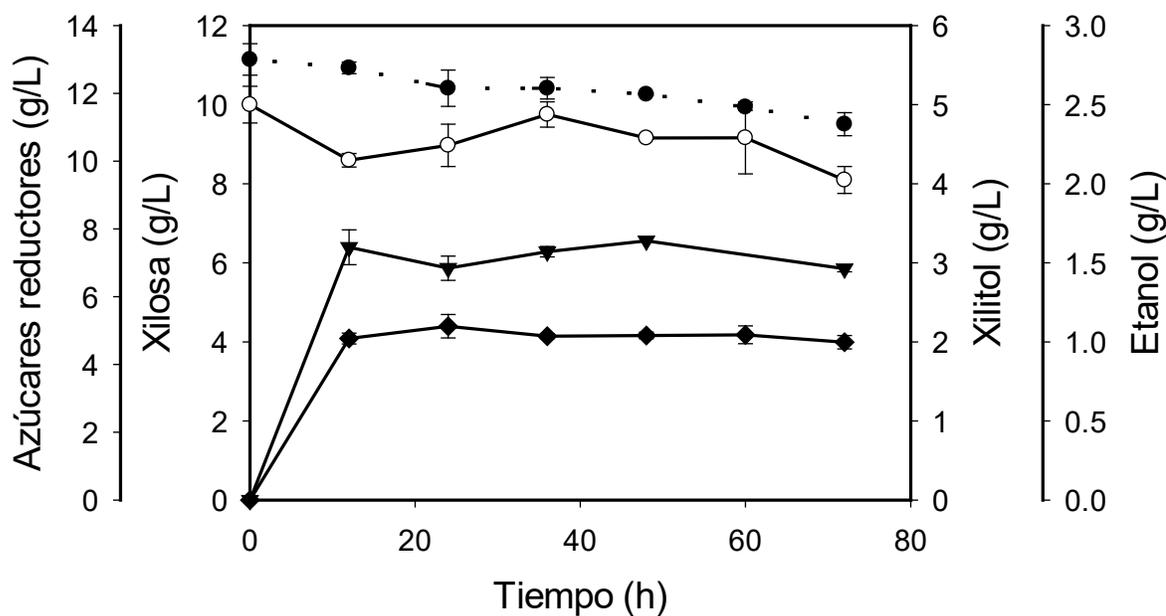


Figura 8. Producción de etanol y consumo de azúcares por *C. humicola* OJ-31 en reactores tipo tanque agitado (Sixfors) con medio YMX.

Claves: Azúcares reductores (—●—); xilosa (—○—); etanol (—◆—); xilitol (—▼—)

Al final de la fermentación se consumieron 1.91 g/L de xilosa y se produjeron 2.93 g/L de xilitol. Los 1.91 g/L xilosa consumida se redujeron a su intermediario xilitol y el 1.03 g/L de xilitol restante también podría atribuirse a los azúcares

reductores del medio YM. Se observó que *C. humicola* OJ-31 posee limitaciones para consumir xilosa en condiciones anaerobias. Se ha reportado que en la levadura *Scheffersomyces stipitis* la ausencia de oxígeno juega un papel crítico en el metabolismo de xilosa, balance rédox, crecimiento celular, funcionamiento de la mitocondria y generación de energía para el transporte de la xilosa (Skoog y Hahn-Hägerdal 1990). Bajo condiciones anaerobias existe un desbalance redox relacionado con las enzimas encargadas de los dos primeros pasos de su ruta metabólica, xilosa reductasa (XR) y xilitol deshidrogenasa (XDH), las cuales son dependientes de los cofactores NADPH y NAD⁺, respectivamente (Liang et al. 2014). La obtención de bajos rendimientos de etanol se ha relacionado con la vía metabólica de la xilosa al formarse el intermediario xilitol como consecuencia del pobre reciclaje de cofactores, lo que a su vez impide la continuación del xilitol hacia piruvato y finalmente etanol (Chu y Lee 2007; Matsushika et al. 2009a).

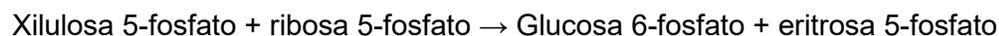
En la **Figura 9** se muestran las reacciones involucradas en el metabolismo de la xilosa hacia etanol en condiciones anaerobias. Se puede observar que no existe un balance en el intercambio de los cofactores, ya que se requieren más moléculas de NADPH y NAD⁺ que las que se producen en un ciclo de conversión de xilosa a etanol (balance neto). Lo anterior representa un problema, ya que estos mismos dos cofactores corresponden a las primeras dos reacciones de la ruta de la xilosa y como consecuencia el metabolismo de la xilosa se ve interrumpido. Otro aspecto a considerar en el lento metabolismo de la xilosa es la insuficiente expresión de los genes involucrados en la ruta no oxidativa de las pentosas fosfato (Chu y Lee 2007; Klimacek et al. 2010). Lo anterior coincide con otros estudios donde se ha reportado que se puede mejorar la producción de etanol y disminuir la de xilitol al incrementar

la afinidad de la XR por el NADH y sobreexpresar los genes de la ruta no oxidativa de las pentosas fosfato (PPP) (Jeppsson et al. 2006).

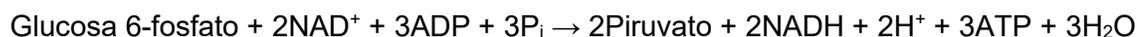
1) Xilosa a su intermediario en la ruta de PPP:



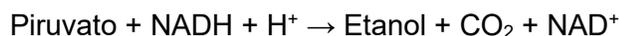
2) Ruta no oxidativa de la PPP:



3) Glucólisis:



4) Producción de etanol:



5) Balance neto de la fermentación de xilosa:



Figura 9. Rutas involucradas y balance de las reacciones para la transformación de xilosa en etanol. Adaptado de Nelson et al. (2008).

6.3 Evaluación del crecimiento de *C. humicola* OJ-31 en medios de cultivo mínimos

En los experimentos anteriores, se observó una interferencia de los azúcares presentes en el medio YM, tanto para el cálculo de rendimientos de producción de etanol, así como en la producción de los metabolitos a partir de un azúcar en

específico. Debido a esto, se buscó un medio mínimo para ser utilizado en las fermentaciones con *C. humicola* y eliminar la interferencia de los azúcares del medio. Por lo anterior, se evaluó la capacidad de *C. humicola* OJ-31 de crecer en tres medios mínimos con la fuente de carbono de interés. Se eligieron los medios Breus (Breus et al. 2012), Kulakovskaya (Kulakovskaya y Golubev 2006) y Basal (Morita et al. 2011) ya que se había reportado su uso con *C. humicola*.

El crecimiento celular de *C. humicola* OJ-31 se evaluó a las 0, 6 y 24 h de incubación utilizando glucosa como fuente de carbono. En los medios Breus y Kulakovskaya se presentó un comportamiento muy similar, alcanzando alrededor de 3.5 g/L de biomasa a las 24 h, mientras que el crecimiento con el medio basal fue mucho menor, siendo de 2.32 g/L (**Figura 10**). Se eligió el medio Breus para las etapas posteriores de fermentación, ya que su composición es más simple que la del medio Kulakovskaya.

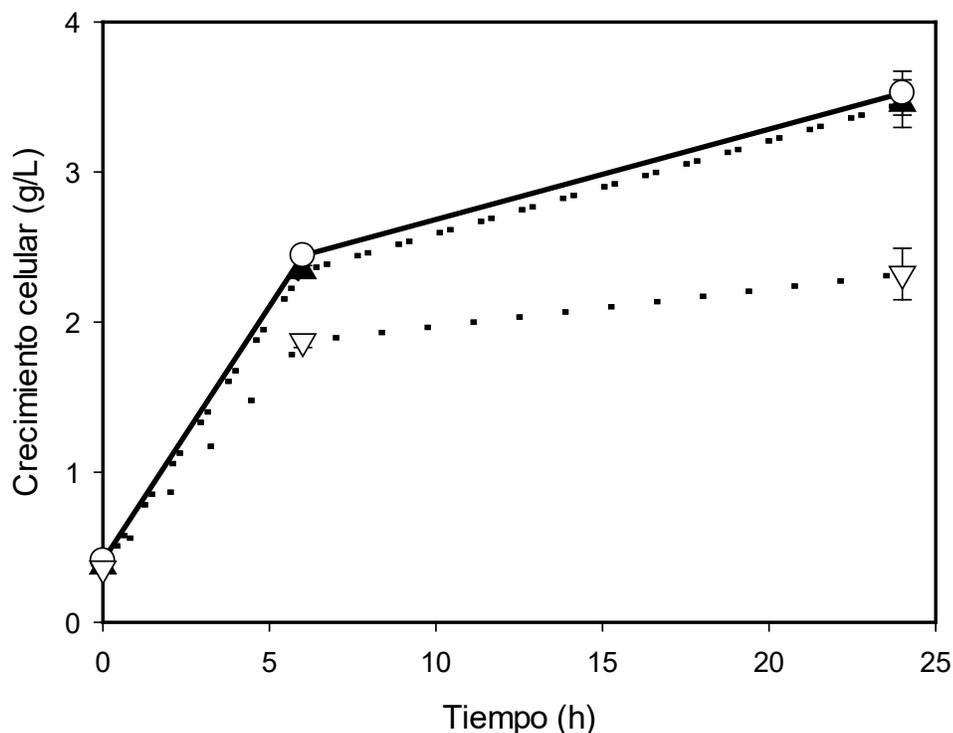


Figura 10. Cinética de crecimiento de *C. humicola* OJ-31 a partir de los medios mínimos Breus, Kulakovskaya y Basal, con 10 g/L de glucosa como fuente de carbono.

Claves: Breus (---▲---); Kulakovskaya (—○—); Basal (—▽—).

6.4 Localización de la actividad de β -glucosidasa de *C. humicola* OJ-31

En los experimentos anteriores se observó que *C. humicola* OJ-31 es capaz de crecer en celobiosa como única fuente de carbono. Para poder asimilar la celobiosa se requiere de la actividad de β -glucosidasa para obtener la glucosa libre. Por lo anterior se decidió evaluar dicha actividad en el crecimiento de *C. humicola* OJ-31 con y sin el sustrato de la enzima, medios YMC y YM, respectivamente. Se midió la actividad del sobrenadante del cultivo, el paquete celular y del extracto crudo

libre de células obtenido después de su rompimiento, con el propósito de localizar donde se encuentra principalmente la enzima y si ésta es de carácter inducible o constitutivo.

La actividad de β -glucosidasa de las células intactas en medio YM fue de 2.9 UI/g y en el medio YMC 9.0 UI/g, mientras que en el sobrenadante de ambas no se detectó actividad alguna (**Tabla 6**). Lo anterior indica que la actividad está asociada con la célula y demuestra que esta enzima no es exportada hacia el exterior de la misma. Además, con el propósito de determinar si la enzima se encuentra principalmente en el interior celular o anclada a la membrana, se realizó el rompimiento celular y se determinó la actividad β -glucosidasa. La actividad del extracto libre de células obtenido después del rompimiento celular corresponde a la presencia de esta enzima en el citoplasma. Se obtuvieron valores de 273.5 y 419.9 UI/g para el crecimiento en medio YM y YMC, respectivamente (**Tabla 6**). Estos valores obtenidos fueron 94 y 46 veces mayores a los obtenidos en las células sin romper de los medios YM y YMC, respectivamente. Esto indica que esta enzima se encuentra en el interior de la célula y para poder asimilar la celobiosa es necesario primeramente transportarla a su interior.

Tabla 6. Actividad de β -glucosidasa de *C. humicola* OJ-31

Medio	Actividad específica de β -glucosidasa (UI/g proteína)		
	Células intactas	Medio de Cultivo	Extracto crudo libre de células
YM	2.9 \pm 0.4	ND	273.5 \pm 4.5
YMC	9.0 \pm 0.2	ND	419.9 \pm 45.6

*ND: No detectado

Por otro lado, al comparar los resultados de actividad de β -glucosidasa en los extractos crudos libres de células, se observó que la actividad específica de β -glucosidasa en el medio YMC fue 53.53 % mayor en comparación con el medio YM, lo cual podría indicar una inducción de la enzima por parte de su sustrato celobiosa. No existen reportes para comparar la enzima β -glucosidasa o el consumo de celobiosa con *C. humicola*. Sin embargo, Rodríguez et al. (2007) reportaron un comportamiento similar con *Candida guilliermondii* y *Candida pulcherrima*, ya que obtuvieron 1.54 y 2.24 veces más actividad β -glucosidasa durante el crecimiento en celobiosa en comparación de glucosa, respectivamente. Cabe señalar que las actividades específicas obtenidas en los extractos libres de células de *C. humicola* creciendo en los medios YM y YMC son 19 y 82 %, mayores respectivamente en comparación con el valor reportado para *Aspergillus saccharolyticus* durante el crecimiento con bagazo de caña (230 UI/g proteína). *A. saccharolyticus* ha sido reportado como un hongo cuya actividad β -glucosidasa es altamente eficiente (Sørensen et al. 2014).

6.5 Producción de etanol a partir de celobiosa y xilosa con *C. humicola* OJ-31

De acuerdo a los resultados anteriores, la β -glucosidasa de *C. humicola* está asociada a las células y esta enzima no es exportada extracelularmente. Además, para llevar los azúcares al interior de las células de levaduras se ha reportado el uso

de los transportadores de celodextrinas para la celobiosa y los transportadores de hexosas para la xilosa (Galazka et al. 2010). Por lo que, en ausencia de glucosa, los transportadores de hexosas son usados casi exclusivamente para la xilosa. Para estudiar si *C. humicola* OJ-31 posee la capacidad de asimilar la xilosa haciendo uso de los cofactores producidos durante la fermentación de la glucosa proveniente de la celobiosa y sin la competencia por los transportadores entre glucosa y xilosa, se realizaron fermentaciones con la mezcla de celobiosa más xilosa a 10 g/L de cada azúcar durante 48 y 72 h.

Bajo las condiciones de estudio, a las 48 y 72 h de fermentación se consumió la celobiosa en su totalidad. El consumo de xilosa fue de 2.24 y 3 g/L con una producción de xilitol de 2.15 y 2.23 g/L en las 48 y 72 h, respectivamente (**Figura 11**). La producción de etanol de *C. humicola* OJ-31 fue de 5.90 y 5.31 g/L a las 48 y 72 h, respectivamente, ambas con rendimientos de 0.51. El consumo de azúcares y producción de etanol fue muy similar a las 48 y 72 h de fermentación, con productividades de etanol de 0.12 y 0.07 g/L·h, respectivamente. Por lo que con esta concentración de azúcares no es conveniente utilizar periodos de fermentación de 72 h, ya que disminuye la productividad.

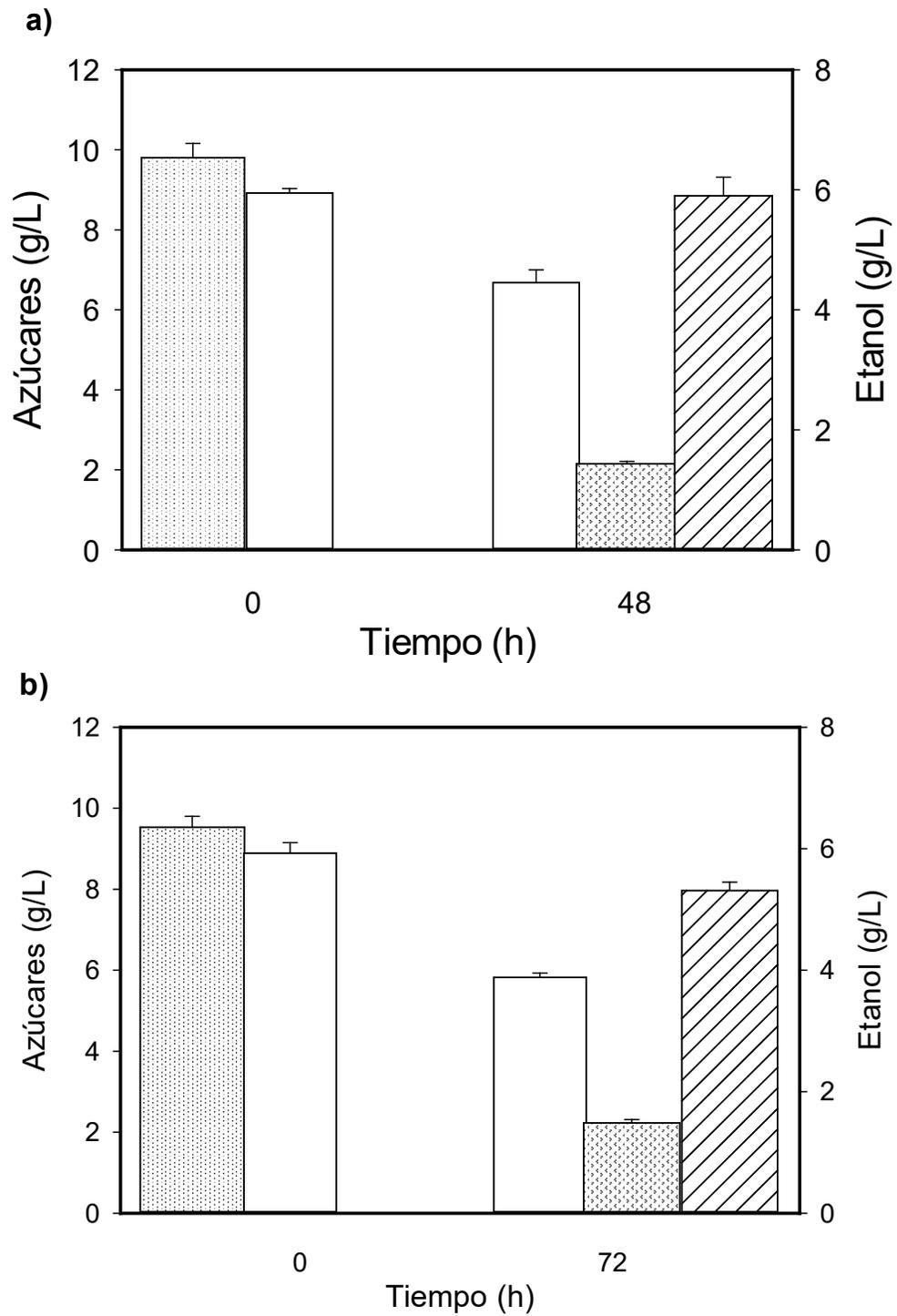


Figura 11. Consumo de sustrato, producción de etanol y xilitol a partir de celobiossa y xilosa en condiciones anaerobias, por *C. humicola* OJ-31: a) 48 y b) 72 h.

Claves: Celobiossa (▨); xilosa (□); xilitol (▩); etanol (▧).

C. humicola OJ-31 posee una buena capacidad de asimilar xilosa en condiciones aerobias, sin embargo, existen muchas limitaciones para su consumo en condiciones anaerobias. Aún en combinación de otros azúcares y al extender los tiempos de fermentación, no se observa una mejora en la capacidad de producir etanol. Es posible que esta limitación vaya más allá de una represión por sustrato, dado que el estancamiento de la ruta de la xilosa y la acumulación de su producto reducido el xilitol, no permiten llevar a la xilosa hasta el producto final, etanol (Liang et al. 2014).

Se han desarrollado diversas estrategias para mejorar la ruta metabólica de la xilosa con el propósito de incrementar la producción de etanol y reducir la producción de otros subproductos. El desbalance de cofactores rédox se debe a su pobre reciclaje en los pasos oxidoreductivos iniciales de la XR preferente de NADPH y la XDH estrictamente dependiente de NAD⁺ (Chu y Lee 2007; Matsushika et al. 2009a). El recambio de los nucleótidos NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺ es muy alto en comparación con sus concentraciones, por lo que el balance en sus velocidades de oxidación y reducción es un prerequisite para la continuación de las reacciones de anabolismo y catabolismo (Graef et al. 1999). Debido a esto, se han intentado diferentes técnicas de ingeniería de proteínas para alterar la preferencia de cofactores de la XR hacia NADH, en lugar de NADPH. En la mayoría de las células, la poza total de NADH/NAD⁺ es mayor que la de NADPH/NADP⁺, donde la concentración intracelular de la suma de NADH y NAD⁺ ha sido reportada de aproximadamente 1 mM (Koning y Dam 1992; Richard et al. 1993; Pollak et al. 2007). Durante el crecimiento aerobio, la reoxidación del NADH formado durante la glucólisis se da en la respiración mitocondrial. Mientras que bajo condiciones

anaerobias lo anterior no es posible, ya que la formación de etanol no cuenta para la reoxidación de NADH (Bakker et al. 2001). Por lo que cambiando la preferencia de la XR hacia NADH, se mejora el balance rédox al producir NAD⁺ y al darse la oxidación y reducción de este cofactor entre las primeras dos enzimas de la ruta. El control sobre el recambio de cofactores rédox en la manipulación de flujos metabólicos es un enfoque emergente y útil en la optimización de rendimientos de productos de interés en los procesos biotecnológicos con el uso de levaduras (Dussap y Poughon 2017). Sin embargo, esta modificación no siempre logra una eficiente producción de etanol a partir de xilosa, lo que indica que el desbalance de cofactores podría no ser la única limitación de la vía de la xilosa (Hou et al. 2007; Krahulec et al. 2010).

En estudios previos se ha reportado la necesidad de actividades altas de XR y XDH para una eficiente fermentación alcohólica de xilosa, lo cual se puede lograr al sobreexpresar los genes XYL1 y XYL2 que codifican para la XR y XDH, respectivamente (Karhumaa et al., 2006; Matsushika y Sawayama, 2008; Kim et al., 2012; Liang et al., 2014;). El incremento de estas actividades puede canalizar el metabolismo hacia la xilulosa y la continuación de la vía de una manera más eficiente y con un mayor flujo de carbono hacia etanol. De esta manera se puede mejorar el consumo de xilosa y reducir la producción de xilitol (Jeppsson et al. 2003b; Krahulec et al. 2010).

La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa es un regulador de la vía oxidativa de las pentosas fosfato (PPP), donde se produce la mayoría del NADPH utilizado en las reacciones celulares (Nogae y Johnston 1990). También se ha reportado un incremento de producción de etanol a partir de xilosa al sobreexpresar el gen ZWF1

que codifica para esta enzima, aumentando así la producción de NADPH, que a su vez satisface los requerimientos de la XR (Jeppsson et al. 2003a).

Otra estrategia es la sobreexpresión del gen de la xilulosa cinasa (XK), lo cual ha mostrado ayudar en la utilización de la xilosa (Karhumaa et al. 2005). La asimilación de xilulosa se ha mejorado sustancialmente al sobreexpresar los genes de las enzimas de la vía no oxidativa de PPP como la transaldolasa, transcetolasa, ribosa 5-fosfato cetol-isomerasa, ribulosa 5-fosfato epimerasa en cepas que expresan de manera natural los genes de XR, XDH y XK (Johansson y Hahn-Hägerdal 2002).

La afinidad de los transportadores de hexosas por la xilosa es de uno a dos órdenes de magnitud menores que la afinidad por la glucosa, lo cual resulta en la inhibición competitiva del transporte de xilosa al interior de la célula con la glucosa (Kotter y Ciriacy 1993). Por lo que otra estrategia es la introducción de transportadores de xilosa para reducir la inhibición por glucosa. A pesar de que con estas estrategias se ha reportado cierta mejoría en la fermentación alcohólica de xilosa no se ha logrado igualar el desempeño de la fermentación de glucosa, por lo que la ruta de la xilosa continúa siendo un cuello de botella que necesita ser estudiado para obtener mejores producciones de etanol a partir de este azúcar (Liang et al. 2014; Zha et al. 2014).

6.6 Producción de etanol a diferentes concentraciones de celobiosa con *C. humicola* OJ-31

Se sometió a *C. humicola* OJ-31 a una fermentación en lote de 48 h con medio mínimo Breus y diferentes concentraciones de celobiosa como única fuente de

carbono, con el propósito de determinar su capacidad de tolerar y producir etanol a diferentes concentraciones de este azúcar. Al utilizar 10 g/L de celobiosa se tiene un consumo del 100 % de este azúcar con un rendimiento de 0.51 g etanol/g celobiosa consumida, que corresponde al máximo teórico aproximadamente. A las concentraciones de 20 y 30 g/L de celobiosa, en ambos casos se tiene un consumo cercano al 80 % con una producción de etanol de 7.33 y 12.09 g/L, respectivamente y ambos con rendimientos de 0.51 g/g (**Figura 12**).

Al aumentar la concentración de celobiosa a 40 y 60 g/L se presentó una drástica disminución en la producción de etanol con valores de 6.76 y 4.13 g/L y en el consumo del azúcar 34.40 y 17.95 %, respectivamente (**Figura 12**). Esto sugiere que el metabolismo de consumo de celobiosa para la producción de etanol de *C. humicola* OJ-31, podría estar inhibido por la concentración del sustrato o por la acumulación del producto.

Se ha observado que altas concentraciones de azúcares en el medio de cultivo, pueden generar un estrés osmótico en las células, lo que conlleva a una disminución de la viabilidad, crecimiento y desempeño fermentativo de las células (D'Amore 1992; Briggs et al. 2004). El estrés osmótico puede definirse como cualquier situación donde exista un desbalance suficiente entre la osmolaridad intracelular y extracelular que cause un cambio que deteriore la fisiología de la célula (Csonka y Hanson 1991), caracterizado por la pérdida de agua y siguiente turgor (Blomberg y Adler 1992; Wood 1999; Klipp et al. 2005). En el presente trabajo, no se midió la tonicidad del medio, pero las concentraciones altas de celobiosa pudieron generar un estrés osmótico en las levaduras lo que pudo haber afectado su viabilidad o su metabolismo influyendo en la disminución de la capacidad de producir etanol.

Por otro lado, podría también pensarse en la inhibición por altas concentraciones de celobiosa del sistema de transporte facilitado de glucosa y protones por medio del cual la celobiosa es transportada al interior de la célula (Spencer-Martins y Van Uden 1986).

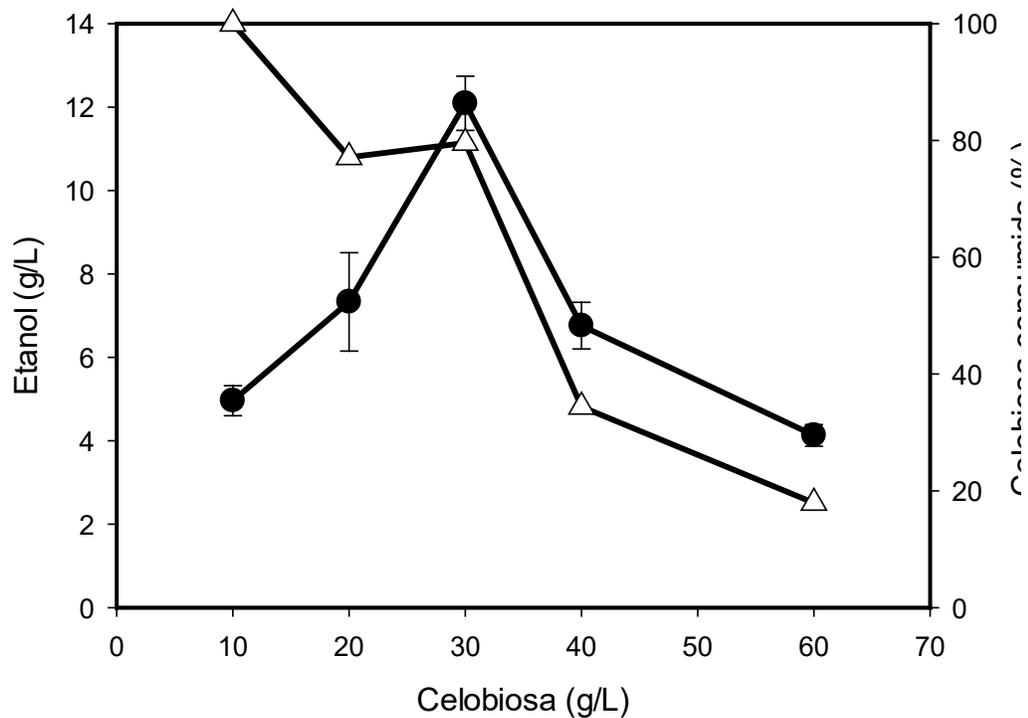


Figura 12. Producción de etanol y consumo de celobiosa a diferentes concentraciones de sustrato en fermentación en lote con *C. humicola* OJ-31.

Claves: Celobiosa consumida (—△—); etanol (—●—).

6.7 Mutagénesis y selección de mutantes de *C. humicola* OJ-31 productoras de etanol a partir de xilosa

Las levaduras que utilizan la xilosa eficientemente en medios definidos, usualmente presentan un pobre desempeño con los sacarificados de biomasa lignocelulósica. Uno de los problemas principales es la presencia de hexosas (glucosa) que compiten o inhiben la utilización de la xilosa (Bicho et al., 1988; Panchal et al., 1988). Las levaduras fermentadoras de xilosa pueden convertir la glucosa o la xilosa a etanol de manera individual. Sin embargo, la fermentación de xilosa en mezcla con glucosa no se da de manera eficiente debido a que la fermentación de la glucosa precede a la de la xilosa y las levaduras no son lo suficientemente tolerantes al etanol para completar el segundo proceso (Harner et al. 2015). Por lo que el mejoramiento en la asimilación y fermentación de xilosa en presencia de glucosa, sin la inhibición por glucosa es atractivo para la fermentación simultánea de la mezcla de azúcares de los sacarificados lignocelulósicos, mejorando los rendimientos y disminuyendo los tiempos de fermentación.

Con el propósito de obtener mutantes que tengan la capacidad de producir etanol a partir de xilosa y glucosa de manera simultánea al resistir represión por glucosa, se sometió a *C. humicola* OJ-31 a mutagénesis y recuperación como se describió anteriormente. Se aislaron 214 mutantes en medio YMX (**Figura 13**) y como primer paso de selección, se resembraron todas las colonias en placas Petri con medio YMX + 0.5 % de 2-desoxiglucosa (2-DG) y se incubaron durante 24 horas. Dado que la 2-DG es un análogo no metabolizable de la glucosa, las células que logren crecer en sustratos como las pentosas y en presencia de este análogo, potencialmente podrían ser mutantes candidatas resistentes a represión por glucosa (Sreenath y Jeffries 1999). El crecimiento de la mayoría de las colonias fue afectado por la 2-DG. Por lo que, sólo 38 colonias del total de 214 presentaron la capacidad

de crecer bajo estas condiciones. De las cuales, se seleccionaron las 10 mutantes que presentaron el mayor crecimiento, con los diámetros de colonias mayores.

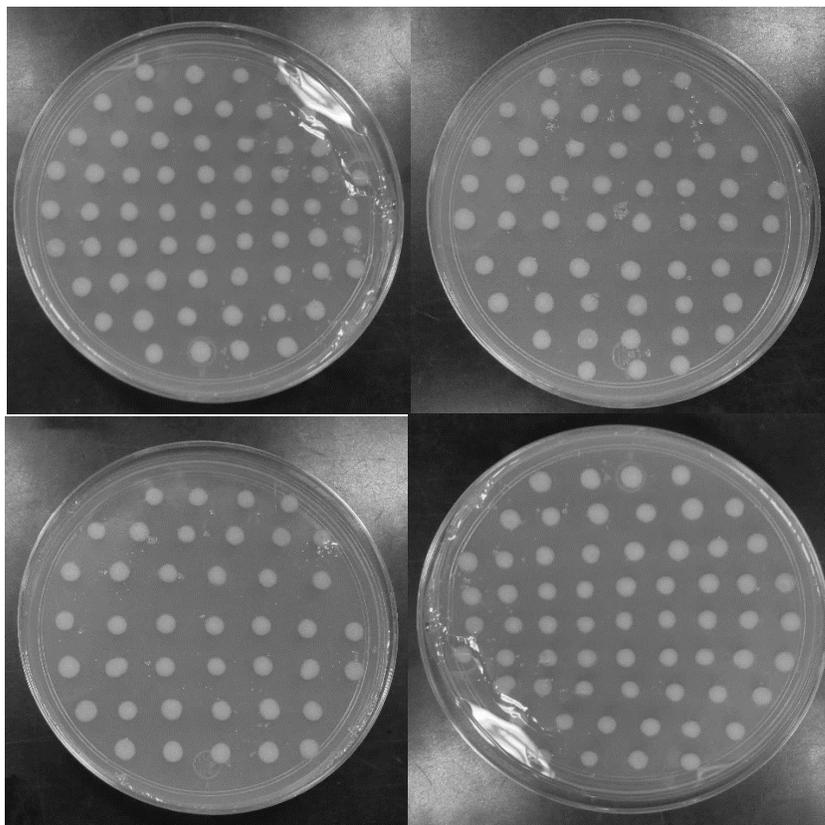


Figura 13. Aislamiento de mutantes de *C. humicola* OJ-31 en medio YMX.

Las 10 colonias seleccionadas y la mutante control OJ-31, se incubaron en medio líquido YMX con 2-DG 0.5 % para corroborar su capacidad de utilizar xilosa y tolerar la presencia del análogo. En esta segunda prueba se seleccionaron 7 mutantes que presentaron un mayor crecimiento (1, 3, 5, 6, 7, 9 y 10) aunque sólo las mutantes 3 y 10 superaron a la cepa madre OJ-31 (**Figura 14**). Estas mutantes, así como la cepa control *C. humicola* OJ-31 se llevaron a una fermentación en lote

de 48 h en frascos serológicos de 10 mL con medio YMX, como se describió anteriormente. Al final de la fermentación, sólo las mutantes OJ-31 y 5 presentaron producción de etanol a partir de xilosa, con valores de 1.63 y 1.61 g/L, respectivamente (**Tabla 7**).

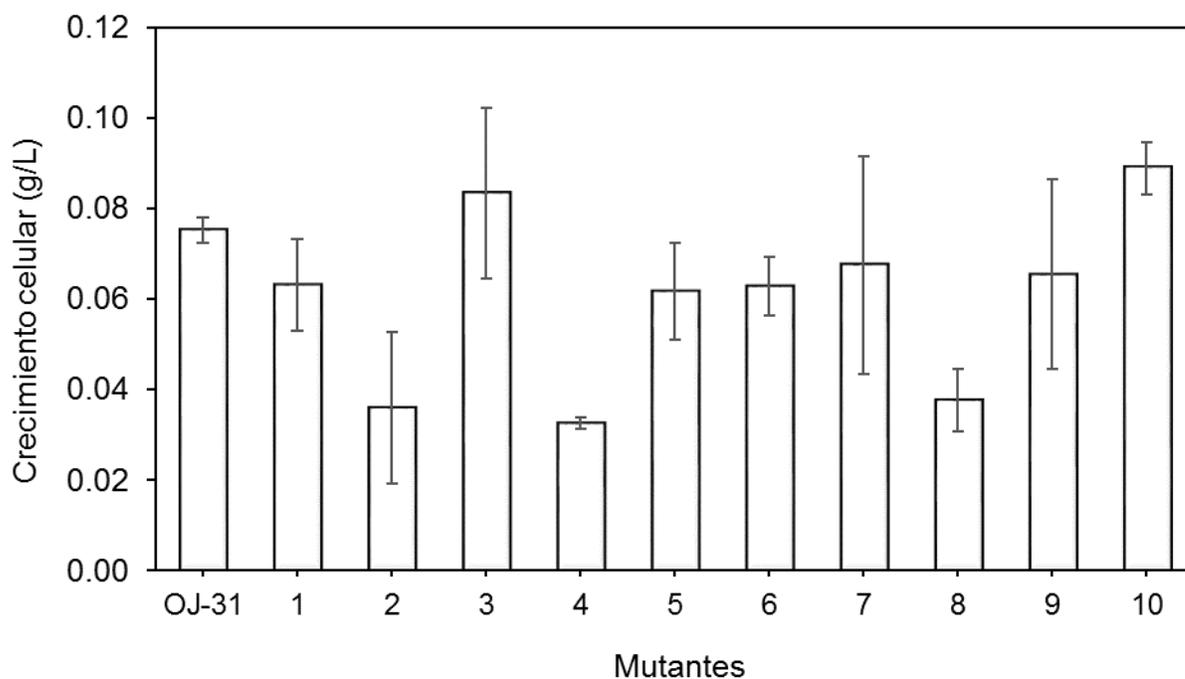


Figura 14. Crecimiento aerobio de *C. humicola* OJ-31 y sus mutantes en medio YMX + 0.5 % 2-DG

Con el propósito de corroborar la capacidad de producción de las mutantes *C. humicola* OJ-31 y 5, se realizó otra etapa de fermentación de 48 h en frascos serológicos de 10 mL con medio Breus-xilosa. Se eligió el medio mínimo Breus para descartar que el etanol obtenido se hubiera producido a partir de los azúcares presentes en el medio YM. Sin embargo, al final de la fermentación en medio Breus-xilosa no se detectó producción de etanol con ninguna de las mutantes de *C.*

humicola, OJ-31 y 5. Por lo que no se obtuvo una mutante que pudiera producir etanol a partir de xilosa y se descartó continuar trabajando con la producción de etanol usando xilosa como fuente de carbono.

Tabla 7. Fermentación en medio YMX con *C. humicola* OJ-31 y sus mutantes por 48 h.

Mutante	Etanol (g/L)
OJ-31	1.63 ± 0.071
1	ND
3	ND
5	1.61 ± 0.006
6	ND
7	ND
9	ND
10	ND

*ND: No detectado

6.8 Mutagénesis y selección de mutantes de *C. humicola* OJ-31 productoras de etanol a partir de celobiosa

La capacidad de producir etanol a partir de celobiosa por *C. humicola* OJ-31 se ve limitada al utilizar concentraciones elevadas de celobiosa. Debido a lo anterior, se sometió a *C. humicola* OJ-31 a otra etapa de mutagénesis con el agente NTG con el propósito de obtener nuevas mutantes que presenten una mejor capacidad de producción de etanol a partir de altas concentraciones de celobiosa.

Se realizó la mutagénesis como se describió anteriormente y posteriormente se sometió al cultivo mutagenizado a tres etapas de fermentación de 24 h consecutivas con celobiosa como única fuente de carbono para promover la supervivencia de las que asimilen o toleren mejor la celobiosa. Posteriormente se

llevó a cabo otra etapa de fermentación de 15 h, donde se estimó la capacidad fermentativa por la producción de CO₂. Se eligió la producción de CO₂ por ser una medición rápida e indirecta de la fermentación de glucosa.

La producción de CO₂ entre las mutantes fue muy variable, ésta se encontró en un intervalo de 0.25 a 4.25 mL, siendo QN-5 la de mayor producción (4.25 mL), seguida de QN-1 (2.26 mL) (**Tabla 8**). Se analizaron los valores de producción de CO₂ y se realizó un análisis de varianza con la prueba de Tuckey y una diferencia significativa de $P < 0.005$, con la capacidad de producción de CO₂ como variable de respuesta. Todas las mutantes fueron significativamente diferentes entre ellas ($P < 0.001$) y se seleccionó a la mutante QN-5 para continuar con la selección, ya que de todas las mutantes obtenidas fue la que produjo una mayor cantidad de CO₂, 4.52 mL a partir de 40 g/L de celobiosa (**Tabla 8**).

Para continuar con la selección, se eligió al cultivo QN-5 para otra etapa de fermentación de celobiosa, a una concentración de 40 g/L durante 24 h. Lo anterior se realizó con el propósito de seleccionar a las mutantes que presentaran una mejor producción de etanol a partir de celobiosa. El cultivo QN-5 se dividió en 6 frascos serológicos con medio Breus-celobiosa a 40 g/L y se utilizó a la cepa madre *C. humicola* OJ-31 como control. Se midió el consumo de azúcares reductores y, la producción de etanol como parámetro de selección. En promedio todas las mutantes consumieron cerca del 30 % de la celobiosa y la producción de etanol fue cercana al rendimiento máximo por sustrato consumido. Algunos rendimientos fueron mayores al máximo teórico, lo cual puede deberse a la desviación estándar de cada uno (**Tabla 10**).

Tabla 8. Estimación de la capacidad fermentativa por producción de CO₂ de las mutantes *C. humicola* OJ-31 en la primera etapa de selección por fermentación de celobiosa.

Mutantes	Celobiosa inicial (g/L)	Producción de CO₂ (mL)
QN-1	20	2.26
QN-2	20	0.25
QN-3	20	0.50
QN-4	40	0.75
QN-5	40	4.52
QN-6	40	0.25

Las mutantes de *C. humicola* que produjeron más etanol en comparación con la cepa madre OJ-31 (5.91 g/L) fueron QN-52, QN-55 y QN-56 con una producción mayor de 12.35, 5.08 y 0.68 %, respectivamente (**Tabla 9**). Los valores de producción de etanol de las 6 mutantes (**Tabla 9**) se sometieron a un análisis de varianza con la prueba de Dunnet, tomando el valor de *C. humicola* OJ-31 como control. Se observó una diferencia significativa (P=0.009) en la producción de etanol entre las diferentes mutantes de QN-5 con respecto a OJ-31. Finalmente, se eligió a QN-52 para continuar con las pruebas de fermentación, ya que de todas las mutantes probadas fue la que produjo más etanol (**Tabla 9**).

Tabla 9. Determinación de las capacidades fermentativas de las mutantes de *C. humicola* OJ-31 durante la segunda etapa de selección por producción de etanol a partir de celobiosa.

Mutante	Celobiosa 0 h (g/L)	Celobiosa 24 h (g/L)	Etanol (g/L)	Yp/x
QN 51	37.93 ± 0.00	26.58 ± 0.86	4.93 ± 0.09	0.43
QN 52	39.83 ± 0.81	28.69 ± 0.28	6.64 ± 0.07	0.60
QN 53	39.51 ± 0.50	29.30 ± 0.28	5.88 ± 0.06	0.58
QN 54	36.76 ± 0.46	28.27 ± 0.61	5.25 ± 0.16	0.62
QN 55	40.69 ± 0.57	30.17 ± 0.81	6.21 ± 0.02	0.59
QN 56	39.93 ± 0.55	27.60 ± 0.34	5.95 ± 0.08	0.48
OJ-31	38.92 ± 1.15	25.31 ± 0.74	5.91 ± 0.15	0.43

6.9 Determinación de la capacidad fermentativa de las mutantes de *C. humicola* OJ-31 y QN-52

6.9.1 Producción de etanol a partir de diferentes concentraciones de celobiosa con *C. humicola* OJ-31 y QN-52

Con la finalidad de comparar las diferencias en la capacidad de producción de etanol a partir de celobiosa entre la mutante obtenida *C. humicola* QN-52 con su cepa madre OJ-31, se realizaron fermentaciones en lote con celobiosa a 30 y 40 g/L durante 48 y 72 h. Al utilizar 30 g/L de celobiosa inicial, y a las 48 h de cultivo ambas mutantes produjeron aproximadamente 12 g/L de etanol, con una productividad de

0.25 g/L·h, y rendimientos de 0.51 y 0.45 g/g para OJ-31 y QN-52, respectivamente (**Figura 15, Tabla 10**). Al extender la fermentación a 72 h, las producciones de etanol fueron de 13.91 y 14.10 g/L con rendimientos de 0.46 y 0.4 g/g y productividad de 0.20 y 0.19 g/L·h para OJ-31 y QN-52, respectivamente. Al utilizar 30 g/L de celobiosa, la producción de etanol y consumo del azúcar fue muy similar entre las dos mutantes.

Al incrementar la celobiosa a 40 g/L y a las 48 h de fermentación, *C. humicola* OJ-31 consumió el 34.40 % de la celobiosa, mientras que QN-52 consumió 59.67 %. La producción de etanol fue de 6.76 y 12.73 g/L con rendimientos de 0.52 y 0.51 g/g para *C. humicola* OJ-31 y QN-52, respectivamente. La productividad en ese punto fue muy diferente para OJ-31 y QN-52, con valores de 0.14 y 0.27 g/L·h, respectivamente. Al extender la fermentación a 72 h, la mutante OJ-31 consumió el 62 % de la celobiosa con una producción de 12.60 g/L de etanol, productividad de 0.18 g/L·h y un rendimiento de 0.52 g/g. Mientras que QN-52 consumió el 74 % del azúcar y produjo 14.44 g/L de etanol con una productividad de 0.20 g/L·h y rendimiento de 0.51 g/g (**Figura 16, Tabla 10**).

Al utilizar 40 g/L de celobiosa, la producción de etanol de QN-52 fue 88 % mayor que la de OJ-31 a las 48 h de fermentación, mientras que la productividad de QN-52 superó 1.93 veces a la de OJ-31 (**Figura 16, Tabla 10**). Extendiendo la fermentación hasta 72 h, la producción de etanol de OJ-31 aumenta casi el doble en comparación con las 48 h y bajo estas condiciones QN-52 produce 13 % más etanol que OJ-31. De todo lo anterior se encontró que *C. humicola* QN-52 superó la capacidad de producir etanol al utilizar una concentración inicial de celobiosa de 40 g/L.

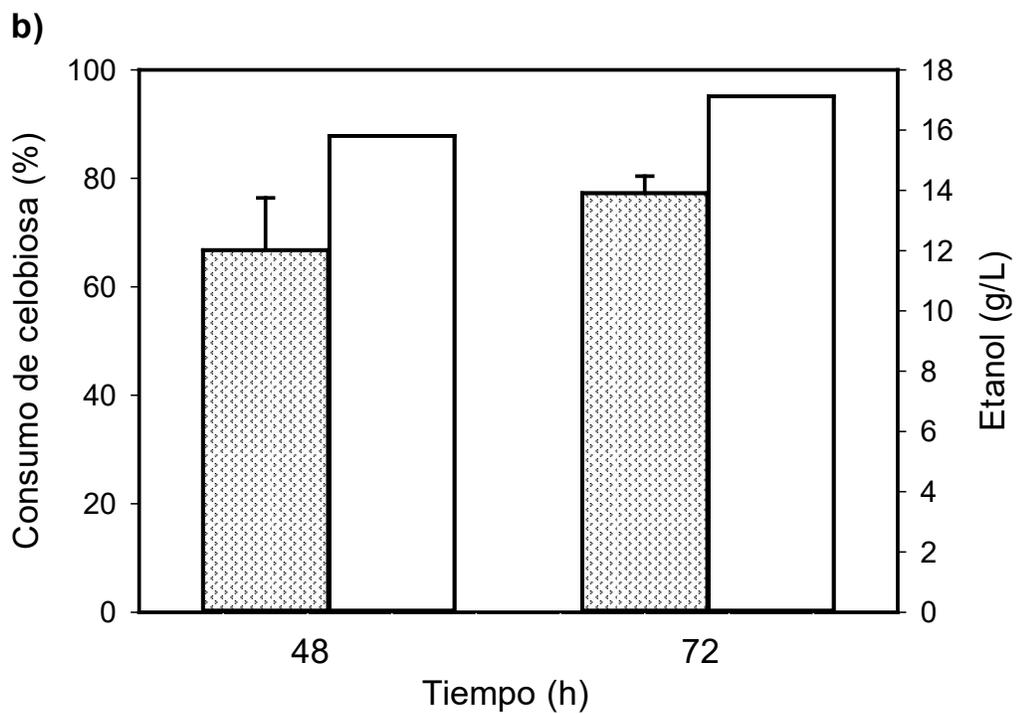
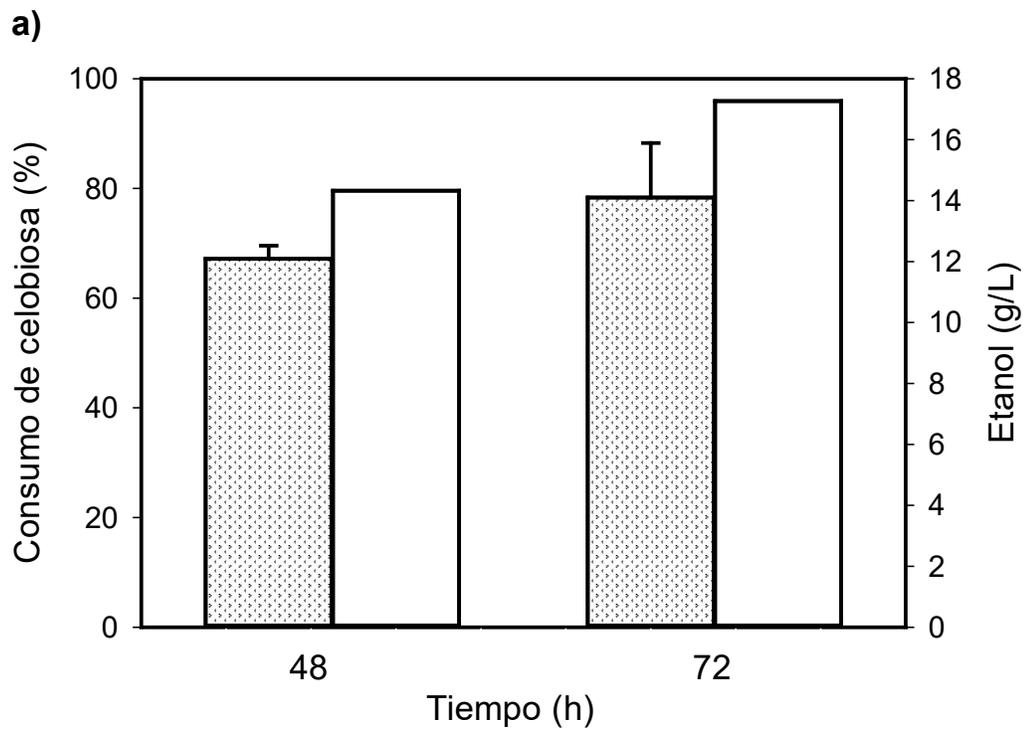


Figura 15. Producción de etanol y consumo de sustrato por *C. humicola* en fermentación en lote en medio Breus con 30 g/L de celobiosa durante 48 y 72 h: a) OJ-31; b) QN-52.

Claves: Celobiosa consumida (□); etanol (▨).

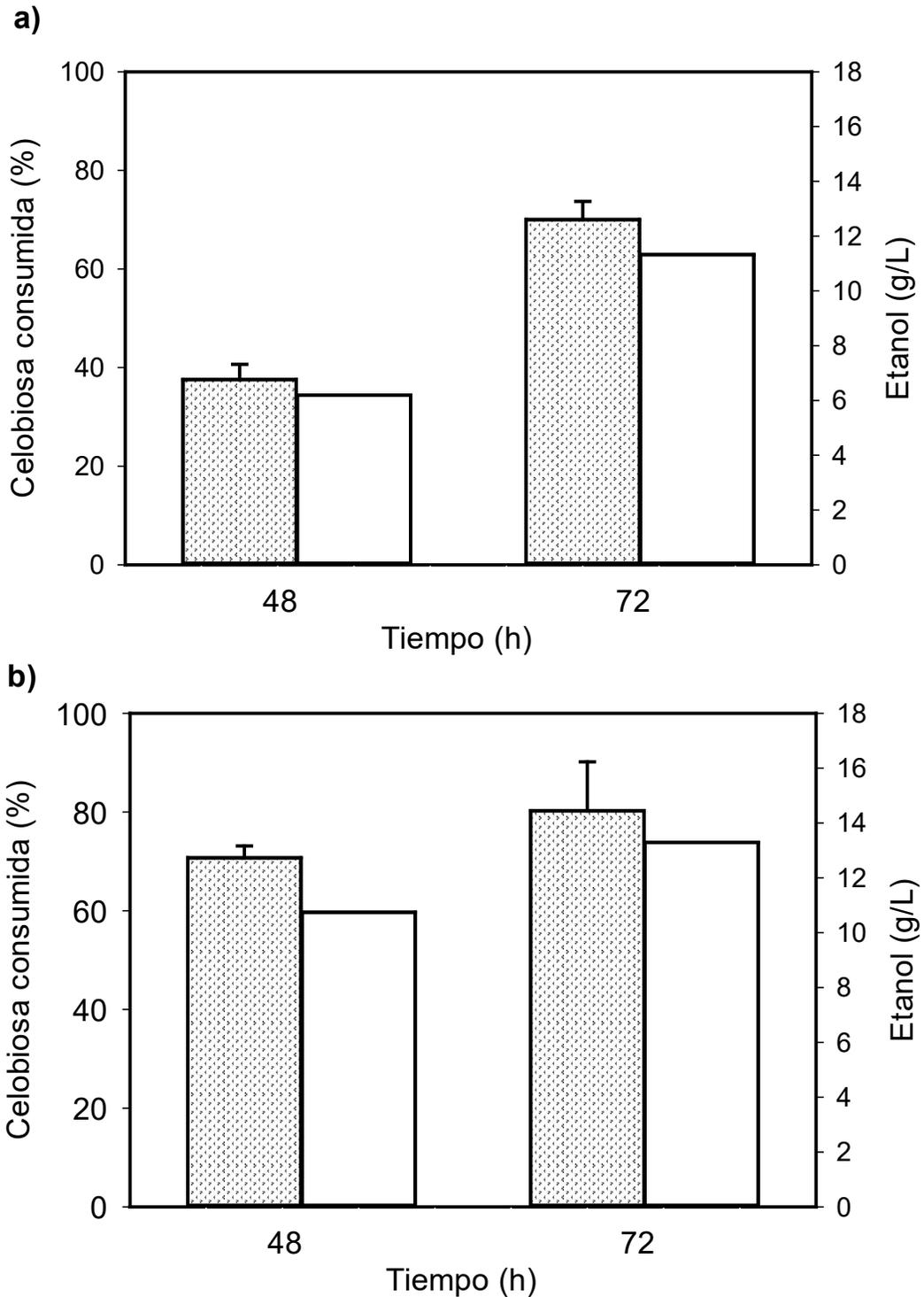


Figura 16. Producción de etanol y consumo de sustrato por *C. humicola* en fermentación en lote en medio Breus con 40 g/L de celobiossa durante 48 y 72 h: a) OJ-31; b) QN-52.

Claves: Celobiossa consumida (□); etanol (▨)

Tabla 10. Comparación de la capacidad de producción de etanol de las mutantes de *C. humicola* OJ-31 y QN-52 en medio Breus con diferentes concentraciones de celobiosa y tiempos de fermentación.

Mutante	Tiempo (h)	Celobiosa inicial (g/L)	Celobiosa final (g/L)	Celobiosa consumida (%)	Etanol (g/L)	Yp/s (g etanol/ g celobios consumida)	Productividad (g/L·h)
OJ-31	48	29.60 ± 1.10	6.05 ± 0.81	79.57 ± 2.73	12.09 ± 0.65	0.51	0.25
	72	29.69 ± 0.66	1.33 ± 0.18	95.53 ± 5.60	14.10 ± 0.41	0.46	0.20
	48	38.72 ± 1.51	25.4 ± 2.2	34.40 ± 5.68	6.76 ± 0.56	0.51	0.14
	72	38.48 ± 2.90	14.28 ± 0.94	62.90 ± 2.44	12.60 ± 0.67	0.52	0.18
QN-52	48	30.34 ± 0.75	3.7 ± 0.06	87.82 ± 5.23	12.02 ± 1.73	0.45	0.25
	72	29.94 ± 0.7	1.43 ± 0.53	95.11 ± 1.76	13.91 ± 0.56	0.49	0.19
	48	41.25 ± 0.64	16.64 ± 1.87	59.67 ± 4.53	12.73 ± 0.43	0.52	0.27
	72	38.36 ± 0.84	10.04 ± 0.5	73.83 ± 1.31	14.44 ± 1.79	0.51	0.20

Se realizó un análisis de varianza de tres niveles por prueba de Tuckey con ($P < 0.05$) sobre los valores de la **Tabla 10**, con el propósito de determinar si existen diferencias estadísticamente significativas en la capacidad de producción de etanol de las dos mutantes de *C. humicola*, QN-52 y OJ-31. Las variables independientes probadas fueron las mutantes, la concentración inicial de celobiosa y el tiempo de fermentación, con la producción de etanol como variable de respuesta. Con la prueba de Shapiro-Wilk se observó que los valores utilizados en el análisis de varianza presentaron una distribución normal ($P = 0.402$). Además, con este análisis se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la capacidad de producción de etanol de las mutantes de *C. humicola*, OJ-31 y QN-52 ($P < 0.001$).

Evaluando de manera individual los valores de etanol obtenidos en la fermentación de 30 g/L de celobiosa con las diferentes mutantes, la producción fue muy similar entre *C. humicola* OJ-31 y QN-52, por lo que no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($P = 0.754$). Mientras que en la fermentación de 40 g/L de celobiosa si se encontró una diferencia significativa entre la producción de etanol de las diferentes mutantes en ambos tiempos de fermentación, 48 h ($P < 0.001$) y 72 h ($P = 0.009$). Dado que la producción de este alcohol a las 48 y 72 h fue significativamente mayor con *C. humicola* QN-52, dándole ventaja en la producción de etanol con esta levadura en comparación con su cepa madre OJ-31.

6.9.2 Determinación de la actividad de β -glucosidasa de *C. humicola* OJ-31 y QN-52 en la fermentación de celobiosa a diferentes concentraciones

En el experimento de localización de la β -glucosidasa de *C. humicola* OJ-31, se observó una mayor actividad en el extracto crudo libre de células del medio con celobiosa en comparación con glucosa (**Tabla 6**). Esto podría significar que la celobiosa posee un efecto inductivo sobre la actividad de la β -glucosidasa. Además, teniendo en cuenta que en la fermentación de 40 g/L de celobiosa con las mutantes *C. humicola* OJ-31 y QN-52, no se tuvo un consumo completo de este azúcar, la β -glucosidasa podría limitar el proceso (**Tabla 10**). Por lo que se buscó estudiar el comportamiento de la β -glucosidasa en condiciones de fermentación a diferentes concentraciones de celobiosa. Se comparó la evolución de la actividad β -glucosidasa en la fermentación en lote al final de la fermentación en relación con su valor inicial. Esto tuvo el propósito de relacionar el efecto de la concentración de celobiosa sobre la actividad de la enzima y las capacidades fermentativas de las mutantes OJ-31 y QN-52 de *C. humicola*.

Dado que se partió de un mismo inóculo para cada cepa de *C. humicola*, la actividad de β -glucosidasa inicial de cada mutante fue la misma entre las diferentes condiciones, con valores de 1678.82 y 1588.15 UI/g proteína para OJ-31 y QN-52, respectivamente. Se buscó observar el comportamiento de la actividad al final de las 48 h de fermentación en relación de las diferentes concentraciones de celobiosa. El cambio de la actividad entre las 0 y las 48 h de fermentación con respecto a la concentración de celobiosa utilizada para su crecimiento en las mutantes de *C. humicola*, OJ-31 y QN-52 se muestra en la **Figura 17**.

En la fermentación de 10 g/L de celobiosa, la actividad β -glucosidasa del extracto libre de células de *C. humicola* OJ-31 no presentó un cambio considerable, ya que se mantuvo casi igual a su valor inicial. Mientras que la actividad de QN-52 bajo las mismas condiciones aumentó 19.55 %, este incremento podría indicar que la actividad de esta enzima se vio favorecida por una concentración de celobiosa de 10 g/L (**Figura 17**). Al utilizar 20 g/L de celobiosa, el aumento de la actividad β -glucosidasa de ambas mutantes de *C. humicola* con respecto a su valor inicial fue muy similar entre sí. Sin embargo, la actividad de *C. humicola* OJ-31 aumentó 14.11 % con respecto a su valor inicial y en comparación con la fermentación de 10 g/L de celobiosa. Mientras que la actividad de β -glucosidasa en *C. humicola* QN-52 sólo aumentó 15.34 % respecto a su valor inicial y 4.21 % menos que el valor mostrado en la fermentación de 10 g/L de celobiosa (**Figura 17**).

En la fermentación de 30 g/L de celobiosa, se observó como la concentración del azúcar afectó de manera negativa la actividad β -glucosidasa de ambas mutantes de *C. humicola*. La actividad de *C. humicola* OJ-31 disminuyó 29.33 % con respecto al valor inicial. Mientras que en QN-52 la disminución fue de 7.41 % con respecto a las 0 h (**Figura 17**). Estos resultados sugieren que la actividad de la β -glucosidasa sufre inhibición por sustrato a una concentración de 30 g/L, siendo el efecto sobre *C. humicola* OJ-31 casi cuatro veces mayor que en el caso de QN-52. La actividad de β -glucosidasa de las mutantes de *C. humicola* disminuyó aún más en la fermentación de 40 g/L de celobiosa, 33.68 % (565.4 UI/g) y 18.34 % (291.2 UI/g) para OJ-31 y QN-52, respectivamente (**Figura 17**).

Estos resultados sugieren que la actividad de β -glucosidasa se ve favorecida por la presencia de su sustrato, pero a concentraciones por debajo de 20 g/L.

Concentraciones mayores como 30 y 40 g/L tienen un efecto negativo sobre la actividad inicial que podría relacionarse con inhibición por sustrato. Lo anterior tiene relación con lo observado previamente, donde no se obtuvo un consumo completo de celobiosa resultando en una ineficiente producción de etanol (**Tabla 10**).

Al comparar el comportamiento de la β -glucosidasa entre las cepas de *C. humicola*, se observó que la actividad de *C. humicola* QN-52 siempre fue mayor en comparación con OJ-31. En la fermentación de 10 g/L, sólo *C. humicola* QN-52 presentó un incremento en la actividad β -glucosidasa. Con 20 g/L de celobiosa el incremento de la actividad de QN-52 fue más alto que el de OJ-31. Mientras que en la fermentación de 30 y 40 g/L de celobiosa, la disminución de la actividad de QN-52 fue menor en comparación con OJ-31. Por lo que la mutante *C. humicola* QN-52 obtenida en este trabajo, presentó una mayor producción y actividad de la enzima β -glucosidasa bajo las condiciones probadas en comparación con su cepa madre OJ-31.

Resultados semejantes a los observados en el presente trabajo han sido reportados por diversos autores. Skory et al. (1996) purificaron y caracterizaron una β -glucosidasa intracelular de la levadura fermentadora de celobiosa, *Candida wickerhamii*. Midieron su actividad durante el crecimiento en medio YPM y 20 g/L de diferentes fuentes de carbono a 28 °C, durante 24 h. Encontraron que la producción de la enzima se estimulaba más con celobiosa como fuente de carbono en comparación con glucosa. La actividad de los extractos libres de células obtenidos en el crecimiento con celobiosa y glucosa fueron de 13700 y 660 UI/g proteína, respectivamente.

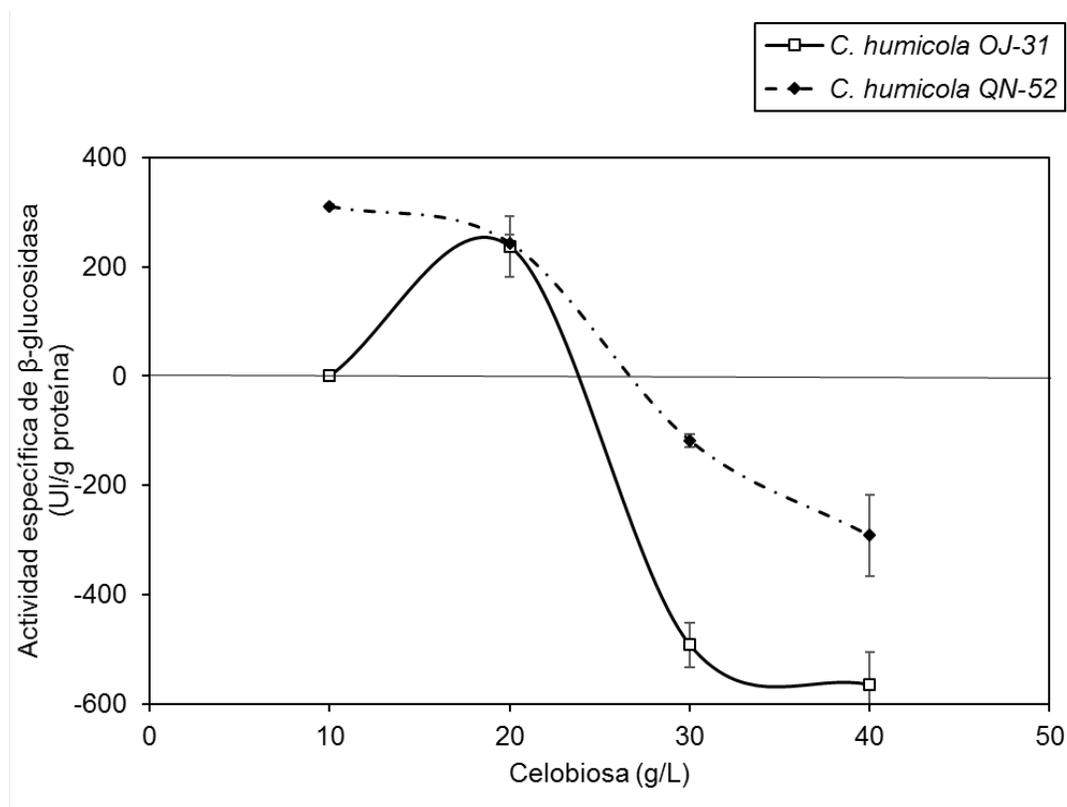


Figura 17. Comportamiento de la actividad de β -glucosidasa de *C. humicola* OJ-31 y QN-52 al final de la fermentación de diferentes concentraciones de celobiosa en medio Breus.

6.9.3 Producción de etanol a partir de celobiosa en cultivo en lote alimentado con *C. humicola* OJ-31 y QN-52

Se observó que concentraciones de celobiosa mayores a 30 g/L tienen un efecto negativo en la actividad de β -glucosidasa y la producción de etanol de *C. humicola* OJ-31 y QN-52. Por lo anterior se decidió realizar una fermentación en lote alimentado con cada mutante de *C. humicola* manteniendo la concentración de celobiosa en 10 g/L, y determinar si la concentración de este azúcar es un factor

limitante en la capacidad de producción de etanol de ambas cepas, *C. humicola* OJ-31 y QN-52.

La duración de la fermentación en cultivo por lote alimentado fue de 64 h, añadiendo pulsos de celobiosa cada 16 h para mantener su concentración en aproximadamente 10 g/L. Durante las primeras 48 h de fermentación se observó un incremento secuencial en la producción de etanol alcanzando el punto máximo con 11.55 y 11.77 g/L y rendimientos de 0.50 y 0.51 g/g, para *C. humicola* OJ-31 y QN-52, respectivamente. A este tiempo se añadió el último pulso de celobiosa y se dejó la fermentación por 16 h más. A las 64 h, la concentración de etanol de *C. humicola* OJ-31 fue 38 % menor que la de QN-52 con valores de 7.60 y 10.49 g/L, respectivamente. Contrario a lo esperado, la concentración de etanol en el medio disminuyó 34 % para OJ-31 y 11 % para QN-52 con respecto al valor obtenido a las 48 h (**Figura 18**).

El consumo de celobiosa y la producción de etanol de *C. humicola* OJ-31 y QN-52 fue muy similar durante las primeras 48 h de fermentación. A partir de las 32 h, las dos mutantes dejaron de consumir el total de celobiosa alimentada y comenzó a observarse una acumulación de sustrato. Al final de la fermentación, *C. humicola* OJ-31 y QN-52 presentaron velocidades de acumulación de celobiosa de 0.07 y 0.06 g/L·h, respectivamente.

Durante todo el cultivo por lote alimentado se mantuvo la concentración de celobiosa en valores menores a 10 g/L, por lo que se podría considerar que este azúcar no es el factor limitante de la fermentación en lote por las mutantes de *C. humicola*, OJ-31 y QN-52. Así mismo, se observó que las mutantes presentaron limitaciones en el consumo del azúcar, ya que hubo celobiosa residual en el medio, a

diferencia de lo ocurrido en cultivo por lote a la concentración de celobiosa de 10 g/L. De acuerdo a lo anterior, la pobre producción de etanol y el bajo consumo de la celobiosa, podría deberse a que este alcohol tiene un efecto negativo sobre la capacidad fermentativa y la actividad de β -glucosidasa de *C. humicola*.

Skory et al. (1996) purificaron y caracterizaron una β -glucosidasa de *Candida wickerhamii* y midieron su actividad en la presencia de diferentes alcoholes. En el caso del etanol, reportaron una disminución en la actividad β -glucosidasa de 10-40 % al exponer la enzima a 9.21-69.1 g/L de etanol. De igual manera, Barbagallo et al. (2004) reportaron una disminución del 50 % de la actividad β -glucosidasa de *Aspergillus niger* por la presencia de etanol a una concentración de aproximadamente 10 g/L. Aparte del efecto del etanol sobre la β -glucosidasa, este alcohol podría estar relacionado con otros factores que conllevan a una reducción del proceso de fermentación. Como son incremento en la permeabilidad de la membrana, reducción de la fuerza motriz de protones, reducción del pH intracelular, inhibición de la glucólisis y disminución de la actividad de algunas enzimas (Piper 1995).

Dado que la β -glucosidasa de *C. humicola* OJ-31 y QN-52 hidroliza la celobiosa en el interior de la célula, se podría considerar a la acumulación de glucosa intracelular como un factor negativo en la capacidad de fermentación de estas mutantes. Un gran obstáculo en la producción de β -glucosidasa en la mayoría de las levaduras es que la glucosa reprime la expresión de esta enzima (Freer y Skory, 1996). Existen reportes de represión de la expresión de la β -glucosidasa a concentraciones de glucosa ≥ 2 g/L en *Kluyveromyces lactis* (Herman y Halvorson, 1963), *Kluyveromyces fragilis* y *Kluyveromyces dobzharskii* (MacQuillan et al. 1960).

Mientras que Freer y Skory (1996) reportaron una disminución de la actividad de *Candida molischiana* de 43.40 % al encontrarse con 18 g/L de glucosa.

Se observó que a las 64 h de fermentación ambas mutantes de *C. humicola*, OJ-31 y QN-52 presentaron una disminución en la concentración de etanol. Esto podría atribuirse a un consumo por parte de las mutantes, ya que el etanol ha sido reportado con anterioridad como una fuente de carbono asimilable por *C. humicola* (Takashima et al. 2001). De igual manera, Maleszka y Schneider (1982) reportaron que durante el crecimiento de *Pachysolen tannophilus* con 10 g/L de celobiosa y 10 g/L de etanol, la levadura consumía hasta el 50 % del alcohol. También Raamsdonk et al. (2001) reportaron que durante la fermentación de 10 g/L de glucosa y 5 g/L de etanol, *S. cerevisiae* consume el etanol una vez agotada la glucosa.

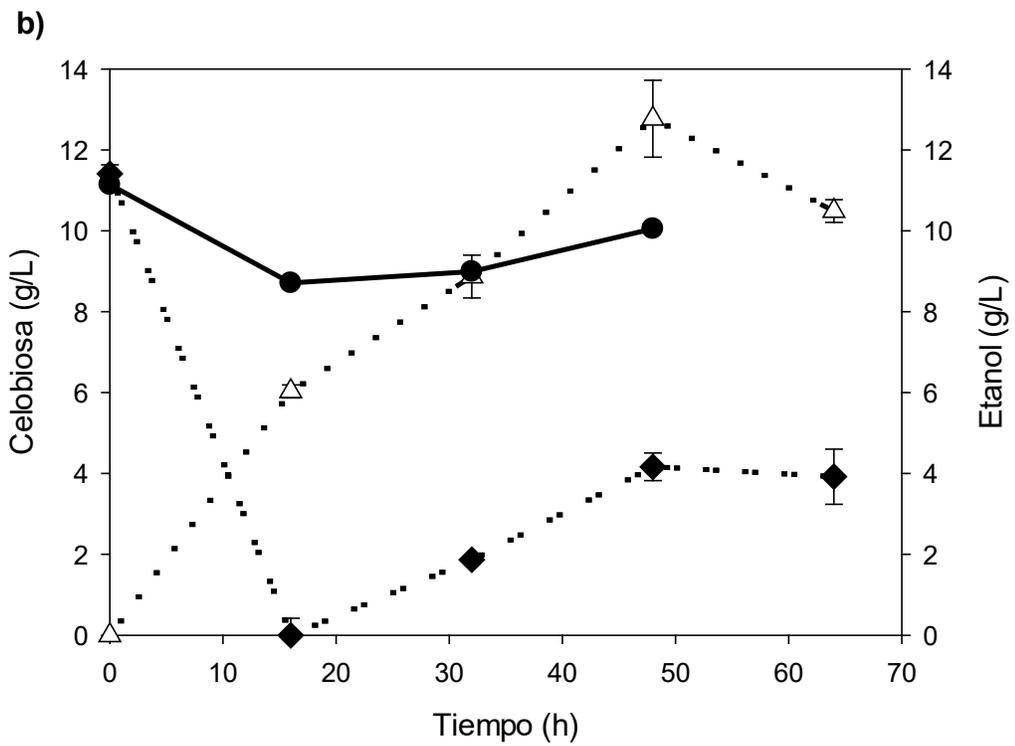
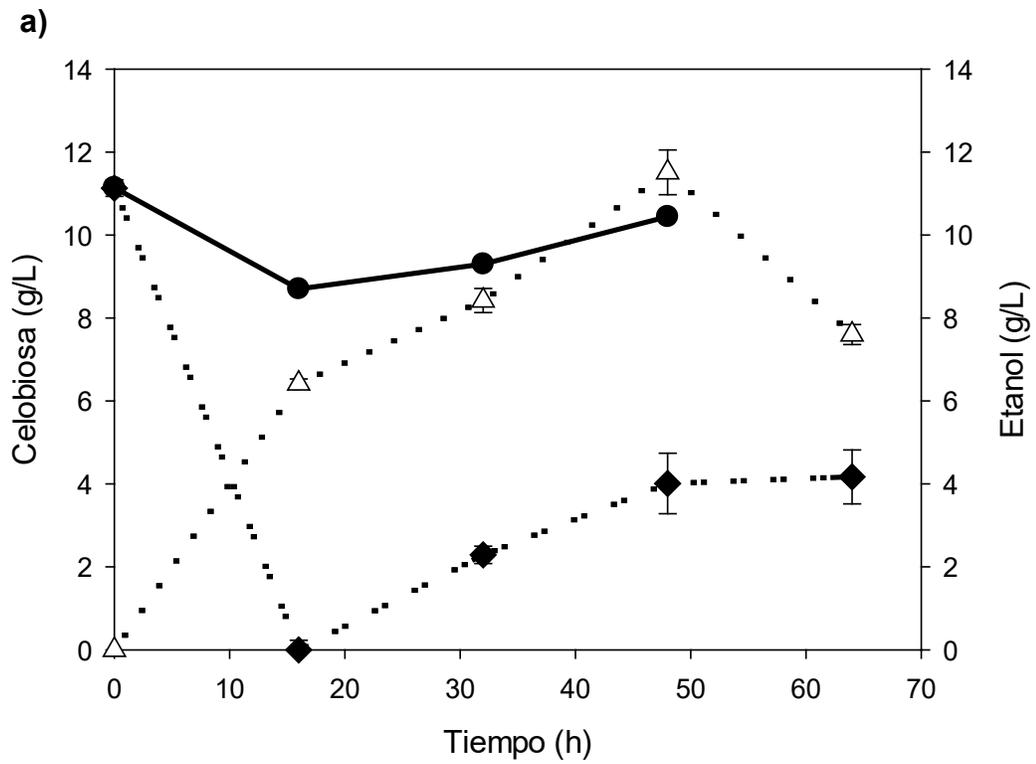


Figura 18. Producción de etanol a partir de celobiosa por cultivo en lote alimentado con *C. humicola*: a) OJ-31; b) QN-52

Claves: Celobiosa antes de la alimentación (—◆—); Celobiosa después de la alimentación (—●—); etanol (—△—).

6.9.4 Determinación del efecto inhibitorio de la concentración de etanol en la capacidad fermentativa de *C. humicola* OJ-31 y QN-52

Se realizó una fermentación en lote con medio Breus más 10 g/L de glucosa y diferentes concentraciones de etanol inicial para ambas mutantes de *C. humicola*, OJ-31 y QN-52, con el propósito de determinar si el etanol, producto de la fermentación, presentaba un efecto negativo en la capacidad fermentativa de estas cepas. Se añadieron concentraciones de aproximadamente 0, 10, 20 y 30 g/L de etanol al inicio de la fermentación. La duración de la fermentación fue de 48 h, se tomaron muestras a las 0, 24 y 48 h.

C. humicola OJ-31 y QN-52 consumieron los 10 g/L de glucosa durante las primeras 24 h en las diferentes concentraciones de etanol. En la primera fermentación no se añadió etanol en el tiempo 0 h, por lo que consistió en el control. Bajo estas condiciones, a las 48 h de fermentación se obtuvieron de 4.96 y 4.93 g/L de etanol con rendimientos de 0.52 y 0.51 g etanol/g glucosa consumida para *C. humicola* OJ-31 y QN-52, respectivamente (**Figura 19**).

En la segunda fermentación se añadieron 10 g/L de etanol a las 0 h. La producción de etanol de *C. humicola* OJ-31 a las 24 h fue de 4.84 g/L con un rendimiento de 0.47 g/g. La fermentación se extendió hasta 48 h, con una producción de 4.19 g/L de etanol y un rendimiento de 0.41 g/g (**Figura 19a**), mientras que *C. humicola* QN-52 a las 24 y 48 h produjo 3.36 y 5.34 g/L de etanol con rendimientos de 0.37 y 0.53 g/g, respectivamente (**Figura 19b**). No obstante que *C. humicola* QN-52 tuvo una producción de etanol relativamente baja a las 24 h, logró recuperarse superando su producción respecto a la de *C. humicola* OJ-31 a las 48 h. Bajo estas

condiciones y en ambas mutantes, no se observó algún efecto negativo por la presencia del etanol inicial.

Al aumentar la concentración de etanol inicial a 20 g/L, la producción de etanol de *C. humicola* OJ-31 a las 24 y 48 h fue de 3.58 y 4.97 g/L con rendimientos de 0.36 y 0.50 g/g, respectivamente. Mientras que la de *C. humicola* QN-52 fue de 4.13 y 5.51 g/L de etanol con rendimientos de 0.41 y 0.52 g/g a las 24 y 48 h, respectivamente. Se observó que a la concentración inicial de etanol de 20 g/L no se presentó un efecto inhibitorio sobre la producción de etanol de las mutantes de *C. humicola*, QN-52 y OJ-31. Ambas mutantes produjeron el máximo teórico de etanol a las 48 h de fermentación.

En la fermentación con una concentración inicial de etanol de 30 g/L, la producción de este alcohol con *C. humicola* OJ-31 y QN-52 se vio afectada. Durante las primeras 24 h de fermentación, OJ-31 y QN-52 sólo produjeron 0.21 y 0.62 g/L de etanol respectivamente. Al extender la fermentación a 48 h, no se observó un aumento en la producción de etanol, ya que los valores en ambas mutantes fueron casi los mismos a los iniciales (**Figura 19**). Bajo estas condiciones se observó un gran efecto negativo de la concentración de etanol sobre la capacidad fermentativa tanto de *C. humicola*, OJ-31 como de QN-52. Estas limitaciones se observaron sólo al exponer a las levaduras a concentraciones iniciales de 30 g/L de etanol, lo cual podría deberse a un efecto de toxicidad por parte de este alcohol.

Conforme el proceso de fermentación progresa, la concentración de etanol incrementa y las células están expuestas a niveles de etanol crecientes y tóxicos (Briggs et al. 2004). El efecto de la toxicidad de etanol en la fisiología de las levaduras es diverso, aunque la membrana celular es el punto principal para el daño

por etanol (Gibson et al. 2007). Dentro de los efectos específicos se encuentra la reducción de la viabilidad y consumo de azúcares (Pascual et al. 1988), reducción de la capacidad de fermentación (Fernandes et al. 1997), inactivación de enzimas, modificación de lípidos (Mizoguchi y Hara 1997) y el incremento de la permeabilidad de la membrana (Marza et al. 2002). Los anteriores son ejemplos de posibles causas que pudieran explicar el por qué las mutantes de *C. humicola*, OJ-31 y QN-52 no pudieron continuar con el proceso de fermentación al encontrarse una concentración de 30 g/L de etanol en el medio.

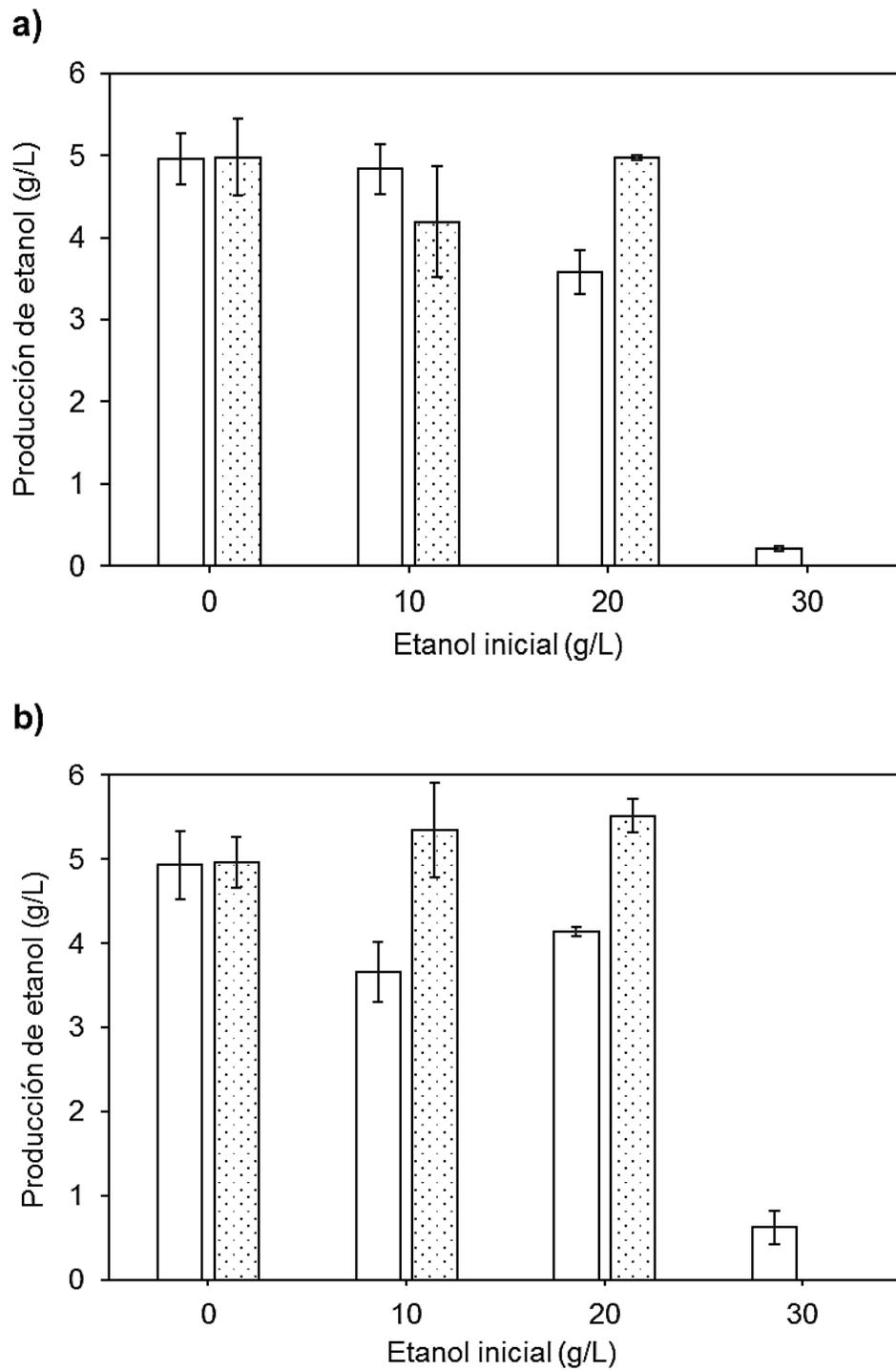


Figura 19. Efecto de la adición de etanol sobre la fermentación alcohólica con *C. humicola*: a) OJ-31; b) QN-52 en medio Breus-glucosa

Claves: 24 h (□); 48 h (▨).

6.9.5 Producción de etanol a partir de los azúcares de bagazo de caña sacarificado con Celluclast^(MR)

Se obtuvo un sacarificado de bagazo de caña (SBC) con las enzimas comerciales Celluclast^(MR) 1.5 L (Novozymes), con un contenido de 16 g/L de azúcares reductores, de los cuales de 7.5, 4.1 y 4.02 g/L corresponden a glucosa, celobiosa y xilosa, respectivamente. Se realizó una fermentación en lote con este SBC como fuente de carbono ajustando a aproximadamente 15 g/L de azúcares reductores totales y con las mutantes de *C. humicola*, OJ-31 y QN-52, cuantificándose la producción de etanol y el consumo de los azúcares.

Al final de la fermentación, *C. humicola* OJ-31 y QN-52 consumieron toda la glucosa, 95 % de la celobiosa y entre el 8-15 % de la xilosa, de la cual aproximadamente la mitad pasó a su intermediario xilitol (**Figura 20**). La producción de etanol fue de 3.89 y 4.24 g/L con rendimientos de 0.39 y 0.42 para las mutantes OJ-31 y QN-52, respectivamente (**Figura 21**). La utilización de la totalidad de la glucosa y casi toda la celobiosa para la producción de etanol, así como el paso a xilitol de la poca xilosa consumida concuerda con los resultados obtenidos previamente (**Figura 7**).

Ambas mutantes de *C. humicola* consumieron cerca del 70 % de los azúcares reductores presentes en el sacarificado de bagazo de caña. El consumo de glucosa y celobiosa fue muy similar entre QN-52 y OJ-31. En cuanto a la producción de etanol, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ambas mutantes ($P=0.667$) ya que *C. humicola* QN-52 superó en sólo 8.25 % a OJ-31.

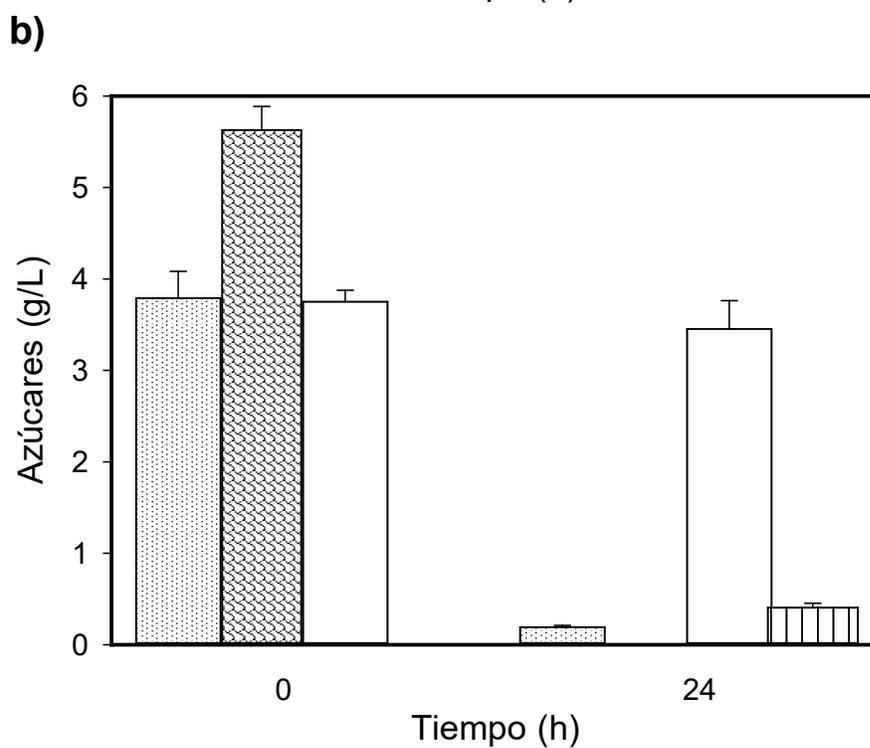
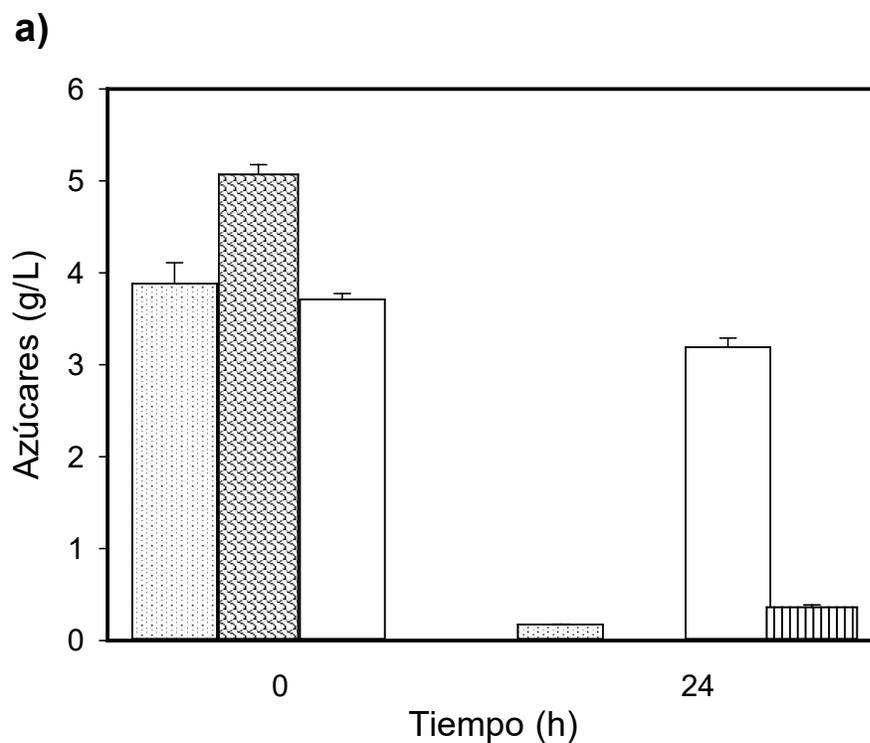


Figura 20. Fermentación de sacarificado de bagazo de caña obtenido con Celluclast 1.5 L. Perfil y consumo de azúcares presentes en el sacarificado con *C. humicola*: a) OJ-31; b) QN-52.

Claves: Celobiosa (▒); glucosa (▩); xilosa (□); xilitol (▤)

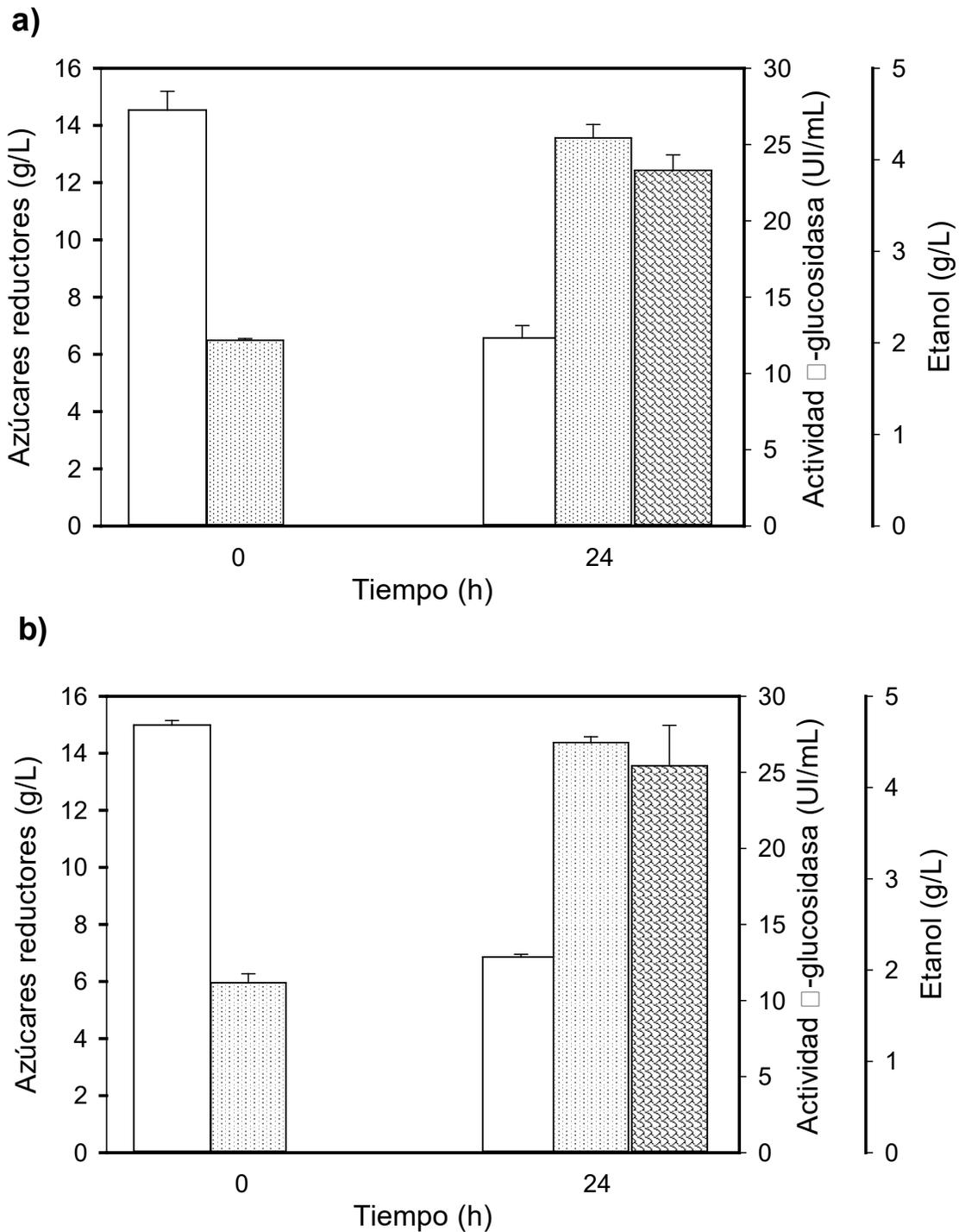


Figura 21. Fermentación de sacarificado de bagazo de caña obtenido con las enzimas Celluclast 1.5 L. Actividad de β -glucosidasa, consumo de azúcares totales y producción de etanol con *C. humicola*: a) OJ-31; b) QN-52.

Claves: Azúcares reductores (\square); actividad β -glucosidasa (\square con puntos); etanol (\square con triángulos).

6.9.6 Producción de etanol con *C. humicola* OJ-31 y QN-52 a partir de sacarificado de bagazo de caña obtenido con el concentrado enzimático de *C. flavigena* PR-22

Se utilizó un sacarificado de bagazo de caña obtenido con un concentrado enzimático de *C. flavigena* PR-22, para probar la capacidad de producción de etanol de las mutantes de *C. humicola* QN-52 y OJ-31 a partir de los SBC con diferentes concentraciones de celobiosa. El contenido de azúcares reductores del SBC fue de 7.40 g/L, de los cuales 1.15 y 2.11 g/L correspondieron a celobiosa y xilosa, respectivamente. La celobiosa en los SBC es baja por lo se realizaron experimentos independientes donde se adicionó celobiosa para ajustar la concentración a 8, 20 y 30 g/L. La fermentación en lote se realizó como se describe anteriormente y se tomaron muestras a las 0, 24 y 48 h.

La primera fermentación fue un control con SBC sin celobiosa adicional, con un contenido de 7.1-7.4 g/L de azúcares reductores totales, de los cuales sólo 0.8-0.9 g/L corresponden a celobiosa. En las primeras 24 h de fermentación, ambas mutantes de *C. humicola* consumieron el total de celobiosa y alrededor de 2.30 g/L de azúcares reductores. La producción de etanol de *C. humicola* OJ-31 y QN-52 fue de 1.21 y 1.23 g/L, respectivamente, ambos con rendimientos de 0.52 g/g. Al extender la fermentación a 48 h, la concentración de etanol de QN-52 disminuyó a 0.79 g/L y la de OJ-31 se mantuvo en 1.14 g/L, (**Figura 22**).

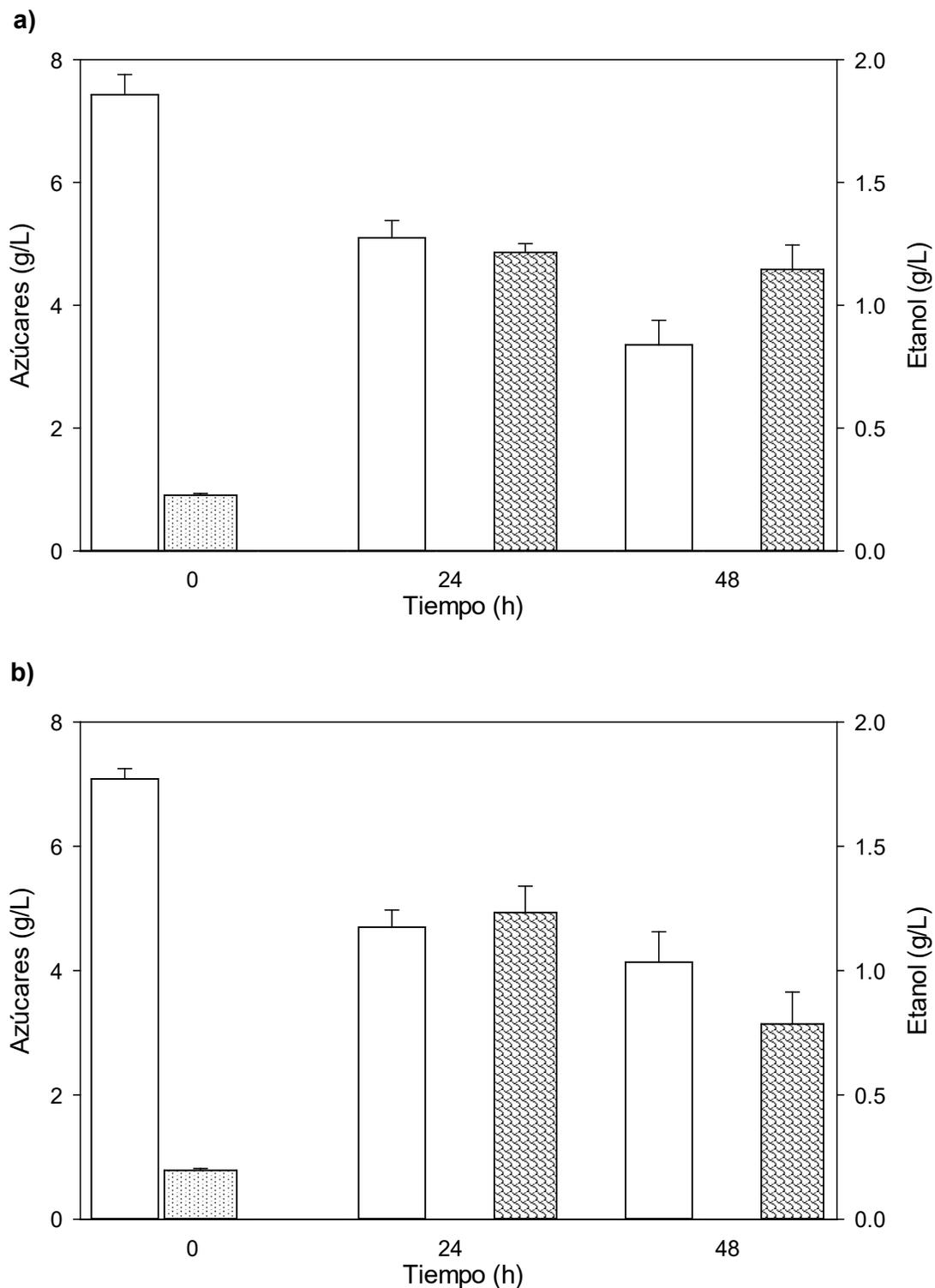


Figura 22. Fermentación del sacarificado de bagazo de caña adicionado con celobiosa a 20 g/L. Producción de etanol y consumo de azúcares reductores totales y celobiosa con las mutantes de *C. humicola*: a) OJ-31; b) QN-52.

Claves: Azúcares reductores (□); celobiosa (▨); etanol (▩).

Se realizó otra fermentación de SBC con celobiosa adicional, donde se tuvo aproximadamente 14.70 g/L de azúcares reductores totales, de los cuales, casi 8 g/L correspondieron a celobiosa. A las 24 h de fermentación, las mutantes *C. humicola*, OJ-31 y QN-52 consumieron cerca de 10 g/L de azúcares reductores que corresponden al 67 % de los azúcares reductores totales (**Figura 23**). Se agotó la celobiosa y la producción de etanol de *C. humicola* OJ-31 y QN-52 fue de 4.77 y 5.90 g/L con rendimientos de 0.49 y 0.52 g/g, respectivamente. La producción de etanol y consumo de azúcares reductores se mantuvieron constantes hasta las 48 h (**Figura 23**). Bajo estas condiciones de trabajo, la producción final de etanol de *C. humicola* QN-52 fue 19 % mayor que la de OJ-31. Aunque no se presentó una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.218$) entre la producción de etanol de las mutantes.

Se realizó otra fermentación incrementando la celobiosa inicial alrededor de 20 g/L, con una concentración de azúcares reductores totales de aproximadamente 25 g/L. El consumo de azúcares reductores de *C. humicola* OJ-31 y QN-52 al final de la fermentación fue de 19.37 y 21.39 g/L, respectivamente. *C. humicola* consumió el 78 % de la celobiosa presente en el medio, mientras que QN-52 consumió un 89 % durante las primeras 24 h de fermentación, ambas agotándose a las 48 h (**Figura 24**). La producción de etanol de *C. humicola* OJ-31 fue de 7.48 y 9.00 g/L con rendimientos de 0.52 y 0.46 g/g a las 24 y 48 h de fermentación, respectivamente (**Figura 24a**). Mientras que en *C. humicola* QN-52 la producción de etanol a las 24 h fue de 9.69 g/L y a las 48 h 10.63 g/L con rendimientos de 0.53 y 0.50 g/g, respectivamente (**Figura 24b**).

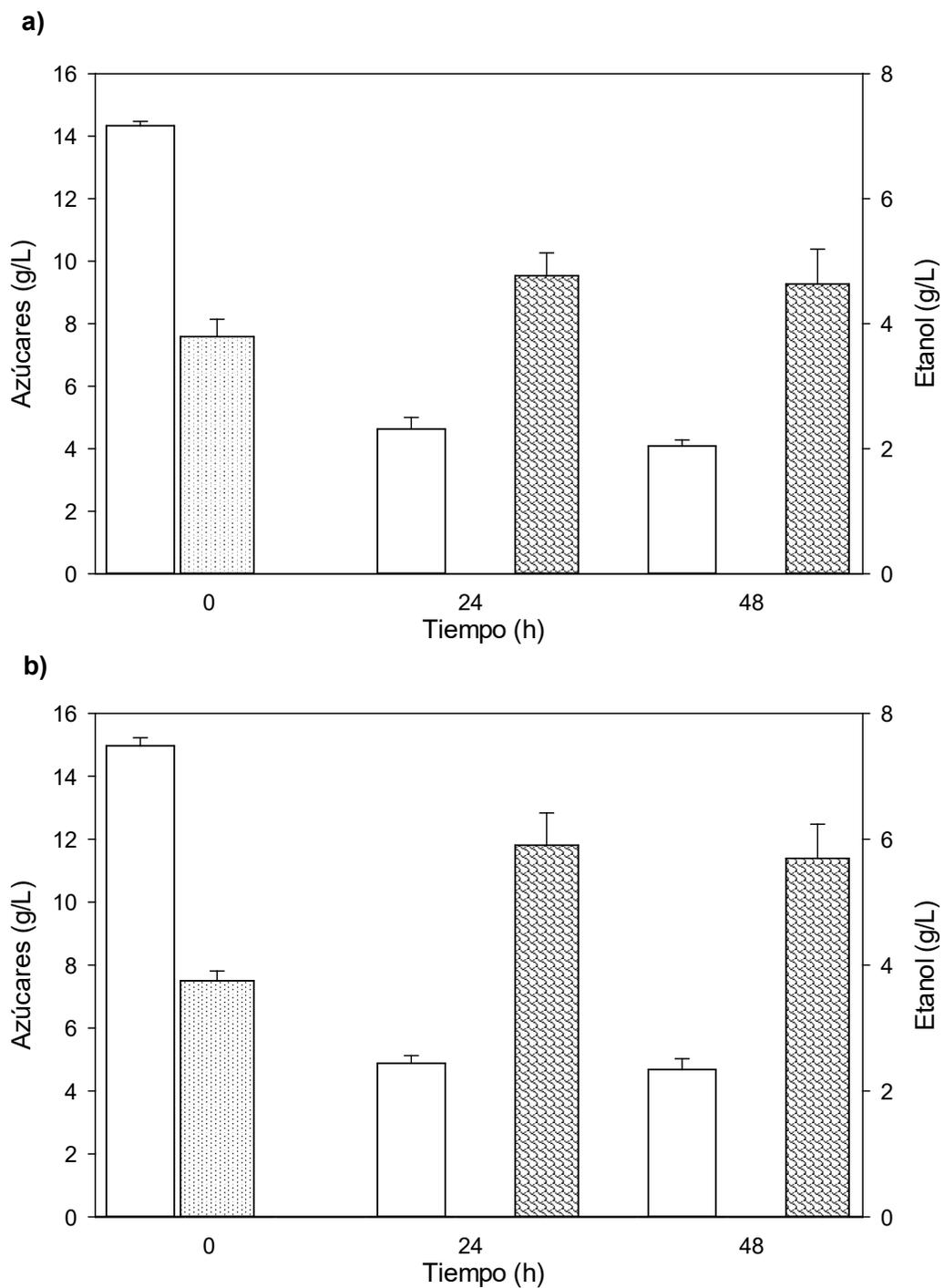


Figura 23. Fermentación del sacarificado de bagazo de caña adicionado con celobiosa a 8 g/L. Producción de etanol y consumo de azúcares reductores totales y celobiosa con las mutantes de *C. humicola*: a) OJ-31; b) QN-52.

Claves: Azúcares reductores (□); celobiosa (▨); etanol (▩).

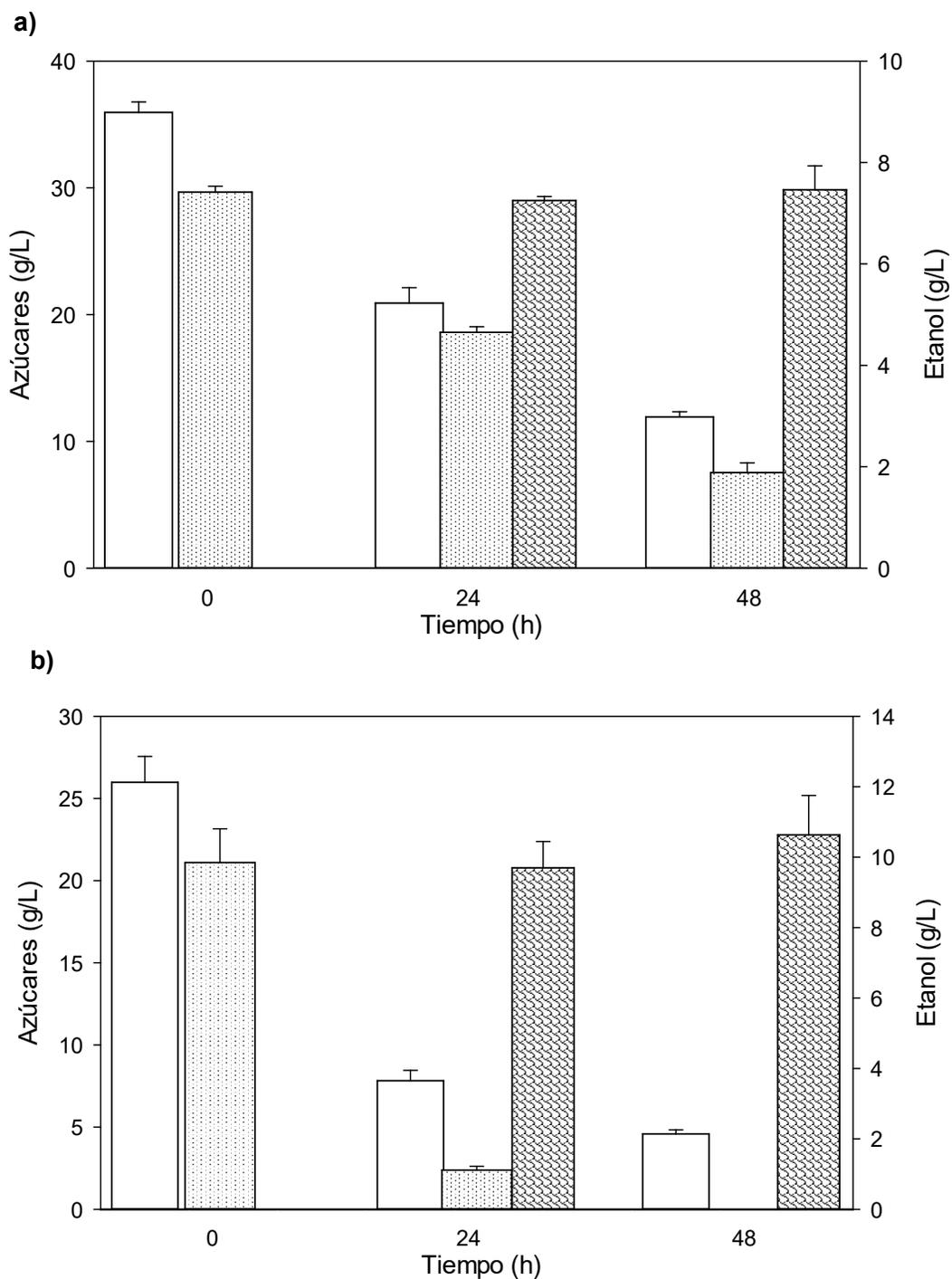


Figura 24. Fermentación del sacarificado de bagazo de caña adicionado con celobiosa a 20 g/L. Producción de etanol y consumo de azúcares reductores totales y celobiosa con las mutantes de *C. humicola*: a) OJ-31; b) QN-52.

Claves: Azúcares reductores (□); cellobiosa (▨); etanol (▩).

Ambas mutantes de *C. humicola* consumieron el total de la celobiosa, aunque *C. humicola* QN-52 superó a OJ-31 en producción de etanol con 29.54 % y 18.11 % más a las 24 y 48 h de fermentación, respectivamente (**Figura 24**). Sin embargo, no se presentó una diferencia estadísticamente significativa ($P= 0.301$) entre la producción de etanol de estas dos mutantes.

Por último, se realizó otra fermentación de los SBC adicionando celobiosa a una concentración de 30 g/L con las mutantes de *C. humicola*, OJ-31 y QN-52. Se evaluó la producción de etanol a partir de aproximadamente 36.50 g/L de azúcares reductores totales, de los cuales 30 g/L corresponden a celobiosa. El consumo de azúcares reductores de *C. humicola* OJ-31 a las 24 y 48 h de fermentación, fue de 15.04 y 24.04 g/L, respectivamente. Los cuales corresponden a celobiosa casi en su totalidad. Además, la producción de etanol de OJ-31 fue de 7.25 y 7.46 g/L con rendimientos de 0.48 y 0.31 g/g a las 24 y 48 h, respectivamente (**Figura 25a**). Mientras que *C. humicola* QN-52 a las 24 y 48 h de fermentación, consumió 19.18 y 29.62 g/L de los azúcares reductores totales, de los cuales 17.78 y 27.95 g/L corresponden a celobiosa, respectivamente. La producción de etanol fue de 9.69 y 14.36 g/L con rendimientos de 0.50 y 0.48 g/g a las 24 y 48 h de fermentación, respectivamente (**Figura 25b**).

La producción de etanol de *C. humicola* QN-52 a las 24 h de fermentación fue 33.65 % mayor que la de OJ-31, mientras que a las 48 h casi dobló su producción. Además, el consumo de azúcares de QN-52 fue 27.54 y 23.21 % mayor que el de OJ-31 a las 24 y 48 h de fermentación, respectivamente (**Figura 25**). En la fermentación de SBC con 30 g/L de celobiosa, la producción de etanol de *C. humicola* QN-52 superó a la de su cepa madre OJ-31, presentándose una diferencia

estadísticamente significativa ($P = 0.017$) entre ambas mutantes. Bajo estas condiciones, el consumo de celobiosa no fue completo y la máxima producción de etanol fueron 14.36 g/L. En los experimentos anteriores se observó que las mutantes de *C. humicola* no pudieron producir cantidades de etanol mayores a los 14.5 g/L, aun en lote alimentado. Por lo que un efecto tóxico del etanol sobre las levaduras podría ser un factor en la limitación de consumo de los azúcares y fermentación. Además, anteriormente se observó que concentraciones de celobiosa de 30 g/L disminuyen un 29.33 % de la actividad β -glucosidasa de OJ-31, mientras que en QN-52 sólo es el 7.41 %. Esto podría ayudar a relacionar el por qué *C. humicola* QN-52 tuvo un mejor desempeño en la fermentación de los SBC con 30 g/L de celobiosa.

En general, durante las fermentaciones del control de SBC y los SBC adicionados con celobiosa a concentraciones de 8 y 20 g/L, la producción de etanol de las mutantes *C. humicola* OJ-31 y QN-52 fue similar. Sin embargo, al llevar la celobiosa a 30 g/L, se presentó una diferencia en la producción de etanol de las mutantes, donde *C. humicola* QN-52 demostró capacidades fermentativas significativamente mejores en comparación con su cepa madre OJ-31.

Existen reportes de la fermentación de celobiosa con diferentes levaduras. La cepa recombinante *S. cerevisiae* MT8-1 contó con la coexpresión de endoglucanasa y celobiohidrolasa de *Trichoderma reesei* y β -glucosidasa de *Aspergillus aculeatus*, en 60 h de fermentación de 10 g/L de celulosa pretratada produjo 2.10 g/L de etanol con un rendimiento de 0.21 g/g (Yanase et al. 2010). En la fermentación de 24 h de medio sintético con 20 g/L de celobiosa, *Dekkera bruxellensis* produjo 4 g/L de etanol (Silva Reis et al. 2014). Mientras que en la fermentación de 25 g/L de celobiosa por 24 h, *Candida shehatae* produjo 5.8 g/L de etanol con rendimiento de 0.23 g/g, y

Scheffersomyces stipitis produjo 10.3 g/L de etanol con rendimiento de 0.41 g/g (Parekh y Wayman 1986). Estas son algunas de las levaduras más utilizadas en la fermentación de los SBC y de acuerdo a lo obtenido en este trabajo, *C. humicola* QN-52 y OJ-31 superó la producción de etanol a partir de celobiosa de estos reportes.

Dentro de las levaduras más utilizadas para la fermentación de SBC se tienen aspectos positivos y negativos en cada una. Por ejemplo, *S. cerevisiae* posee una alta tolerancia a etanol e inhibidores, sin embargo, no puede asimilar xilosa y celobiosa (Jorgensen 2009; Talebnia et al. 2010). *S. stipitis* fermenta glucosa, galactosa, celobiosa y xilosa, sin embargo, no tolera altas concentraciones de etanol y reasimila el alcohol formado (Nigam 2001). *Kluveromyces marxianus* fermenta un amplio espectro de azúcares, sin embargo presenta una baja tolerancia a etanol y una pobre fermentación de xilosa (Banat et al. 1992; Kumar et al. 2009b). *Candida shehatae* posee la capacidad de fermentar xilosa, sin embargo, se obtienen bajos rendimientos de etanol y una baja tolerancia al alcohol (Zaldivar et al. 2001; Limayem y Ricke 2012). De igual manera, *C. humicola* OJ-31 y QN-52 producen etanol a partir de celobiosa, sin embargo, presentan baja tolerancia a etanol.

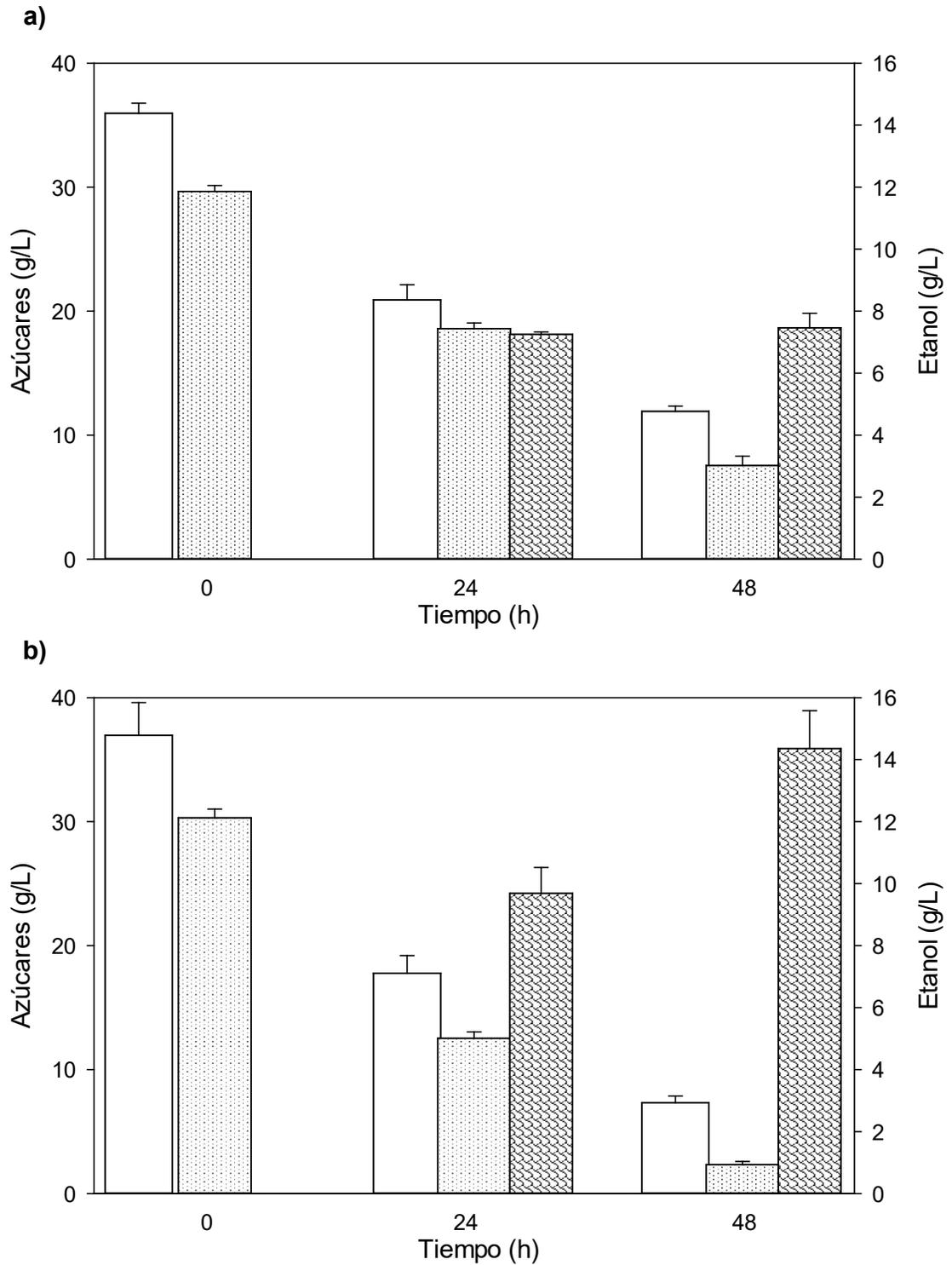


Figura 25. Fermentación del sacarificado de bagazo de caña adicionado con celobiosa a 30 g/L. Producción de etanol y consumo de azúcares reductores totales y celobiosa con las mutantes de *C. humicola*: a) OJ-31; b) QN-52.

Claves: Azúcares reductores (□); celobiosa (▨); etanol (▩).

VII Conclusiones

Cryptococcus humicola OJ-31 no fue capaz de producir etanol a partir de xilosa y no fue posible obtener una mutante que sí fermentara este azúcar.

Se obtuvo una mutante de *C. humicola* OJ-31, llamada QN-52. La capacidad de producción de etanol a partir de ≥ 30 g/L de celobiosa fue mayor con *C. humicola* QN-52 en comparación con su cepa madre, OJ-31. *C. humicola* QN-52 superó la producción de etanol de OJ-31 en un 88 % en la fermentación de 40 g/L de celobiosa. Mientras que en la fermentación de 48 h de sacarificados de bagazo de caña con 30 g/L de celobiosa, *C. humicola* QN-52 produjo 92 % más etanol que OJ-31.

La producción de etanol por *C. humicola* OJ-31 y QN-52 a 40 g/L de celobiosa se vio afectada negativamente. Así mismo la presencia de 30 g/L de etanol afectó la fermentación alcohólica de estas cepas.

Se localizó la β -glucosidasa de *C. humicola* OJ-31 y QN-52 intracelularmente. Esta enzima fue inducida por celobiosa, pero a concentraciones ≥ 30 g/L de este azúcar se presentó una inhibición en la actividad de β -glucosidasa de ambas mutantes. El efecto inhibitorio de la celobiosa sobre *C. humicola* OJ-31 fue 296 y 83 % mayor sobre el de QN-52 a 30 y 40 g/L de celobiosa, respectivamente. Lo que le confiere a la β -glucosidasa de *C. humicola* QN-52 una mayor tolerancia a la inhibición por sustrato.

VIII Perspectivas

Cryptococcus humicola es una levadura con potencial industrial, ya que posee la capacidad de producir etanol a partir de celobiosa, así como la maquinaria enzimática para asimilar xilosa. Otra ventaja es que su β -glucosidasa es intracelular, por lo que al utilizar celobiosa no se presenta represión por glucosa sobre el transporte de xilosa al interior de la célula. Permitiendo así la co-utilización de celobiosa y xilosa, lo cual ha sido reportado en como un factor que ayuda en la mejora de la productividad de etanol y reducción de costos de la sacarificación.

Las limitaciones de *C. humicola* en ausencia de oxígeno son la fermentación de xilosa y la poca tolerancia a altas concentraciones de etanol. Por lo que se podría trabajar con técnicas de ingeniería genética o mutagénesis al azar para obtener cepas de *C. humicola* que toleren mayores concentraciones del alcohol, presenten un mejor reciclaje de cofactores redox y que puedan fermentar xilosa.

IX Bibliografía

- Aro N, Pakula T, Penttilä M (2005) Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev* 29:719–739.
- Bajpai P (2013) *Advances in Bioethanol*. In: SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology. Springer India, New Delhi,
- Bakker BM, Overkamp KM, van Maris AJ AJA van, et al (2001) Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 25:15–37.
- Banat I, Nigam P, Marchant R (1992) Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52 C and producing ethanol at 45 C and 50 C. *World J Microbiol Biotechnol* 8:259–263.
- Banerjee S, Mudliar S, Sen R, et al (2010) Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels, Bioprod Biorefining* 4:77–93.
- Barbagallo RN, Spagna G, Palmeri R, et al (2004) Selection, characterization and comparison of B-glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. *Enzyme Microb Technol* 35:58–66.
- Barnett J a., Entian K-DD (2005) A history of research on yeasts 9: Regulation of sugar metabolism. *Yeast* 22:835–894.
- Beg Q, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal G (2001) Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:326–338.

- Béguin P, Aubert J (1994) The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev* 13:25–58.
- Bisaria V, Martin A (1991) Bioprocessing of agro-residues to glucose and chemicals. *Bioconversion waste Mater to Ind Prod* 187–223.
- Blomberg A, Adler L (1992) Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv Microb Physiol* 33:145–212.
- Blondin B, Ratomahenina R (1983) Purification and properties of the β -glucosidase of a yeast capable of fermenting cellobiose to ethanol: *Dekkera intermedia* Van der Walt. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 17:1–6.
- Bose J (2016) The Genetic Manipulation of *Staphylococci* Methods and Protocols. In: Bose J (ed) *Methods in Molecular Biology*. pp 111–116
- Breus N a., Ryazanova LP, Dmitriev V V., et al (2012) Accumulation of phosphate and polyphosphate by *Cryptococcus humicola* and *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of nitrogen. *FEMS Yeast Res* 12:617–24.
- Briggs D, Brookes P, Stevens R, Boulton C (2004) *Brewing: science and practice*, First Edit. Woodhead Publishing Limited, Cornwall
- Cheng JJ, Timilsina GR (2011) Status and barriers of advanced biofuel technologies: A review. *Renew Energy* 36:3541–3549.
- Cho JY, Jeffries TW (1999) Transcriptional control of ADH genes in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Appl Environ Microbiol* 65:2363–2368.
- Chu BCH, Lee H (2007) Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. *Biotechnol Adv* 25:425–441.

- Coma V (2013) Polysaccharide-based biomaterials with antimicrobial and antioxidant properties. *Polímeros* 23:287–297.
- CONADESUCA. Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar (2015) Programa Nacional de la Agroindustria de la Caña de Azúcar.
- Csonka L, Hanson A (1991) Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu Rev Microbiol* 45:569–606.
- Cuervo L, Folch J, Quiroz R (2009) Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *BioTecnología* 13:11–25.
- D'Amore T (1992) Cambridge prize lecture improving yeast fermentation performance. *J Inst Brew* 98:375–382.
- Das M, Royer T V, Leff LG (2007) Diversity of fungi, bacteria, and actinomycetes on leaves decomposing in a stream. *Appl Environ Microbiol* 73:756–67.
- de Souza ROMA, Miranda LSM, Luque R (2014) Bio(chemo)technological strategies for biomass conversion into bioethanol and key carboxylic acids. *Green Chem* 16:2386.
- de Vries RP, Visser J (2001) *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:497–522.
- Demirbas A (2005) Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. *Energy sources* 27:327–337.
- Deswal D, Khasa YP, Kuhad RC (2011) Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. *Bioresour Technol* 102:6065–6072.

- Duff S, Murray W (1996) Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresour Technol* 55:1–33.
- Dussap C-G, Poughon L (2017) *Microbiology of Alcoholic Fermentation*. Elsevier B.V., Clermont-Ferrand, France
- Esterbauer H, Steiner W, Labudova I, et al (1991) Production of *Trichoderma cellulase* in laboratory and pilot scale. *Bioresour Technol* 36:51–65.
- Fernandes L, Côrte-Real M, Loureiro V (1997) Glucose respiration and fermentation in *Zygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae* express different sensitivity patterns to ethanol and acetic acid.
- Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, Gombert AK (2008) The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:339–54.
- Freer SN, Skory CD (1996) Production of B-glucosidase and diauxic usage of sugar mixtures by *Candida molischiana*. *Can J Microbiol* 42:431–436.
- Galazka JM, Tian C, Beeson WT, et al (2010) Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production. *Science* 330:84–86.
- Ghose T (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem* 59:257–268.
- Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JPR, et al (2007) Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol Rev* 31:535–569.
- Gírio FM, Fonseca C, Carneiro F, et al (2010) Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour Technol* 101:4775–4800.

- González-García RA (2009) Caracterización cinética y metabólica de una levadura aislada de mostos de mezcal capaz de crecer en sacarificados de bagazo de caña para la producción. Reporte de Investigación. XIV Verano de la Investigación Científica del Pacífico.
- Graef MR De, Alexeeva S, Snoep JL, Mattos MJT De (1999) The Steady-State Internal Redox State (NADH / NAD) Reflects the External Redox State and Is Correlated with Catabolic Adaptation in *Escherichia coli* The Steady-State Internal Redox State (NADH / NAD) Reflects the External Redox State and Is Correlated. J Bacteriol 181:2351–2357.
- Ha S-J, Kim H, Lin Y, et al (2013) Single amino acid substitutions in HXT2.4 from *Scheffersomyces stipitis* lead to improved cellobiose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Environ Microbiol 79:1500–7.
- Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Fonseca C, et al (2007) Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. Appl Microbiol Biotechnol 74:937–953.
- Harcus D, Dignard D, Lépine G, et al (2013) Comparative xylose metabolism among the ascomycetes *C. albicans*, *S. stipitis* and *S. cerevisiae*. PLoS One 8:1–10.
- Harner NK, Wen X, Bajwa PK, et al (2015) Genetic improvement of native xylose-fermenting yeasts for ethanol production. J Ind Microbiol Biotechnol 42:1–20.
- Herbert D, Phipps P, Strange R (1971) Chapter III chemical analysis of microbial cells. Methods Microbiol 5:209–344.
- Herman A, Halvorson H (1963) Identification of the structural gene for β -glucosidase in *Saccharomyces lactis*. J Bacteriol 85:895–900.

- Heron JR (1966) Some observations on commercial malt extracts. *J Inst Brew* 72:452–457.
- Hou J, Shen Y, Li XP, Bao XM (2007) Effect of the reversal of coenzyme specificity by expression of mutated *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett Appl Microbiol* 45:184–189.
- Ikehata H, Ono T (2011) The mechanisms of UV mutagenesis. *J Radiat Res* 52:115–125.
- Jeffries TW (1994) Biodegradation of lignin and hemicelluloses. *Biochem Microb Degrad* 233–277.
- Jeffries TW (2006) Engineering yeasts for xylose metabolism. *Curr Opin Biotechnol* 17:320–6.
- Jeppsson M, Bengtsson O, Franke K, et al (2006) The expression of a *Pichia stipitis* xylose reductase mutant with higher $K(M)$ for NADPH increases ethanol production from xylose in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* 93:665–73.
- Jeppsson M, Johansson B, Jensen PR, et al (2003a) The level of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity strongly influences xylose fermentation and inhibitor sensitivity in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Yeast* 20:1263–1272.
- Jeppsson M, Träff K, Johansson B, et al (2003b) Effect of enhanced xylose reductase activity on xylose consumption and product distribution in xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 3:167–175.

- Johansson B, Hahn-Hägerdal B (2002) The non-oxidative pentose phosphate pathway controls the fermentation rate of xylulose but not of xylose in *Saccharomyces cerevisiae* TMB3001. *FEMS Yeast Res* 2:277–82.
- Jorgensen H (2009) Effect of nutrients on fermentation of pretreated wheat straw at very high dry matter content by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol* 153:44–57.
- Kalogeris E, Christakopoulos P, Katapodis P (2003) Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. *Process* 38:1099–1104.
- Karhumaa K, Fromanger R, Hahn-Hägerdal B, Gorwa-Grauslund M-F (2006) High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 73:1039–1046.
- Karhumaa K, Hahn-Hägerdal B, Gorwa-Grauslund M-F (2005) Investigation of limiting metabolic steps in the utilization of xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using metabolic engineering. *Yeast* 22:359–368.
- Kim H, Lee W-H, Galazka JM, et al (2014) Analysis of cellobiosyl transporters from *Neurospora crassa* in *Saccharomyces cerevisiae* for cellobiose fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:1087–94.
- Kim H, Pack M (1989) Cloning and expression of *Cellulomonas fimi* β -glucosidase genes in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol* 11:313–316.
- Kim SR, Ha S-J, Kong II, Jin Y-S (2012) High expression of XYL2 coding for xylitol dehydrogenase is necessary for efficient xylose fermentation by engineered

Saccharomyces cerevisiae. Metab Eng 14:336–43.

Klimacek M, Krahulec S, Sauer U, Nidetzky B (2010) Limitations in Xylose-Fermenting *Saccharomyces cerevisiae*, Made Evident through Comprehensive Metabolite Profiling and Thermodynamic Analysis. Appl Environ Microbiol 76:7566–7574.

Klipp E, Nordlander B, Krüger R, Gennemark P (2005) Integrative model of the response of yeast to osmotic shock. Nature 23:975–982.

Koning W de, Dam K van (1992) A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. Anal Biochem 204:118–123.

Kotter P, Ciriacy M (1993) Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol 38:776–783.

Krahulec S, Petschacher B, Wallner M, et al (2010) Fermentation of mixed glucose-xylose substrates by engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*: role of the coenzyme specificity of xylose reductase, and effect of glucose on xylose utilization. Microb Cell Fact 9:16.

Kuhad R, Singh A, Eriksson K (1997) Biotechnology in the pulp and paper industry. Adv Biochem Eng Biotechnol 57:45–125.

Kuhad RC, Gupta R, Khasa YP, et al (2011) Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. Renew Sustain Energy Rev 15:4950–4962.

Kuhn A, Zyl C van (1995) Purification and partial characterization of an aldo-keto

- reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Environ Microbiol 61:1580–1585.
- Kulakovskaya E V, Golubev VI (2006) Extracellular Antifungal Glycolipids of *Cryptococcus humicola* Yeasts. Dokl Biol Sci 410:422–424.
- Kumar P, Barrett DM, Delwiche MJ, Stroeve P (2009a) Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. Ind Eng Chem Res 48:3713–3729.
- Kumar R, Singh S, Singh O V (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. J Ind Microbiol Biotechnol 35:377–91.
- Kumar S, Singh S, Mishra I (2009b) Recent advances in production of bioethanol from lignocellulosic biomass. Chem Eng Technol 32:517–526.
- Kurtzman C (2011) *Barnettozyma* Kurtzman, Robnett, Basehoar-Powers (2008). Yeast A Taxon Study 333–340.
- Lackie JM (2013) M. In: The Dictionary of Cell & Molecular Biology. pp 389–435
- Lawrence CW (1991) Classical mutagenesis techniques. Methods Enzymol 194:273–281.
- Lewis Liu Z, Weber SA, Cotta MA, Li S-Z (2012) A new β -glucosidase producing yeast for lower-cost cellulosic ethanol production from xylose-extracted corncob residues by simultaneous saccharification and fermentation. Bioresour Technol 104:410–416.
- Li H, Luo W, Gu Q, et al (2013a) Acetone, butanol, and ethanol production from cane molasses using *Clostridium beijerinckii* mutant obtained by combined low-energy

- ion beam implantation and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine induction. *Bioresour Technol* 137:254–260.
- Li J, Liu G, Chen M, et al (2013b) Cellodextrin transporters play important roles in cellulase induction in the cellulolytic fungus *Penicillium oxalicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:10479–10488.
- Liang M, Damiani A, He QP, Wang J (2014) Elucidating Xylose Metabolism of *Scheffersomyces stipitis* for Lignocellulosic Ethanol Production. *ACS Sustain Chem Eng* 2:38–48.
- Limayem A, Ricke SC (2012) Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog Energy Combust Sci* 38:449–467.
- Lin Y, Tanaka S (2006) Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:627–642.
- Long TM, Su Y-K, Headman J, et al (2012) Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. *Appl Environ Microbiol* 78:5492–5500.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
- MacQuillan A, Winderham S, Halvorson H (1960) The control of enzyme synthesis by glucose and the repressor hypothesis. *Biochem Biophys Res Commun* 3:77–80.
- Maleszka R, Schneider H (1982) Concurrent production and consumption of ethanol by cultures of *Pachysolen tannophilus* growing on D-xylose. *Appl Environ*

Microbiol 44:909–912.

Maleszka R, Wang P, Schneider H (1982) Yeasts that ferment D-cellobiose as well as D-xylose. *Biotechnol Lett* 4:133–136.

Marza E, Camougrand N, Manon S (2002) Bax expression protects yeast plasma membrane against ethanol-induced permeabilization. *FEBS Lett* 521:47–52.

Matsushika A, Inoue H, Kodaki T, Sawayama S (2009a) Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:37–53.

Matsushika A, Inoue H, Murakami K, et al (2009b) Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol* 100:2392–2398.

Matsushika A, Sawayama S (2008) Efficient bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* requires high activity of xylose reductase and moderate xylulokinase activity. *J Biosci Bioeng* 106:306–309.

Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem* 31:426–428.

Mizoguchi H, Hara S (1997) Ethanol-induced alterations in lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of exogenous fatty acid. *J Ferment Bioeng* 83:12–16.

Mohite B V., Patil S V. (2016) Chapter 4 – Impact of Microbial Cellulases on Microbial Cellulose Biotechnology. In: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. pp 31–40

- Morais CG, Cadete RM, Uetanabaro APT, et al (2013) D-xylose-fermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil. *Fungal Genet Biol* 60:19–28.
- Morita T, Ishibashi Y, Fukuoka T, et al (2011) Production of Glycolipid Biosurfactants, Cellobiose Lipids, by *Cryptococcus humicola* JCM 1461 and Their Interfacial Properties. *Biosci Biotechnol Biochem* 75:1597–1599.
- Mosier N, Wyman C, Dale B, et al (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 96:673–686.
- Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM (2008) *Lehninger principles of biochemistry*.
- Nigam J (2001) Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *J Biotechnol* 87:17–27.
- Nogae I, Johnston M (1990) Isolation and characterization of the ZWF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Gene* 96:161–169.
- Ocampo-Ortega NJ (2011) Obtención de cepas mutantes de *Cryptococcus humicola* con capacidad fermentativa de hidrolizados de residuos lignocelulósicos para la producción de bioetanol. Tesis de maestría, Depto. de Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV-IPN, Ciudad de México.
- Ohnishi J, Mizoguchi H, Takeno S, Ikeda M (2008) Characterization of mutations induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in an industrial *Corynebacterium glutamicum* strain. *Mutat Res Toxicol Environ Toxicol* 649:239–244.
- Ovando-Chacón S, Waliszewsk K (2005) Preparativos de celulasas comerciales y

- aplicaciones en procesos extractivos. Univ y Cienc 21:111–120.
- Parekh S, Wayman M (1986) Fermentation of cellobiose and wood sugars to ethanol by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. Biotechnol Lett 8:597–600.
- Pascual C, Alonso A, Garcia I (1988) Effect of ethanol on glucose transport, key glycolytic enzymes, and proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Bioeng 23:374–378.
- Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rabia T, Martínez J (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. Int. Microbiol. 5:53–63.
- Piper P (1995) The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. FEMS Microbiol Lett 134:121–127.
- Polaina J, MacCabe A (2007) Cellulases for Biomass Conversion. In: Industrial enzymes: Structure, Functions and Applications. pp 35–50
- Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, et al (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol 67:577–591.
- Pollak N, Dölle C, Ziegler M (2007) The power to reduce: pyridine nucleotides—small molecules with a multitude of functions. Biochem J 402:205–218.
- Ponce-noyola T, de la Torre M De (1995) Isolation of a high-specific-growth-rate mutant of *Cellulomonas flavigena* on sugar cane bagasse. Appl Microbiol Biotechnol 42:709–712.
- Quiroz-Castañeda RE, Balcázar-López E, Dantán-González E, et al (2009) Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus*

sanguineus on solid wheat straw medium. Electron J Biotechnol 12:5–6.

Qureshi N, Saha BBC, Cotta MAM (2007) Butanol production from wheat straw hydrolysate using *Clostridium beijerinckii*. Bioprocess Biosyst Eng 30:419–427.

Raamsdonk LM, Diderich JA, Kuiper A, et al (2001) Co-consumption of sugars or ethanol and glucose in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deleted in the HXK2 gene. Yeast 18:1023–1033.

Rao RS, Bhadra B, Shivaji S (2008) Isolation and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks. Lett Appl Microbiol 47:19–24.

Reese ET (1956) A microbiological process report; enzymatic hydrolysis of cellulose. Appl Microbiol 4:39–45.

Reese ET, Siu RGH, Levinson HS (1950) The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. J Bacteriol 59:485–97.

Richard P, Teusink B, Westerhoff H, Dam K van (1993) Around the growth phase transition *S. cerevisiae*'s make-up favours sustained oscillations of intracellular metabolites. FEBS Lett 318:80–82.

Rodríguez ME, Lopes C, Valles S, et al (2007) Selection and preliminary characterization of B-glycosidases producer Patagonian wild yeasts. Enzyme Microb Technol 41:812–820.

Rojas-Rejón O, Poggi-Varaldo H, Ramos-Valdivia A, et al (2011) Production of cellulases and xylanases under catabolic repression conditions from mutant PR-22 of *Cellulomonas flavigena*. J Ind Microbiol Biotechnol 38:257–264.

- Rubin EM (2008) Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 454:841–845.
- Sadie CJ, Rose SH, den Haan R, van Zyl WH (2011) Co-expression of a cellobiose phosphorylase and lactose permease enables intracellular cellobiose utilisation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:1373–1380.
- Saha B (2003) Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30:279–291.
- Santos R, Cadete R, Badotti F, et al (2011) *Candida queiroziae* sp. nov., a cellobiose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Atlantic Rain Forest. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99:635–642.
- Sarkar N, Ghosh SK, Bannerjee S, Aikat K (2012) Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renew Energy* 37:19–27.
- Searchinger T, Heimlich R, Houghton RA, et al (2008) Use of U.S. croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change. *Science* 319:1238–40.
- Silva Reis AL, Rodrigues de Souza R de F, Baptista Torres RRN, et al (2014) Oxygen-limited cellobiose fermentation and the characterization of the cellobiase of an industrial *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strain. *Springerplus* 3:1–8.
- Singhania RR, Patel AK, Sukumaran RK, et al (2013) Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresour Technol* 127:500–507.
- Skoog K, Hahn-Hägerdal B (1990) Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Appl Environ Microbiol* 56:3389–3394.
- Skory C, Freer S, Bothast R (1996) Properties of an intracellular β -glucosidase

- purified from the cellobiose-fermenting yeast *Candida wickerhamii*. Appl Microbiol Biotechnol 46:353–359.
- Sørensen A, Andersen JJ, Ahring BK, et al (2014) Screening of carbon sources for beta-glucosidase production by *Aspergillus saccharolyticus*. Int Biodeterior Biodegrad 93:78–83.
- Spencer-Martins I, Van Uden N (1986) Substrate and endproduct regulation of cellobiose uptake by *Candida wickerhamii*. Appl Microbiol Biotechnol 25:272–276.
- Spindler D, Grohmann K, Wyman C (1992) Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) using cellobiose fermenting yeast *Brettanomyces custersii*. US Pat. 5,100,791 1–7.
- Sreenath HK, Jeffries TW (1999) 2-Deoxyglucose as a selective agent for derepressed mutants of *Pichia stipitis*. Appl Biochem Biotechnol 77:211–222.
- Sternberg D (1976) Production of cellulase by Trichoderma. Biotechnol Bioeng Symp 6:35–53.
- Sun Y, Cheng J (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresour Technol 83:1–11.
- Takashima M, Sugita T, Shinoda T, Nakase T (2001) Reclassification of the *Cryptococcus humicola* complex. Int J Syst Evol Microbiol 51:2199–2210.
- Talebna F, Karakashev D, Angelidaki I (2010) Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. Bioresour Technol 101:4744–4753.

- Tanino T, Hotta A, Ito T, et al (2010) Construction of a xylose-metabolizing yeast by genome integration of xylose isomerase gene and investigation of the effect of xylitol on fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 88:1215–1221.
- Tian C, Beeson W (2009) Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:22157–22162.
- Villena M, Iranzo J (2006) Characterization of an exocellular β -glucosidase from *Debaryomyces pseudopolymorphus*. *Enzyme Microb Technol* 39:229–234.
- Wanderley K, Torres F (2004) Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiol Lett* 231:165–169.
- Wohlbach DJ, Kuo A, Sato TK, et al (2011) Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. *PNAS* 108:13212–13217.
- Wojtczak G, Breuil C, Yamada J, Saddler J (1987) A comparison of the thermostability of cellulases from various thermophilic fungi. *Appl Microbiol b* 27:82–87.
- Wood J (1999) Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:230–262.
- Yanase S, Yamada R, Kaneko S, Noda H (2010) Ethanol production from cellulosic materials using cellulase-expressing yeast. *Biotechnol J* 5:449–455.
- Yu H, Zeng G, Huang H, et al (2007) Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting. *Biodegradation* 18:793–802.

- Yu X, Zheng Y, Xiong X, Chen S (2014) Co-utilization of glucose, xylose and cellobiose by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Biomass and Bioenergy* 71:340–349.
- Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L (2001) Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:17–34.
- Zha J, Shen M, Hu M, et al (2014) Enhanced expression of genes involved in initial xylose metabolism and the oxidative pentose phosphate pathway in the improved xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* through evolutionary engineering. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41:27–39. y
- Zhao X, Zhang L, Liu D (2012) Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioprod Biorefining* 6:465–482.