



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio comparativo del transporte y asimilación de xilosa en levaduras convencionales y no convencionales.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

IBQ. Alejandra Karina Estrada Ávila.

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Antonio Peña Díaz

[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Juan Carlos González Hernández (Tutor externo)

[Instituto Tecnológico de Morelia](#)

Dra. Alicia González Manjarrez

[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad de México. Julio, 2017.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*"Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas"*

*Marie Curie.*

*Para mi mamá,  
que sin su ADN mitocondrial nada de esto hubiera sido posible.*

## Agradecimientos

A mi **mamá**, por ser la mujer e ingeniera valiente, fuerte e inteligente que me inspira día a día. Por todos los sacrificios que hiciste por mi educación, por siempre exigirme ser la mejor y por darme el sustento para alcanzar mis sueños y metas. Por compartirme el gusto por la química y la ingeniería y ser mi mayor inspiración.

A mi **papá**, por haber apoyado mis más locos sueños desde ser cantante, políglota, deportista hasta investigadora. Por haberme enseñado a dar lo mejor de mí en cada una de mis actividades. Por llenar la casa de libros, por mostrarnos lo grande que era el mundo y motivarnos a recorrerlo todo.

A **Luis**, por haberme enseñado toda la física que sé, que aunque no creas me ha servido bastante en todos estos años. Gracias por la lección más importante de todas: no llorar cuando pierdas la pelea, levantarse y seguir adelante (sin acusar a nadie con mi mamá jaja). Te quiero hermano.

A **Mariana**, por llevarme de la mano al examen de admisión por si me perdía en la Universidad. Por ser un apoyo incondicional, mantenerme siempre con los pies en la Tierra y ayudarme con todas mis redacciones. Por ser un ejemplo de dedicación y pasión por la profesión y aunque estés lejos, seguir de cerca todo este crecimiento. Gracias por dejarme ser la hermana organizada y responsable. Te quiero.

A mis invaluable e irremplazables amigos por escucharme, apoyarme y abrazarme durante todo este proceso y por siempre recordarme a dónde quiero llegar. **Angie**, porque tus regaños en la clase de microbiología dieron resultados. Por estar para tu Gleba y cuidar del micelio. **ILDZV. Gabby**, por todas las veces que me recordaste por qué estaba haciendo esto. Por no dejar que me diera por vencida y por ser mi persona siempre y en todo momento. Je t'aime ma babe. **Gaby**, por motivarme a hacer todo con el corazón sin olvidar la razón. Por todos los pescaditos y palabras de aliento que marcaron esta etapa de mi vida. Por enseñarme a ser valiente cuando más lo necesité. Te amo eternamente. **Alex**, por tantos años, por tantas risas y por tantos sueños. Por estar a toda hora y en todo lugar. Por hacerme parte de tu familia y por creer en mí y en todas estas locuras. **Rudy**, por tener palabras de aliento para el alma, las piernas, el corazón y la mente. **Kathya**, por haber sido parte de todo esto, por seguir paso a paso el proceso desde ciencias básicas. Por estar a las 3 am para escuchar mis quejas sobre la bioquímica.

Gracias por la amistad y los consejos de vida. **Marco**, por pagar impuestos y por estar para alejarme de tanta ñoñez. Gracias por los regaños y consejos de adulto. A mis **KASAC**, por todas las técnicas de estudio que aprendí de ustedes y por estar siempre pendientes aunque vivamos muy lejos. ¡Las quiero chulas! **Karen**, por el amuleto de buena suerte que me diste antes de empezar con este sueño. Por todas las palabras, por las aventuras y por ser una gran amiga.

A mis amigas de la maestría, **Kary, Ana y Tere** por todos los consejos, las carcajadas, las largas horas de estudio, las crisis existenciales y por el gran apoyo.

A mi Mancunian Family: **Germán, Steph, Vicente, Rosa, Ale, George, Arturo, Moisés, Luis Héctor, Mike y Mitzi** por todas las anécdotas así como el apoyo científico y emocional que continúa a pesar de la distancia. Los quiero amigos.

Last but not least: **Lalo**, gracias por enseñarme a disfrutar la vida cuando la centrífuga se daña. Gracias por ser mi roca durante la última fase de esta historia, por las palabras de aliento y los consejos. Gracias por creer en mí y sobre todo, por entender la diferencia entre una bacteria y una levadura. I cheese sandwich you.

Al **Dr. Antonio Peña Díaz** por recibirme en su laboratorio y darme la confianza para realizar este proyecto. Por transmitirme su pasión por la bioquímica y compartir todo su conocimiento y anécdotas en este oficio. Por los acertados consejos y recomendaciones durante esta etapa y por el gran apoyo como tutor.

Al **Dr. Juan Carlos González Hernández** por haberme introducido al mundo de las levaduras, por ofrecerme este proyecto para continuar con mis estudios, por la confianza y el apoyo para mi desarrollo científico. ¡Muchas gracias Profe!

A la **Dra. Alicia González Manjarrez** por aceptar ser parte de este proyecto y por sus valiosas aportaciones. Gracias por las palabras de aliento y la motivación para seguir por el camino de la ciencia y la investigación. Por las constantes invitaciones a saber, entender y comprender más. Por ser un ejemplo a seguir.

**Dra. Martha Calahorra Fuertes** y **M.C. Norma Sánchez Sánchez**, gracias por todo el apoyo técnico y emocional que me brindaron durante este tiempo. Gracias por su amistad, por sus atinados consejos, por compartir tantas horas de experimentación y redacción. Por la confianza y por hacer más liviano este viaje. No me alcanzan las palabras para expresarles mi gratitud por todo lo que pudimos compartir y por todo lo que me enseñaron. Las llevo en el corazón hoy y siempre. Las quiero mucho.

**M.C, Cristina Uribe Alvarez**, gracias por los consejos y el apoyo. Por las anécdotas, tips, técnicas e historias. Por la dicha de compartir tutor y entendernos en esos tiempos en los que las tesis y los artículos no tenían ni título.

A todos los integrantes del laboratorio 305-Ote: **Emilio, Lili, Mona, Rocío** y a la **Dra. Natalia Chiquete Félix** por todo su apoyo, consejos y hasta regaños. Muchas gracias por estar siempre al pendiente de esta historia y permitirme compartirles una carcajada de vez en cuando (casi nunca).

Al laboratorio **301-Ote** por todo el apoyo, las risas, los consejos y uno que otro reactivo.

Al **Dr. Roberto Coria** y los miembros del laboratorio **302-Ote**.

Al **Dr. Roberto Arreguín**, por ayudarme con los pinochos para terminar mis cinéticas en menos tiempo. Por todos los consejos y el apoyo tanto científico como emocional.

A la **Dra. Marissa Calderón** por las recomendaciones para trabajar con *D. hansenii*. A **Elenka** por todas las carcajadas, las largas tardes de experimentos y por compartir todo este proceso y el drama que involucró.

A **Montserrat Garrido** por la ayuda con los experimentos en el fluorómetro y las palabras para seguir adelante cuando ya estaba cansada.

A los miembros del jurado: **Dr. Diego González Halphen (IFC UNAM)**, **Dr. Francisco Ruíz Terán (FQ UNAM)**, **Dra. Norma Adriana Valdéz Cruz (IIB UNAM)**, **Dr. Salvador Uribe Carvajal (IFC UNAM)** y **Dra. Sobeida Sánchez Nieto (FQ UNAM)** por sus acertadas correcciones y recomendaciones para la escritura final de este trabajo.

A la **Unidad de Cómputo** del IFC por todo el apoyo técnico con equipos y computadoras.

Al **Sr. René Flores** por su ayuda como laboratorista.

A **Gabriela Valdés** y **Ma. Del Rocío Romualdo** por su apoyo secretarial.

Al **Posgrado en Ciencias Bioquímicas**, al **Instituto de Fisiología Celular** y a la **Universidad Nacional Autónoma de México** por todas las facilidades y apoyo otorgado.

Al **CONACYT** por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría en la UNAM (No. 384170), por el financiamiento del proyecto “Caracterización Bioquímica y Molecular del Transporte de Xilosa en *Debaryomyces hansenii*” dentro de la Convocatoria de Investigación Científica Básica 2012 con número de solicitud 178033; y por la beca otorgada en conjunto con la Universidad de Manchester para la participación en “The University of Manchester-CONACYT Research School”.

Al **Sistema Nacional de Investigadores** del CONACYT por el estímulo económico como ayudante de investigador en el período agosto 2016-junio 2017.

A la **Sociedad Mexicana de Bioquímica** y la **Rama de Bioenergética y Biomembranas** por el financiamiento para la participación en la reunión XX de la Rama de Bioenergética y Biomembranas y el XXXI Congreso Nacional de Bioquímica.



## Índice

Índice.....	7
Índice de figuras .....	8
Índice de tablas.....	10
Abreviaturas .....	11
Resumen .....	13
Abstract .....	14
Résumé .....	15
Zusammenfassung .....	16
1 Introducción.....	17
1.1 Xilosa .....	17
1.2 Xilitol .....	18
1.3 Transporte de azúcar en microorganismos .....	23
1.4 Levaduras .....	25
2 Hipótesis.....	30
3 Justificación .....	30
4 Objetivos.....	31
5 Metodología.....	32
5.1 Microorganismos.....	32
5.2 Medios de cultivo .....	32
5.3 Asimilación de la fuente de carbono (Serial Drop Test).....	33
5.4 Cinéticas de crecimiento .....	33
5.5 Acumulación y transporte de glucosa y xilosa .....	37
5.6 Estimación de NADH.....	38
5.7 Consumo de oxígeno .....	38
5.8 Alcalinización del medio (Cambios de pH) .....	38
6 Resultados.....	39
7 Discusión de resultados.....	77
8 Conclusiones .....	87
9 Perspectivas .....	88
10 Referencias.....	89
11 Anexos.....	102

## Índice de figuras

Figura 1. Estructura de xilosa y glucosa.....	17
Figura 2. Estructura de xilitol y xilosa.....	18
Figura 3. Ruta metabólica propuesta para la xilosa y glucosa en levaduras. ....	20
Figura 4. Levaduras principalmente estudiadas en la producción de xilitol.. ....	22
Figura 5. Mecanismos de transporte en eucariontes.....	23
Figura 6. Crecimiento en glucosa y xilosa con inóculo de 24 h en YPD.....	39
Figura 7. Crecimiento en glucosa y xilosa con inóculo de 24 h en YPX. ....	40
Figura 8. Crecimiento en glucosa y xilosa en medio mínimo con inóculo de 24 h en YPD.....	41
Figura 9. Crecimiento en glucosa y xilosa en medio mínimo con inóculo de 24 h en YPX.....	41
Figura 10. Curvas de crecimiento en medio YPD.....	42
Figura 11. Curvas de crecimiento en medio YPX.....	43
Figura 12. Curvas de crecimiento en medio mínimo con glucosa.....	44
Figura 13. Curvas de crecimiento en medio mínimo con xilosa.....	45
Figura 14. Curvas de crecimiento en YPD pH 4.....	46
Figura 15. Curvas de crecimiento en YPD pH 6.....	47
Figura 16. Rendimiento $Y_{x/s}$ en medio YPD.....	48
Figura 17. Rendimiento $Y_{p/s}$ en medio YPD.....	48
Figura 18. Producción de etanol en medio YPD.....	49
Figura 19. Productividad de etanol en medio YPD.....	49
Figura 20. Velocidad de consumo de glucosa en medio YPD.....	49
Figura 21. Curvas de crecimiento en YPX pH 4.....	50
Figura 22. Curvas de crecimiento en YPX pH 6.....	51
Figura 23. Rendimiento $Y_{x/s}$ en medio YPX.....	53
Figura 24. Rendimiento $Y_{p/s}$ (xilitol) en medio YPX.....	53
Figura 25. Rendimiento $Y_{p/s}$ (etanol) en medio YPX.....	53
Figura 26. Producción de xilitol en medio YPX.....	54
Figura 27. Producción de etanol en medio YPX.....	54
Figura 28. Productividad de xilitol en medio YPX.....	55
Figura 29. Productividad de etanol en medio YPX.....	55
Figura 30. Velocidad de consumo de xilosa en medio YPX.....	56
Figura 31. Acumulación de $^{14}\text{C}$ -glucosa.....	58
Figura 32. Cinéticas de transporte de $^{14}\text{C}$ -glucosa.....	59
Figura 33. Acumulación de $^{14}\text{C}$ -xilosa.....	63
Figura 34. Cinéticas de transporte de $^{14}\text{C}$ -xilosa.....	64
Figura 35. Producción de NADH/NADPH en presencia de glucosa o xilosa.....	67
Figura 36. Producción de NADH/NADPH en presencia de glucosa o xilosa.....	68
Figura 37. Consumo de oxígeno en <i>C. guilliermondii</i> y <i>S. cerevisiae</i> .....	71
Figura 38. Consumo de oxígeno en <i>D. hansenii</i> y <i>K. marxianus</i> .....	72
Figura 39. Consumo de oxígeno en <i>Z. bailii</i> y <i>C. lusitaniae</i> .....	73
Figura 40. Bombeo de protones en presencia de glucosa o xilosa.....	75
Figura 41. Bombeo de protones en presencia de glucosa o xilosa.....	76

Figura 42. Diagrama de las cadena respiratoria en levaduras .....	85
Figura 43. Simportador protón-xilosa <i>Xylhp</i> en <i>D. hansenii</i> CBS 767.....	106
Figura 44. Resistencia a G418 <i>C. guilliermondii</i> NRRL Y-2075 USDA.....	107
Figura 45. Resistencia a G418 en <i>S.cerevisiae</i> ITM 2014.....	108
Figura 46. Resistencia a G148 en <i>D. hansenii</i> Y-726 (CBS767). .....	108
Figura 47. Resistencia a G418 en <i>K. marxianus</i> . .....	109
Figura 48. Resistencia a G418 en <i>Z. bailii</i> .....	110
Figura 49. Resistencia a G418 en <i>C. lusitaniae</i> . .....	110

## Índice de tablas

Tabla 1. Velocidades máximas de crecimiento en medios YPD y YPX. ....	43
Tabla 2. Velocidades máximas de crecimiento en YPD pH 4 y pH 6. ....	46
Tabla 3. Biomasa máxima producida en 36 h en YPD pH 4 y 6. ....	47
Tabla 4. Velocidades máximas de crecimiento en YPX pH 4 y pH 6. ....	51
Tabla 5. Biomasa máxima producida en 48 h en YPX pH 4 y 6. ....	52
Tabla 6. Parámetros cinéticos del transporte de <sup>14</sup> C-glucosa. ....	60
Tabla 7. Eficiencia transporte de glucosa. ....	61
Tabla 8. Parámetros cinéticos del transporte de <sup>14</sup> C-xilosa. ....	65
Tabla 9. Eficiencia transporte de xilosa. ....	65
Tabla 10. Rendimientos obtenidos en medio YPD con pH ajustado. ....	79
Tabla 11. Rendimientos obtenidos en medio YPD con pH ajustado (2). ....	79
Tabla 12. Rendimientos obtenidos en medio YPX con pH ajustado. ....	80
Tabla 13. Rendimientos obtenidos en medio YPX con pH ajustado (2). ....	80
Tabla 14. Rendimientos $Y_{x/s}$ en medios YPD. ....	102
Tabla 15. Rendimientos $Y_{x/s}$ en medios YPX. ....	103

## Abreviaturas

Abs	Absorbancia
ADH	Alcohol Deshidrogenasa
AOX	Oxidasa Alterna
$\beta$ -XDH	$\beta$ -Xilosa Deshidrogenasa
C	Control (sin sustrato añadido)
Cg	<i>Candida guilliermondii</i>
Cl	<i>Clavispora lusitaniae</i>
CRR	Respiración Resistente a Cianuro (Cyanide-Resistant Respiration)
Dh	<i>Debaromyces hansenii</i>
G	Glucosa
G6P-DH	Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa
HK	Hexocinasa
INT	Iodotetranizolio
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten/Constante de afinidad
Km	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
$K_t$	Constante de transporte= $K_m$
MES	Ácido 2-(N-morfolin)etanosulfónico.
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidad Máxima Específica de Crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ )
NAD <sup>+</sup>	Nicotin Adenín Dinucleótido Oxidado
NADH	Nicotin Adenín Dinucleótido Reducido
NADP <sup>+</sup>	Nicotin Adenín Dinucleótido Fosfato Oxidado
NADPH	Nicotin Adenin Dinucleótido Fosfato Reducido
Natg O	Nanoátomos Gramo de Oxígeno
OG	Octilgalato
PBS	Solución salina amortiguada por fosfatos (Phosphate Buffered Saline)

Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Medio Mínimo Sintético Definido
SDH	Sorbitol Deshidrogenasa
TEA	Trietanolamina
$V_{m\acute{a}x}$	Velocidad máxima de transporte
X	Xilosa
$X_{m\acute{a}x}$	Biomasa máxima producida ( $g L^{-1}$ )
XDH	Xilitol deshidrogenasa
XMR	Xilosa Mutarrotasa
XR	Xilosa Reductasa
$Y_{X/S}$	Rendimiento biomasa/sustrato ( $g g^{-1}$ )
$Y_{P/S}$	Rendimiento producto/sustrato ( $g g^{-1}$ )
$Y_{P/S Et}$	Rendimiento etanol/sustrato ( $g g^{-1}$ )
$Y_{P/S Xil}$	Rendimiento etanol/sustrato ( $g g^{-1}$ )
YNB	Yeast Nitrogen Base (sin aminoácidos)
YP	Yeast Extract, Peptone
YPD	Yeast Extract, Peptone, Dextrose
YPX	Yeast Extract, Peptone, Xylose
Zb	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>

## Resumen

El aprovechamiento de los azúcares en los residuos lignocelulósicos, tales como xilosa, ha aumentado en los últimos años debido a que existen productos secundarios de alto interés biotecnológico. Uno de éstos, el xilitol, es un polialcohol utilizado en industria farmacéutica, dental y alimenticia. Se obtiene industrialmente por hidrogenación catalítica de xilosa con níquel a altas temperaturas y presiones, lo cual lo convierte en un proceso costoso. La producción microbiana de xilitol y etanol está siendo promovida como alternativa para satisfacer la demanda económica de dichos alcoholes. La levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae* es incapaz de transportar xilosa hacia el interior de la célula y metabolizarla. Otros géneros de levaduras presentan ciertas limitaciones al metabolizar xilosa, tales como: desequilibrio redox, baja expresión de las enzimas necesarias para la ruta o sistemas ineficientes de transporte del azúcar.

El objetivo de este trabajo fue comparar en diferentes géneros de levadura: *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075 USDA, *S. cerevisiae* ITM-2014, *Debaryomyces hansenii* ATTC Y-7426, *Kluyveromyces marxianus*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Clavispora lusitaniae*, la utilización de xilosa como fuente de carbono, su posterior transformación a xilitol o etanol y el transporte del azúcar a diferentes valores de pH (4 y 6) para elucidar si es llevado a cabo por un simportador protón/xilosa o por un sistema de difusión facilitada. Se analizó también el cambio de pH posterior a la adición de glucosa o xilosa, la reducción del NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup> en presencia de glucosa o xilosa, así como los efectos de la xilosa y dos inhibidores de cadena respiratoria en el consumo de oxígeno.

La xilosa fue consumida y metabolizada por todas las levaduras, aunque no agotada en 48 horas de incubación. *C. guilliermondii* y *C. lusitaniae* mostraron los mejores rendimientos de xilitol de aproximadamente 0.20 g g<sup>-1</sup> y una productividad de ≈0.004-0.005 (g g h<sup>-1</sup>). Únicamente se observó producción de etanol en *K. marxianus* y *Z. bailii*. Estas dos levaduras restablecieron el desequilibrio redox característico de la ruta metabólica estudiada, así como un efecto a nivel respiratorio promovido por la xilosa. *C. guilliermondii* presentó los valores más bajos de K<sub>m</sub> para el transporte de xilosa (1.1 μM, pH 4; 1.6 μM, pH 6). No obstante, no hubo evidencia, en ninguna levadura, de la presencia de un simportador debido a que no se reportaron valores menores de K<sub>m</sub> a pH 4 y el medio no fue alcalinizado posterior a la adición de xilosa.

## Abstract

Exploitation of sugars from lignocellulosic residues, such as xylose, has had an increase in the last years due to the several by-products of high biotechnological interest. One of them, xylitol, is a polyol widely used in pharmaceutical, dental and food industries. It is currently obtained through catalytic hydrogenation of xylose with nickel at high temperature and pressure, which makes it an expensive process. Microbial production of xylitol and ethanol is being encouraged as a potential alternative to satisfy such economic demand. Model yeast *Saccharomyces cerevisiae* is unable to transport xylose into the cell and metabolize it. Other yeast genus show certain limitations when metabolizing xylose, such as: redox imbalance, low expression of the enzymes used in the pathway or inefficient sugar transport systems.

The aim of this work was to compare in different yeast genus: *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075 USDA, *S. cerevisiae* ITM-2014, *Debaryomyces hansenii* ATTC Y-7426, *Kluyveromyces marxianus*, *Zygosaccharomyces bailii* and *Clavispora lusitaniae*, usage of xylose as a carbon source, its subsequent conversion to xylitol or ethanol and the sugar transport at different pH values (4 and 6) so as to elucidate whether it is carried out by a proton/sugar symporter or by a facilitated diffusion system. pH changes after the addition of glucose and xylose, reduction of NAD<sup>+</sup> or NADP<sup>+</sup> in presence of glucose or xylose, as well as the effects of xylose and two respiratory chain inhibitors in oxygen consumption were analyzed.

Xylose was consumed and metabolized by all yeasts, although not fully depleted within 48 hours of incubation. *C. guilliermondii* and *C. lusitaniae* achieved the highest xylitol yields of approximately 0.20 g g<sup>-1</sup> and a productivity of ≈0.004-0.005 (g g h<sup>-1</sup>). Ethanol production was only observed in *K. marxianus* and *Z. bailii*. These showed an ability to restore the redox imbalance proper of the studied pathway, as well as an effect at the respiratory level promoted by xylose. *C. guilliermondii* presented the lowest K<sub>m</sub> values for xylose transport (1.1 μM, pH 4; 1.6 μM, pH 6). Nevertheless, there was no evidence, in any genus, of the existence of a symporter due to the fact that lower K<sub>m</sub> values at pH 4 were not reported and incubation media was not alkalized after xylose addition.



## Résumé

L'exploitation des sucres à partir de résidus lignocellulosiques, tel que le xylose, a eu une augmentation au cours des dernières années en raison des nombreux sous-produits d'intérêt biotechnologique élevé. L'un d'entre eux, le xylitol, est un polyol largement utilisé dans les industries pharmaceutiques, dentaires et alimentaires. Il est actuellement obtenu par hydrogénation catalytique du xylose avec du nickel à haute température et pression, ce qui en fait un procédé coûteux. La production microbienne de xylitol et d'éthanol est encouragée comme une alternative potentielle pour satisfaire une telle demande économique. La levure modèle *Saccharomyces cerevisiae* est incapable de transporter le xylose dans la cellule et de le métaboliser. D'autres types de levure montrent certaines limites lorsqu'ils métabolisent le xylose, tels que : le déséquilibre redox, la faible expression des enzymes utilisées dans la voie métabolique ou des systèmes inefficaces de transport de sucre.

Le but de cet étude est de comparer, dans différents genres de levure (*Candida guilliermondii* NRRL Y-2075 USDA, *S. cerevisiae* ITM-2014, *Debaryomyces hansenii* ATTC Y-7426, *Kluyveromyces marxianus*, *Zygosaccharomyces bailii* et *Clavispora lusitaniae*), l'utilisation du xylose en tant que source de carbone, sa conversion ultérieure en xylitol ou en éthanol et le transport de sucre à différentes valeurs de pH (4 et 6), afin d'élucider si celui-ci est réalisé par un symporteur de protons/sucre ou par un système de diffusion facilité. Les changements de pH après l'addition de glucose et xylose, la réduction de NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup> en présence de glucose ou xylose, ainsi que les effets du xylose et de deux inhibiteurs de la chaîne respiratoire dans la consommation d'oxygène ont été analysés.

Le xylose a été consommé et métabolisé par toutes les levures, bien que pas complètement épuisé dans les 48 heures suivant l'incubation. *C. guilliermondii* et *C. lusitaniae* ont obtenu les rendements de xylitol les plus élevés d'environ 0.20 g g<sup>-1</sup> et une productivité de ≈0.004-0.005 (g g h<sup>-1</sup>). La production d'éthanol n'a été observée que dans *K. marxianus* et *Z. bailii*. Ces levures ont montré une capacité à restaurer le déséquilibre redox proprement dit de la voie étudiée, ainsi qu'un effet au niveau respiratoire favorisé par le xylose. *C. guilliermondii* a présenté les valeurs de K<sub>m</sub> plus bas pour le transport de la xylose (1.1 μM, pH 4; 1.6 μM, pH 6). Néanmoins, il n'y a eu aucune preuve, dans aucun genre, de l'existence d'un symporteur en raison du fait que des valeurs basses de K<sub>m</sub> à pH 4 n'ont pas été rapportées et que le milieu d'incubation n'a pas été alcalinisé après l'addition de xylose.

## Zusammenfassung

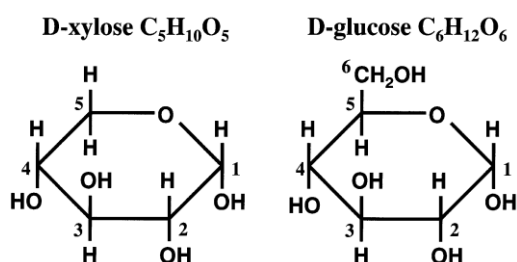
Die Ausnutzung von Zuckern aus lignocellulosischen Rückständen, wie z. B. Xylose, hat in den letzten Jahren aufgrund der zahlreichen Nebenprodukte mit hohem biotechnologischen Interesse zugenommen. Eines davon, Xylit, ist ein Polyol, das in der Pharma-, Zahn- und Lebensmittelindustrie weit verbreitet ist. Es wird derzeit durch katalytische Hydrierung von Xylose mit Nickel bei hoher Temperatur und hohem Druck erhalten, die ihn zu einem teuren Prozess macht. Die mikrobielle Produktion von Xylit und Ethanol wird als eine mögliche Alternative zur Erfüllung dieser wirtschaftlichen Nachfrage gefördert. Model Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist nicht in der Lage, Xylose in die Zelle zu transportieren und zu metabolisieren. Andere Hefe-Gattungen zeigen gewisse Einschränkungen beim Metabolisieren von Xylose, wie: Redox-Ungleichgewicht, Geringe Ausprägung der im Weg verwendeten Enzyme oder ineffizienten Zuckertransportsysteme. Das Ziel dieser Arbeit war es, in verschiedenen Hefe-Gattungen *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075 USDA, *S. cerevisiae* ITM-2014, *Debaryomyces hansenii* ATTC Y-7426, *Kluyveromyces marxianus*, *Zygosaccharomyces baillii* und *Clavispora lusitaniae* zu vergleichen: die Verwendung von Xylose als Kohlenstoffquelle, deren weitere Umwandlung in Xylit oder Ethanol und der Zuckertransport bei verschiedenen pH-Werten (4 und 6), um zu ermitteln, ob es durch einen Proton/Zucker-Symporter oder durch ein erleichtertes Diffusionssystem durchgeführt wird. pH-Änderungen nach der Zugabe von Glucose und Xylose, Reduktion von NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup> in Gegenwart von Glucose oder Xylose sowie die Wirkung von Xylose und zwei Atmungsketteninhibitoren im Sauerstoffverbrauch wurden analysiert.

Xylose wurde verbraucht und von der ganzen Hefe metabolisiert, obwohl nicht innerhalb von 48 Stunden nach der Inkubation vollständig erschöpft. *C. guilliermondii* und *C. lusitaniae* erreichten die höheren Xylit-Ausbeuten von etwa 0.20 g g<sup>-1</sup> und eine Produktivität aus  $\approx 0.004-0.005$  (g g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Die Ethanolproduktion wurde nur in *K. marxianus* und *Z. baillii* beobachtet. Diese Hefen zeigten eine Fähigkeit, das Redox-Ungleichgewicht des untersuchten Wegs wiederherzustellen, sowie eine Wirkung auf die von Xylose geförderte Atmungsstufe. *C. guilliermondii* stellte die niedrigsten  $K_m$ -Werte für den Xylose-Transport vor (1.1  $\mu$ M, pH 4; 1.6  $\mu$ M, pH 6). Trotzdem gab es in keiner Gattung keinen Beweis für die Existenz eines Symports, da die niedrigeren  $K_m$ -Werte bei pH 4 nicht Reporter waren und das Inkubationsmedium nach Xylose-Addition nicht alkalisiert wurde.

# 1 Introducción

## 1.1 Xilosa

D-xilanopiranososa, mejor conocida como xilosa, es un azúcar de cinco carbonos o pentosa (Fig. 1). Después de la glucosa es el azúcar más abundante en las plantas (Jackson and Nicolson 2002). De toda la biomasa lignocelulósica, entre el 10% y 40% es hemicelulosa, y el componente principal la xilosa (Skoog & Hahn-Hägerdal, 1990). Se obtiene de maderas duras y materiales herbáceos (Gírio et al., 2012).



**Figura 1. Estructura de xilosa y glucosa.** Comparación en referencia al número de carbonos (Jackson & Nicolson, 2002).

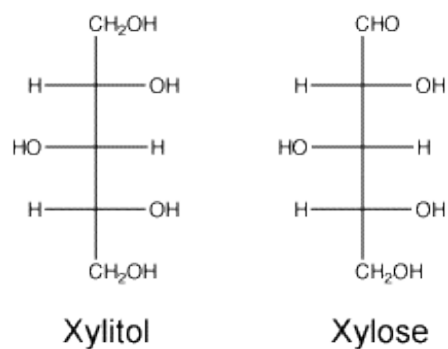
La xilosa también se encuentra en los néctares de algunas plantas debido a la degradación del xilano por hongos o bacterias (Jackson & Nicolson 2002).

### 1.1.1 La xilosa en la producción de bioetanol

Debido a la importancia de las alternativas “bio” para sustituir los combustibles, la obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica ha sido intensamente estudiada en los últimos años. Para maximizar la conversión de azúcares derivados de la biomasa, es importante fermentar no sólo aquellos de seis carbonos, sino también los de cinco carbonos (Chianget al., 1981). Algunas pentosas pueden ser convertidas a etanol por bacterias, levaduras y hongos (Skoog & Hahn-Hägerdal, 1988). En cuanto a las levaduras, una estrategia está basada en cepas genéticamente modificadas (principalmente *Saccharomyces cerevisiae*) para convertir tanto hexosas como pentosas en etanol. Otra estrategia es el uso de levaduras fermentadoras de pentosas tales como aquellas de los géneros *Pichia* o *Candida* (Bideaux et al., 2016).

## 1.2 Xilitol

El xilitol es un poliol de cinco carbonos ( $C_5H_{12}O_5$ ) derivado de la xilosa (Fig. 2). Se encuentra en las frutas y o vegetales (Parajó et al., 1998). El principal interés en la obtención del xilitol se centra en sus propiedades y usos como endulzante. Debido a que es metabolizado por rutas independientes de insulina, puede ser utilizado por los diabéticos (Winkelhausen & Kuzmanova, 1998).



**Figura 2. Estructura de xilitol y xilosa.** ("Sugars and sugar substitutes", 2017).

A pesar de la amplia variedad de aplicaciones, el uso del xilitol como endulzante es limitado. El costo de producción es aproximadamente diez veces más alto que el de la sacarosa o sorbitol. Esto ha propiciado la búsqueda de mejores tecnologías capaces de disminuir los costos de producción (Parajó et al. 1998).

Actualmente se estima una demanda de xilitol en el mercado global de más de 125,000 ton por año, con un valor de 4.50-5.50 dólares por kilo, comprado por farmacéuticas y compañías alimenticias y \$20 dólares por kilo en los supermercados (Albuquerque et al., 2014).

### 1.2.1 Producción química

La producción industrial de xilitol comenzó en 1975. Se lleva a cabo en reactores a altas presiones (31-40 atm) y altas temperaturas (100-130 °C), durante 3 a 5 h dependiendo de las condiciones empleadas. El proceso se divide en cinco pasos:

Paso 1: Hidrólisis ácida (ácido sulfúrico) del material rico en xilanos.

Paso 2: Purificación del hidrolizado hasta obtener una solución pura de xilosa.

Paso 3: Hidrogenación catalítica de la xilosa pura a xilitol con una aleación de Ni-Al<sub>2</sub> como catalizador.

Paso 4: Purificación del xilitol obtenido.

Paso 5: Cristalización del xilitol.

Las condiciones empleadas para el proceso requieren equipos especializados y costosos, junto con la gran cantidad de pasos de purificación necesarios hacen que el costo de la obtención de xilitol aumente de manera considerable (Franceschin et al., 2011; Kelloway & Daoutidis, 2014; Koutinas et al., 2014; Nigam & Singh, 1995).

## 1.2.2 Producción biológica

Los microorganismos asimilan y fermentan glucosa más fácilmente que xilosa; sin embargo, existen bacterias, levaduras y hongos capaces de asimilar y fermentar xilosa en xilitol, etanol y otros compuestos (Winkelhausen & Kuzmanova 1998). En los primeros trabajos realizados sobre la fermentación de la xilosa, se clasificaba al xilitol como un subproducto indeseado y su producción era un parámetro no reportado (Skoog & Hahn-Hägerdal, 1988).

### 1.2.2.1 Bacterias

En las bacterias, se transforma la xilosa a xilulosa en un solo paso por la enzima xilosa-isomerasa, seguido de su fosforilación a xilulosa-5-fosfato por la xilulocinasa. Este intermediario puede entrar a ruta de las pentosas fosfato (Pentose Phosphate Pathway, PPP) o ser transformado a gliceraldehído-3-fosfato y acetil-fosfato por la xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa (Pal et al., 2016). Debido a que algunas bacterias tales como cepas de *Corynebacterium* y *Enterobacter* producen xilitol, se cree que poseen un sistema enzimático óxido-reductor (además de, o reemplazando a la xilosa-isomerasa) permitiendo la reducción de xilosa en xilitol, con una posterior oxidación a xilulosa (Parajó et al., 1998).

### 1.2.2.2 Hongos

Mediante una conversión óxido-reductiva, los hongos metabolizan xilosa a xilulosa (Parajó et al. 1998). Sin embargo, hay pocos reportes sobre la producción de xilitol por los hongos, y su rendimiento depende principalmente de la cepa utilizada y las condiciones de cultivo (Pal et al. 2016). Hongos filamentosos tales como *Byssoschlamys*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Gliocladium*, *Myrothecium*, *Rhizopus*, *Neurospora sp.*, están reportados como productores de xilitol aunque en cantidades pequeñas ( $<1 \text{ g L}^{-1}$ ) (Chiang & Knight, 1960).

### 1.2.2.3 Levaduras

Entre los microorganismos, las levaduras se consideran los mejores productores de xilitol, por lo cual la mayoría de los trabajos son llevados a cabo con ellas. Entre los géneros estudiados, aquellas pertenecientes a *Candida sp.*, logran los mejores rendimientos ( $4.6\text{-}17 \text{ g L}^{-1}$ ) (Winkelhausen and Kuzmanova 1998).

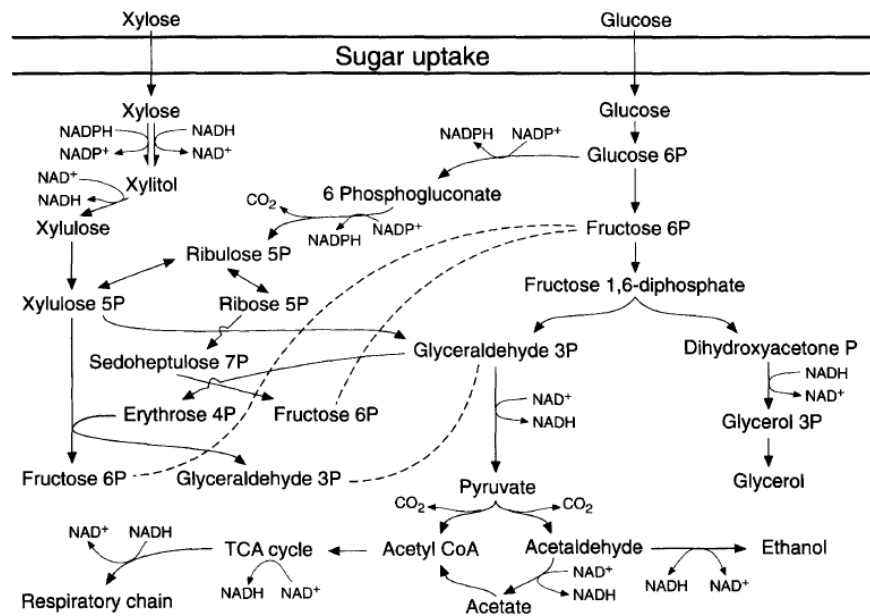


Figura 3. Ruta metabólica propuesta para la xilosa y glucosa en levaduras. (Hahn-Hägerdal et al., 1994).

Barnett et al., en 1979, sugieren que aunque una gran cantidad de levaduras son capaces de metabolizar D-xilosa aeróbicamente, ninguna es capaz de hacerlo en anaerobiosis (Efecto Kluyver).

En la mayoría de los géneros, el xilitol se acumula entre los primeros dos pasos de la conversión de xilosa a xilulosa (Fig. 3). El primer paso involucra la reducción de xilosa a xilitol por la xilosa reductasa [XR] (aldosa reductasa EC 1.1.1.21) dependiente de NADH o NADPH, mientras que en el segundo paso, el xilitol es oxidado a xilulosa por la xilitol deshidrogenasa [XDH] (EC 1.1.1.9) dependiente de NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup> (Pal et al. 2013), ambas inducidas por xilosa (Sene et al., 2000). Bajo condiciones limitadas de oxígeno, la fosforilación oxidativa no puede re-oxidar todo el NADH generado, por lo que la concentración intracelular de NADH aumenta y lleva a la acumulación de xilitol (Albuquerque et al. 2014). En la mayoría de las levaduras no se ha descrito una actividad de transhidrogenasa (NADH+NADP<sup>+</sup> ↔ NAD<sup>+</sup> + NADPH); por lo tanto, el desequilibrio causado en la regeneración de los cofactores no puede resolverse por esta ruta (Bruinenberg et al., 1985). No obstante, en *P. stipitis*, *C. shehatae* y *Pachysolen tannophilus* existe actividad de XR con una especificidad dual de cofactor, lo que impide el desequilibrio redox generado y permite la producción anaeróbica de etanol sin la formación de xilitol (Alexander et al., 1988; Bruinenberg et al., 1983; Hahn-Hägerdal et al., 1994; Skoog & Hahn-Hägerdal, 1990).

Además del oxígeno, existen otros factores que controlan la producción de xilitol tales como:

- Concentración de xilosa: para producir altas cantidades de xilitol se utilizan grandes concentraciones de xilosa en el medio. Se han reportado concentraciones óptimas entre 200 y 300 g/L en cepas de *C. guilliermondii* (Nolleau et al., 1993; Mohamad et al., 2015).
- Otras fuentes de carbono: la fermentación de hidrolizados lignocelulósicos produce varios azúcares, entre ellos xilosa, glucosa, manosa, galactosa y arabinosa. Algunos de estos pueden tener un efecto tanto negativo como positivo sobre la inducción de XR o XDH (Winkelhausen & Kusmanova 1998; Tamburini et al., 2010). El efecto más notable es la inhibición del consumo de xilosa por la glucosa (Walther et al., 2001, Mohamad et al., 2015).
- Fuente de nitrógeno: se han investigado varias fuentes de nitrógeno para optimizar el crecimiento de microorganismos y la producción de metabolitos de interés, entre estos se encuentran los orgánicos (peptona, extracto de levadura y casaminoácidos) y los inorgánicos (sulfato y fosfato de amonio, nitrato de sodio y urea) (Wang et al. 1971; Miura et al., 2013; Bura et al., 2012;

Albuquerque et al., 2014). Varios autores han obtenido mejores rendimientos de xilitol y consumo de xilosa suplementando el medio de cultivo con urea o sulfato de amonio (Rodrigues et al., 2011; Ko et al., 2008; Hongzhi et al., 2011; Zhang et al., 2012).

- Temperatura: se ha encontrado que los valores desde 30°C hasta 37°C son óptimos para la producción de xilitol, dependiendo de cada cepa y condiciones del proceso (Misra et al., 2013; Ping et al., 2013; Albuquerque et al., 2014).
- pH: los valores apropiados para el crecimiento celular y obtención de xilitol se encuentran entre 4 y 6 (Albuquerque et al., 2014; Ghindea et al., 2010; Srivani & Pydi Setty, 2012)

Pal et al., 2016 realizaron una revisión sobre la producción de xilitol mencionando a levaduras de tipo silvestre de los géneros *Candida*, *Pichia*, *Debaryomyces* y *Hansenula* como las más estudiadas. Los autores reportan la cantidad de xilosa utilizada, xilitol obtenido, productividad volumétrica y tiempo de fermentación (Fig. 4). Así mismo mencionan algunas de las estrategias moleculares utilizadas para incrementar su producción tales como: expresión de genes heterólogos involucrados en la producción de xilitol (XR y XDH), interrupción del gen XDH o inhibición de la actividad de la proteína, modificar la especificidad de la coenzima de XR, incrementar el transporte de xilosa expresando transportadores heterólogos, y finalmente, aumentar la disponibilidad de cofactor al sobreexpresar o deletar genes relevantes.

Microorganism	Xylose (g/L) (mentioned otherwise)	Xylitol (g/L)	Xylitol vol. productivity (g/L/h)	Fermentation Hours (h)
<i>Candida guilliermondii</i> FTI-20037	104	77.2	0.99	78
<i>Candida tropicalis</i>	150	131	2.91	45
<i>Candida boidinii</i> NRRL Y-17213	150	53.1	0.16	336
<i>Candida</i> sp.559-9	200	173	1.44	120
<i>Pichia</i> sp.	40	25	0.5	50
<i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-170	10	5.84	0.24	24
<i>Hansenula polymorpha</i>	125	58	0.60	96

**Figura 4. Levaduras principalmente estudiadas en la producción de xilitol.** (Pal et al., 2016).



### 1.3 Transporte de azúcar en microorganismos

La membrana citoplasmática (bicapa lipídica) que forma la barrera entre el citoplasma y el ambiente de todas la células, es esencialmente impermeable a la mayoría de la sustancias hidrofílicas (azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y algunos iones) las cuales son nutrientes importantes y metabolitos de las células. El transporte de estas sustancias a través de las membranas es catalizado por proteínas asociadas a la membrana. Debido a que la concentración de los nutrientes en el exterior de la célula puede ser menor que la concentración intracelular, se requieren mecanismos energéticamente acoplados al transporte para que los nutrientes puedan ser capturados del ambiente y transportados al interior de la célula (Romano 1986). Los azúcares entran a la célula por un mecanismo llamado difusión facilitada, en el cual las proteínas de la membrana disminuyen la energía de activación al proveer un camino alternativo a través de la bicapa lipídica. A este tipo de proteínas se les conoce como transportadores o permeasas (Nelson & Cox, 2008). Muestran una cinética de saturación y están sujetas a inhibición competitiva por análogos estructurales del sustrato (Romano 1986). Si la proteína transporta sólo un soluto se conoce como sistema uniporte, si se transportan dos solutos se denomina sistema cotransporte. Cuando el transporte de ambos solutos se da en direcciones opuestas se hace referencia a un antiportador, mientras que si se transportan dos solutos simultáneamente en la misma dirección se trata de un simportador (Nelson & Cox, 2008).

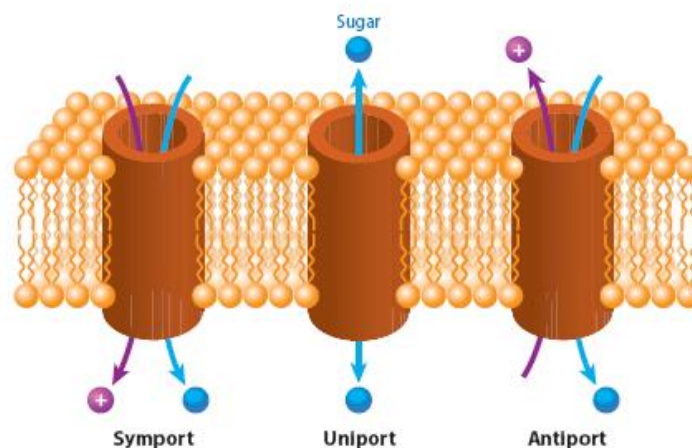


Figura 5. Mecanismos de transporte en eucariontes (Chen et al., 2015).

Los procesos de transporte están fuertemente acoplados al metabolismo intracelular, por lo que se encuentran sometidos a regulación por procesos metabólicos. De esta manera la maquinaria transportadora es, en la mayoría de los casos, el primer sitio de regulación metabólica (Romano 1986).

Los sistemas de transporte de un determinado azúcar dependen de la cepa, las condiciones de crecimiento, condiciones de experimentación y la naturaleza del carbohidrato. Bajo ciertas condiciones, es común encontrar dos procesos de transporte para el mismo azúcar operando en paralelo (Spencer-Martins 1994).

Los procesos de transporte de azúcares pueden ser descritos con analogía a una reacción enzimática en la cual el sustrato es el azúcar afuera de la célula, el producto es el azúcar adentro de la célula y la enzima es el transportador. Cuando la velocidad inicial de consumo del azúcar es medida como una función de la concentración externa del azúcar, la gráfica que resulta es hiperbólica. A mayores concentraciones externas del azúcar la velocidad del consumo se aproxima al valor de  $V_{m\acute{a}x}$ . La ecuación de velocidad para el transporte de azúcares puede ser derivada exactamente como aquella para las reacciones catalizadas por enzimas, lo cual da como resultado una expresión análoga a la ecuación de Michaelis-Menten (Eqn. 1).

$$V_o = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]_{out}}{K_t + [S]_{out}} \quad (1)$$

Donde:

$V_o$  es la velocidad inicial de acumulación del azúcar dentro de la célula cuando su concentración en el medio es  $[S]_{out}$ , y  $K_t$  ( $K_{transporte}$ ) es una constante análoga a la constante de Michaelis ( $K_m$ ), una combinación de constantes de velocidad que es característica de cada sistema de transporte.

Al igual que en las reacciones catalizadas por enzimas, la forma de pendientes interceptadas de la ecuación describe una gráfica de lineal de  $\frac{1}{V_o}$  contra  $\frac{1}{[S]_{out}}$ , de donde se pueden obtener los valores de  $K_t$  y  $V_{m\acute{a}x}$ . Cuando  $[S]_{out}=K_t$ , la velocidad de consumo o transporte es  $\frac{1}{2}V_{m\acute{a}x}$ ; el proceso de transporte esta semi-saturado (Nelson & Cox, 2008).

### 1.3.1 Transporte de xilosa

Se ha reportado un patrón común en *C. shehatae* (Lucas and van Uden 1986), *Rhodotorula glutinis* (Höfer and Misra 1978), *D. hansenii* (Nobre et al. 1999), *K. marxianus* (Stambuk et al., 2003) y *C. intermedia* (Gárdonyi et al., 2003; Leandro et al., 2006). Bajo represión por glucosa, las células presentan un transportador de baja afinidad xilosa/glucosa por difusión facilitada ( $K_m > 100$  mM) donde los genes involucrados son SUT1 (sugar transporter 1) en *P. stiptis* o GXF1 (glucose/xylose facilitator 1) en *C. intermedia*. Células cultivadas en xilosa y/o sin glucosa presentan un simportador azúcar/protón de alta afinidad. Entre los genes estudiados se encuentran GXS1 (glucose/xylose symporter 1) en *C. intermedia* PYCC 4715, XYLH en *D. hansenii* CBS767 (Jeffries & Jin 2004; Ghindea et al. 2010).

En teoría, estos dos tipos de transporte son llevados a cabo por distintas proteínas (Lucas and van Uden 1986, 1988) aunque aún existen dudas al respecto (Ferreira et al. 2013). En algunas levaduras se ha reportado la interconversión entre ambos tipos de transporte sin la necesidad de síntesis *de novo* (Spencer-Martins & van Uden 1985).

Para el caso de *S. cerevisiae*, la difusión facilitada de la xilosa se da por ayuda de las proteínas transportadoras codificadas por los genes HXT (hexose transporter). No obstante, el transporte es menos eficiente que el de glucosa, debido a que las proteínas codificadas por los genes XHT2, XHT6 y XHT7 manifiestan mayor afinidad por glucosa (Ghindea et al. 2010).

## 1.4 Levaduras

### 1.4.1 *Candida guilliermondii*

Esta levadura ascomiceta está altamente distribuida en el ambiente que forma parte de la piel humana y la microflora de la mucosa, y se considera patógena (Papon et al., 2013). Su especie teleomórfica es *Pichia guilliermondi* o *Meyerozyma guilliermondii* (Kurtzman and Suzuki 2010). Forma filamentos y pseudohifas dispersas (San Millán et al., 1997).

Esta levadura puede crecer en sustratos respiratorios, tales como etanol, glicerol, succinato o citrato. Es típicamente representativa de levaduras aeróbicas y no puede

crecer bajo condiciones estrictamente anaeróbicas. La temperatura promedio de crecimiento es de 30°C, siendo su límite 42°C (Papon et al., 2013). Las principales fuentes de carbono en las crece son D-xilosa, ribosa, ramnosa, melobiosa, lactosa, sorbosa y esculina (Savini et al. 2011). Es considerada una de las productoras más eficientes de xilitol (Canettieriet al., 2001) ya que es capaz de utilizar hidrolizados hemicelulósicos, obtenidos por hidrólisis ácida, como fuente de energía (Rodrigues et al. 2006). Representa también un organismo modelo para la sobreproducción de riboflavina (Abbas & Sibirny, 2011; Papon et al., 2013; Tanneret al., 1945).

### 1.4.2 *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* se ha colocado en el primer plano de la biología molecular y celular de organismos eucariontes por más de 100 años. Desde los años 70's se establecieron sus bases genéticas, bioquímicas y biología celular. Su importancia como organismo modelo fue incrementada al convertirse en el primer eucarionte en tener su genoma secuenciado en 1996 (Curran & Bugeja, 2014). Sus aplicaciones industriales más recientes, tales como la producción de bioetanol, enfrentan a *S. cerevisiae* con nuevos y muy específicos retos que difieren de aquellos presentes en muchas fermentaciones, esto incluye diferentes tipos de estrés ambiental y tolerancia a compuestos inhibitorios citotóxicos (Palmqvist & Hanh-Hägerdal, 2000; Almeida et al., 2007; Basso et al., 2011; Taylor et al., 2012). Desafortunadamente, el metabolismo de xilosa representa un reto único para esta levadura (Hector et al. 2011) debido a que carece de transportadores y enzimas que metabolizan y fermentan este azúcar (Hahn-Hägerdal et al., 2007).

La reducción de xilosa a xilitol en *S. cerevisiae* se ha logrado al transformar esta levadura con un plásmido que contiene el gen *xyl1* codificante para la enzima XR de *P.stiptis* (Walfridsson et al., 1995).

Décadas de investigación se han enfocado en mejorar las rutas catabólicas en *S. cerevisiae* recombinantes, pero muy pocos trabajos se han enfocado en el primer paso comprometido del proceso, el transporte de la xilosa, una importante limitación en la conversión eficiente de azúcares lignocelulósicos (Young et al., 2014).

### 1.4.3 *Debaryomyces hansenii*

*D. hansenii* puede definirse como una levadura hemiascomiceta (Prista et al., 2016). Según la taxonomía actual se distinguen dos variedades: *D. hansenii* var. *fabryi* y *D. hansenii* var. *hansenii*, con propiedades diferentes. Su anamorfo es *Candida famata* (Breuer and Harms 2006).

Encontrada en diversos hábitats, se caracteriza por una alta tolerancia al estrés salino (González-Hernández et al., 2006). Es capaz de metabolizar ácido láctico y cítrico, y se considera no patógena. La mayoría de las cepas son haploides (Lépingle et al. 2000). Es capaz de llevar a cabo respiración y fermentación (Norkrans 1968).

Es una de las levaduras con mejor producción de xilitol a partir de D-xilosa e hidrolizados de madera (hasta 106.7 g L<sup>-1</sup>) (Domínguez, 1998; Parajó et al., 1998; Sampaio et al., 2005; Tavares et al., 2000). Aunque la aireación durante la fermentación, parece jugar un papel importante en esta conversión (Roseiro et al., 1991; Sampaio et al., 2004) también ha mostrado habilidad para consumir simultáneamente ambos azúcares de una mezcla de glucosa/arabinosa y xilosa/arabinosa (Gírio et al., 2000; Tavares et al., 2000).

### 1.4.4 *Kluyveromyces marxianus*

*K. marxianus* es una levadura haploide, homotática, termotolerante y hemiascomiceta, relacionada filogenéticamente con *S. cerevisiae*. Se la suele encontrar en productos lácteos. *Candida kefyr* es su anamorfo (Llorente et al., 2000; Lachance, 1998).

Se han aislado cepas pertenecientes a este género de una gran variedad de hábitats, lo que resulta en una alta diversidad metabólica. Como consecuencia, se han investigado varias aplicaciones biotecnológicas para esta levadura, tales como: producción de enzimas ( $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucosidasa, inulasa y poligalacturonasas, entre otras.), proteínas unicelulares, compuestos aromáticos, etanol, reducción del contenido de lactosa en alimentos, biorremediación, agente anticolesterolémico y huésped para producción de proteínas (Fonseca et al., 2008).

Se clasifica como fermentativa-facultativa y Crabtree-negativa (van Dijken et al., 1993). Posee habilidad natural para secretar enzimas, principalmente aquellas que hidrolizan

pectinas (Hensing et al., 1994). Sin embargo, su actividad fermentativa a partir de xilosa es extremadamente baja comparada con la de glucosa (2.5 g L<sup>-1</sup> etanol en 72 h y 4.3 g L<sup>-1</sup> xilitol en 48 h) (Lertwattanasakul et al., 2015; Rodrussamee et al., 2011).

Algunas cepas de *K. marxianus* producen etanol arriba de los 40°C, teniendo un crecimiento máximo a 47°C, lo que reduce costos en su obtención industrial (Fonseca et al. 2008). En cuanto a la producción de xilitol, se han usado temperaturas hasta de 50°C, lo cual es otra ventaja al evitar que algún otro microorganismo crezca (Albuquerque et al., 2014; Nonklang et al., 2008).

#### 1.4.5 *Zygosaccharomyces bailii*

Levadura hemiascomiceta (James & Stratford, 2011), diploide (Mollapour & Piper, 2001; Rodrigues et al., 2004). Se considera una de las levaduras más peligrosas en tecnología alimentaria, debido a que sobrevive en ambientes altamente estresantes (Thomas and Davenport 1985). Es una levadura Crabtree-positiva, descrita como fructofílica (Pina et al., 2004).

En la industria vinícola, es responsable de importantes pérdidas económicas por su capacidad de re-fermentar los vinos dulces y de crecer y formar sedimentos en vinos secos, particularmente en los vinos blancos. No es capaz de competir contra *S. cerevisiae* por su baja velocidad de crecimiento en las fermentaciones alcohólicas de uvas; sin embargo, resiste altas concentraciones de alcohol, bajos pH, ácidos débiles tóxicos (Malfeito-Ferreira et al., 1990) y altas concentraciones de glucosa (de hasta 60% p/v) (Pitt & Hocking, 2009).

El género *Zygosaccharomyces* es conocido por tener una ruta de pentosas fosfato más desarrollada en comparación con *Saccharomyces* (Brown, 1990). Sin embargo, la conversión de xilulosa a etanol en cepas de *Z. bailii* bajo condiciones anaeróbicas da como resultado rendimientos de 0.15 C-mmol de etanol / C-mmol de xilulosa (87 C-mmol L<sup>-1</sup>), mientras que el rendimiento de xilitol es de hasta 0.57 C-mmol / C-mmol produciendo 336 C-mmol L<sup>-1</sup> (Eliasson et al. 2000).

### 1.4.6 *Clavispora lusitaniae*

Rodrigues de Miranda en 1979, define al género *Clavispora* y la especie tipo *Clavispora lusitaniae* por la formación de ascosporas claviformes desconocidas hasta entonces en levaduras. Es una especie heterotálica con estado haploide. El cultivo tiene apariencia brillante, color crema, suave y liso y forma un pseudo-micelio. Se diferencia del género *Kluyveromyces* en su independencia de vitaminas y su producción de coenzima Q8 (Yamada & Kondo, 1972). Especie anamorfa de *Candida lusitaniae* (Lachance & Phaff, 2011).

Se ha detectado recientemente en varias especies de *Agave* y durante las fermentaciones de mostos de esta planta (Lachance 1995; Lappe-Oliveras et al. 2008; Kurtzman and Fell 2011). Es una especie saprofita y fermentativa. Se ha asociado con especímenes clínicos de pacientes inmunocomprometidos y se reconoce ahora como un organismo infeccioso oportunista (De Hoog et al., 2000; Pérez-Brito et al., 2015).

En algunas especies se ha encontrado que no producen cantidades significativas (menos de 0.1 g L<sup>-1</sup>) de etanol a partir de D-xilosa. No se ha reportado producción de xilitol (Nigam et al., 1985).

## 2 Hipótesis

Las levaduras de los géneros *Candida*, *Debaromyces*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces* y *Clavispora* a diferencia de *Saccharomyces sp.*, presentarán transporte eficiente de xilosa, así como mejores rendimientos de producción de xilitol y/o etanol.

## 3 Justificación

El uso de cultivos agrícolas para la producción de bioetanol compite con la producción alimenticia, lo cual crea una demanda de tecnologías que permitan la producción de bioetanol de plantas no alimenticias y residuos de biomasa lignocelulósica tales como pasto, paja y madera (Hou, 2012). Producir etanol a partir de pentosas se ha propuesto recientemente, pero a pesar de los múltiples esfuerzos de varios laboratorios alrededor del mundo, continúa siendo problemática (Jeffries & Jin, 2000). Al recurrir a la fermentación microbiana para la obtención de biocombustible es común encontrarse con productos secundarios que afectan los rendimientos finales, tales como el xilitol. Éste es un endulzante artificial que debido a sus aplicaciones farmacéuticas y alimenticias ha llamado la atención de industrias en años recientes (Pal et al., 2013). Los principales obstáculos en la obtención de etanol y/o xilitol con levaduras son los ineficientes sistemas transportadores de xilosa, la baja o nula expresión de las enzimas involucradas en dicha ruta metabólica, así como el desequilibrio redox en el interior de las células (Pal et al., 2016). El análisis de diferentes géneros de levaduras permite identificar nuevas posibilidades y opciones de transformación y aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos que no necesariamente involucren a la levadura modelo.



## 4 Objetivos

### 4.1 Objetivo General

Caracterizar y comparar el transporte y asimilación de glucosa y xilosa en diferentes géneros de levadura.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Observar la asimilación de las diferentes fuentes de carbono para cada levadura.
- Analizar los parámetros cinéticos de cada género, tanto en glucosa como xilosa a pH 4 y pH 6 tales como:
  - Velocidad máxima específica de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ )
  - Producción de biomasa ( $Y_{X/S}$ )
  - Producción de etanol ( $Y_{P/S \text{ Et}}$ )
  - Producción de xilitol (a partir de xilosa) ( $Y_{P/S \text{ Xil}}$ )
- Comparar los valores de  $K_m$  y  $V_{\text{máx}}$  para el transporte de glucosa y xilosa a pH 4 y 6 en las diferentes levaduras.
- Medir los cambios de pH del medio en presencia de xilosa para elucidar si se trata de un simportador  $H^+$ /xilosa en las diferentes especies.
- Observar la aparición de NADH en presencia de glucosa y xilosa.
- Cuantificar el consumo de oxígeno en presencia de glucosa/xilosa en cada levadura.

## 5 Metodología

### 5.1 Microorganismos

Se trabajó con los siguientes géneros de levaduras:

- *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075 USDA (control positivo)
- *Saccharomyces cerevisiae* ITM-2014 (control negativo)
- *Debaryomyces hansenii* ATTC Y-7426
- *Kluyveryomyces marxianus*
- *Zygosaccharomyces bailii*
- *Clavispora lusitaniae*

Se conservaron en agar YPD a 4°C con resiembra cada 4 semanas.

### 5.2 Medios de cultivo

- YPD: 1 % extracto de levadura, 2 % peptona de gelatina, 2 % glucosa, 2 % agar para medio sólido.
- YPX: 1 % extracto de levadura, 2 % peptona de gelatina, 2 % xilosa\*, 2 % agar para medio sólido.
- SD (G/X): 6.7 g L<sup>-1</sup> YNB (sin aminoácidos), 5 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 g L<sup>-1</sup> fuente de carbono (glucosa/xilosa ambas filtradas por esterilización). 2% agar para medio sólido.
- YPD/YPX pH 4 (Tartárico-HCl 50 mM): se preparó medio YPD/YPX y se adicionaron 9.7 g de sal de ácido tartárico por litro de medio. El pH se ajustó con HCl 1:10.
- YPD/YPX pH 6 (MES-TEA 50 mM): se preparó medio YPD/YPX y se adicionaron 9.762 g de MES por litro de medio. El pH se ajustó con TEA 50%.

Los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 minutos.

\*La temperatura de caramelización de la xilosa es 95°C. Para evitarla al esterilizar en autoclave (121°C), se preparó una solución de xilosa (≥99%, Sigma-Aldrich®) al 20 % y se esterilizó por filtración (Stericup Milipore® 0.22 µm) para uso posterior.

### **5.3 Asimilación de la fuente de carbono (Serial Drop Test)**

Para verificar la asimilación de las diferentes fuentes de carbono (glucosa y xilosa) se prepararon cajas con agar YPD/YPX/SD G/ SD X.

En 100 mL de medio YPD/YPX se inoculó una asada de cada levadura y se dejaron en agitación a 250 rpm durante 24 h. A continuación se centrifugaron y lavaron 2 veces con agua destilada estéril. Se cuantificó su crecimiento en el espectrofotómetro a 600 nm y se preparó 1 mL de una dilución a 0.1 abs ( $10^6$  cel mL<sup>-1</sup>) de cada una. Se colocaron en una placa con pozos y se realizaron diluciones seriadas ( $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  cel mL<sup>-1</sup>). Se sumergió un sello en las diluciones y se colocó sobre las cajas con los diferentes medios. Se dejaron en incubación a 30°C por 48 h.

### **5.4 Cinéticas de crecimiento**

#### **5.4.1 Curvas de crecimiento y velocidad específica máxima de crecimiento**

Para el preinóculo se colocó en 50 mL de medio YPD/YPX una asada de cada levadura en matraces diferentes. Se dejaron 12-24 horas en agitación continua (250 rpm) a 30°C.

Con los medios SD G y SD X se utilizó el Bioscreen C para cuantificar el aumento en la absorbancia a 600 nm de cada levadura en los distintos medios. A partir del pre inóculo se obtuvo un valor de 0.03 para comenzar las cinéticas. Se realizaron las lecturas de absorbancia cada 2 h durante 36 h.

Debido a los requerimientos de oxígeno de varias especies, las cinéticas de crecimiento en medios YPD y YPX se realizaron con un fotocolorímetro Klett-Summerson donde se inoculó en 100 mL de medio para obtener una absorbancia inicial de 0.1 ( $\approx$  50 unidades Klett). Se tomaron lecturas cada 2 horas durante 36 horas o hasta alcanzar las 600 unidades Klett ( $\approx$ 1.2 unidades de absorbancia).

Las curvas de crecimiento se realizaron con el software GraphPadPrism 6. Con las cuales se calculó la velocidad específica de crecimiento en función de la absorbancia.

## 5.4.2 Cuantificación de biomasa

Se tomó una muestra de 5 mL al inicio y la final de las cinéticas para determinar biomasa por peso seco, peso húmedo, conteo celular y absorbancia, con el fin de determinar los rendimientos de producción de etanol y xilitol.

### 5.4.2.1 Peso seco

Se tomó 1 mL de muestra y se centrifugaron a 13000 rpm durante 1 min. El sobrenadante se desechó y la biomasa se lavó dos veces con agua destilada estéril. Finalmente se resuspendió la pastilla con 1 mL de agua destilada. Se colocaron 500  $\mu$ L de cada muestra en una charola llevada previamente a peso constante y se dejó en una estufa a 100°C por 24 h. Se realizó por duplicado para cada muestra.

### 5.4.2.2 Peso húmedo

Las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 1 min. El sobrenadante se desechó y la biomasa se dejó secar a temperatura ambiente. Se pesaron los tubos conteniendo únicamente la pastilla sin resuspender.

### 5.4.2.3 Conteo celular

Se lavaron las muestras con PBS\* con K<sup>+</sup> dos veces, se resuspendieron en el mismo buffer en diluciones de 1:20 para el tiempo inicial y de 1:200 para tiempo final. Las células se sonicaron durante 15 s a 30 V para deshacer los agregados, y se contaron con un contador de células Scepter 2.0 de Millipore® con un sensor de 40  $\mu$ m. Los resultados se analizaron y procesaron con el Scepter Software Pro 2.1®.

\*PBS 1X pH 7.4. 1 L de solución:

- NaCl	8 g
- KCl	0.22 g
- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	1.44 g

- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0.24 g

#### 5.4.2.4 Absorbancia

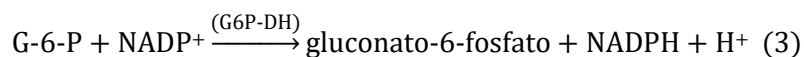
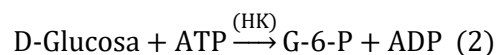
Se diluyó la muestra del tiempo inicial 1:2 y del tiempo final 1:100 en medio líquido YPD para tomar lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro a 600 nm.

#### 5.4.3 Consumo de sustrato

Las muestras se centrifugaron, se desechó la pastilla de biomasa y se conservó el sobrenadante en tubos estériles a 4°C para su posterior análisis.

##### 5.4.3.1 Glucosa

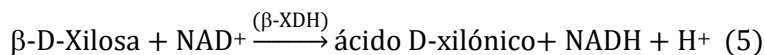
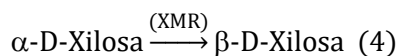
Para cuantificar la cantidad de glucosa en el medio se utilizó un kit enzimático de Megazyme con el cual la glucosa presente en el medio es fosforilada por una hexocinasa (HK) y ATP a glucosa-6-fostato con la formación simultánea de ADP (2). En presencia de la enzima glucosa-6-fostato deshidrogenasa (G6P-DH), la G-6-P es oxidada por NADP<sup>+</sup> a gluconato-6-fostato con la formación de NADPH (3). La cantidad de NADPH formado es estequiométricamente igual a la cantidad de D-glucosa. El NADPH se mide por el aumento de absorbancia a 340 nm (Bergmeyer et al., 1986).



##### 5.4.3.2 Xilosa

Para cuantificar la cantidad de xilosa en el medio se utilizó también un kit enzimático de Megazyme con el cual se transforma  $\alpha$ -D-xilosa a  $\beta$ -D-xilosa con xilosa mutarrotasa (XMR) (4). La  $\beta$ -D-xilosa es oxidada por NAD<sup>+</sup> a ácido D-xilónico en presencia de  $\beta$ -xilosa deshidrogenasa ( $\beta$ -XDH) (5). La cantidad de NADH formado es estequiométrica con la

cantidad de D-xilosa. El NADH se mide por el aumento de absorbancia a 340 nm (Bergmeyer et al., 1986).



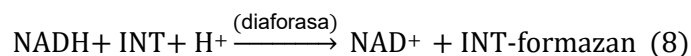
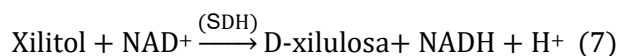
#### 5.4.4 Producción de etanol y xilitol

La producción de etanol y xilitol se cuantificó bajo las mismas condiciones de toma de muestra para el consumo de sustrato.

Para cuantificar el etanol producido se utilizó alcohol deshidrogenasa (ADH) (6) para oxidar el etanol a acetaldehído logrando la producción de NADH cuyo incremento se mide a 340 nm (Bergmeyer et al., 1986).



El xilitol se cuantificó utilizando un kit enzimático de Megazyme con el que se oxida el xilitol a D-xilulosa en presencia de sorbitol deshidrogenasa (SDH) (7). Posteriormente, en presencia de diaforasa, el NADH formado reduce el cloruro de iodonitrotetrazolio (INT) a un compuesto INT-formazan (8). La cantidad de INT-formazan formado es estequiométrica a la cantidad de xilitol. Se cuantifica por el incremento de absorbancia a 492 nm (Bergmeyer et al., 1986).



Se realizó un análisis estadístico one-way ANOVA con  $p < 0.05$  en el software GraphPad Prism 6 para comparar si los valores obtenidos presentaron diferencia significativa entre ellos.

## 5.5 Acumulación y transporte de glucosa y xilosa

Para los ensayos de acumulación y cinéticas de transporte de azúcares se utilizaron como marcadores  $^{14}\text{C}$ -glucosa y  $^{14}\text{C}$ -xilosa.

Cada una de las levaduras se incubó por 24 h en medio YPD (transporte glucosa) y YPX (transporte xilosa). Posteriormente, se lavaron las células con agua y se dejaron en ayuno con agua y agitación por 12 h. Al término del ayuno se centrifugaron y se resuspendieron con agua a una concentración de  $500 \text{ mg ml}^{-1}$  (peso húmedo). Se utilizó buffer tartárico-HCl 20 mM pH 4 o MES-TEA a 20 mM pH 6.

Se adicionó en tubos:  $^{14}\text{C}$ -glucosa o  $^{14}\text{C}$ -xilosa 1 mM, buffer y agua completando el volumen a 2 mL. La reacción se inició agregando 10 mg de levadura. Se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de cada muestra a distintos tiempos (0, 0.5, 1, 2, 4, 10 20 min) y se pasaron por un filtro de celulosa (Millipore, 0.45 mm HAWP) lavando con una solución de glucosa o xilosa 10 mM.

Se graficó la velocidad de acumulación contra el tiempo de la reacción. Las curvas de acumulación de azúcares se realizaron con el software GraphPadPrism 6.

Para cuantificar los parámetros cinéticos del transporte de azúcares, se utilizó la misma metodología de lavado y preparación de las células que en el apartado anterior. Los tubos para cada levadura se prepararon con buffer y  $^{14}\text{C}$ -glucosa o  $^{14}\text{C}$ -xilosa a diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1.0 y 2.0 mM), completando el volumen a 1 mL con agua. La reacción se inició al adicionar 10 mg de levadura. A los 5 minutos de iniciada la reacción, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de cada tubo y se pasaron por un filtro de celulosa (Millipore 0.45 mm HAWP) lavando con una solución de glucosa o xilosa 10mM.

Los filtros con la muestra se colocaron en viales, adicionándoles 5 ml de líquido de centelleo (Para 1 L: 257 ml de tritón X-100, 37 ml de etilenglicol, 106 ml de etanol y 600 ml de xileno). Se llevó a cabo la lectura en el "Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2910 TR. Perkin Elmer".

La velocidad de transporte de ambos azúcares fue graficada contra las concentraciones de sustrato utilizadas y ajustadas por regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-

Menten de un solo componente. Se obtuvieron valores de  $V_{\text{máx}}$  y  $K_m$  ( $K_t$ ) mediante el software GraphPad Prism 6.

## 5.6 Estimación de NADH

A levaduras previamente crecidas en YPD o YPX durante 20-24 horas y ayunadas por 24 horas, se midió los niveles de NADH en presencia de los diferentes azúcares (glucosa y xilosa) utilizando un espectrofluorómetro (SLM-Olis). Siguiendo el protocolo de Peña *et al.* (2015): en una celda se colocaron 10 mM de buffer MES-TEA pH 6 en un volumen final de 2 mL, 200  $\mu\text{M}$  NaCN y 30  $\mu\text{M}$  octil galato. A los 20 segundos se adicionaron 50 mg (al 50%) de células. Pasados 50 segundos se agregaron los azúcares (glucosa/xilosa) a 20 mM. El trazo se siguió 300 s.

## 5.7 Consumo de oxígeno

Bajo las mismas condiciones de la cuantificación de NADH se siguió el consumo de oxígeno con un electrodo de oxígeno Clark en una cámara cerrada mantenida a 30°C con un baño a temperatura y agitación constante, conectado a un sistema de adquisición de datos. En la cámara se colocaron 10 mM de buffer MES-TEA pH 6, 40 mM glucosa/xilosa en un volumen final de 5 mL. A los 20 segundos se agregaron 50 mg de células (al 50%), a los 100 segundos 200  $\mu\text{M}$  de NaCN y a los 150 segundos 30  $\mu\text{M}$  de octil galato. Los valores de oxígeno se reportaron como  $\text{natg O}$  (nanoátomos gramo) de oxígeno, considerando que la concentración en la altitud de la Ciudad de México es de 400  $\text{natg O mL}^{-1}$  en volumen final de 5 mL (Peña *et al.*, 2015; Sánchez *et al.*, 2006; 2008).

## 5.8 Alcalinización del medio (Cambios de pH)

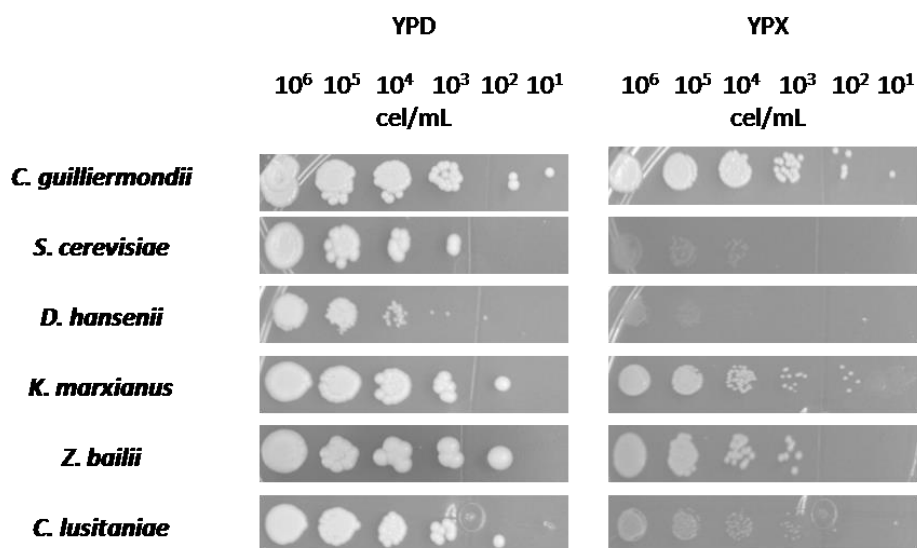
Para observar los cambios del pH en el medio (alcalinización debido al funcionamiento del simportador  $\text{H}^+$ /xilosa), basados en las técnicas descritas por Misra & Höfer (1975), Deak (1978) y Peña *et al.* (2015) se utilizó un electrodo conectado a un pHmetro y a una computadora para la obtención de los datos. En una cámara de vidrio con un volumen final de 10 mL, se adicionaron 9.5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . Pasados 10 segundos se adicionaron 100 mg de células y a los 100 segundos se adicionó el azúcar correspondiente (glucosa/xilosa) a una concentración final 1 mM. El trazo se siguió por 250-300 s.



## 6 Resultados

### 6.1 Asimilación de las fuentes de carbono

Como una primera prueba de la posible utilización de la xilosa por las distintas especies, se observó el crecimiento en placas en diferentes medios, utilizando como sustratos glucosa y xilosa.



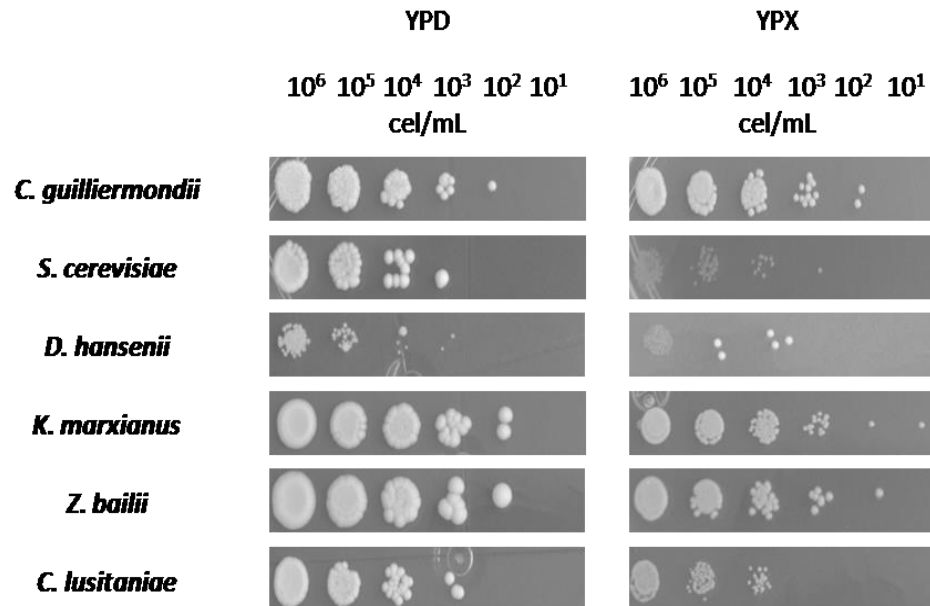
**Figura 6. Crecimiento en glucosa y xilosa con inóculo de 24 h en YPD.** A partir de cultivos de 24 h en medio líquido YPD se realizaron diluciones seriadas en agua destilada  $10^6 - 10^1 \text{ cel mL}^{-1}$ . Se colocaron en agar YP con glucosa o xilosa y se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  por 48 h.

El inóculo se puso en medio líquido YPD durante 24 h para asegurar el crecimiento previo al experimento. Aunque la temperatura óptima de crecimiento de algunas cepas no es  $30^\circ\text{C}$ , las 6 cepas presentan crecimiento en ambos medios. Sin embargo, en medio YPX, todas presentaron menor crecimiento, excepto *C. guilliermondii* (Fig. 6).

Al observar que las cepas crecían en medio YPX hasta las 48 horas, se decidió poner el inóculo directamente en medio líquido YPX, esperando que se llevara a cabo la adaptación de las cepas al medio con xilosa y hubiera un mayor crecimiento.

En la Figura 7 se muestra el crecimiento de todas las cepas en medio YPD y YPX. *C. lusitaniae* incrementó su crecimiento en YPX a partir del inóculo previo en medio con

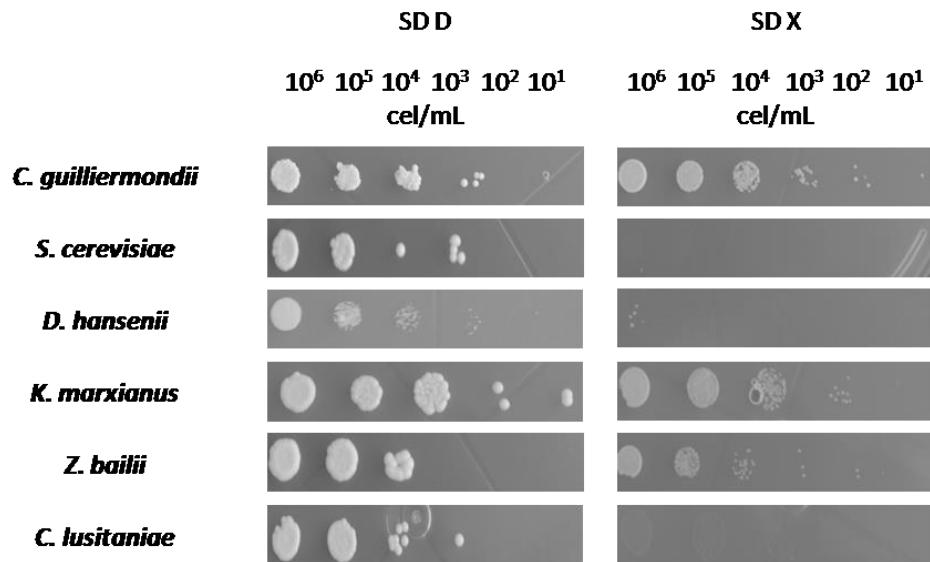
xilosa, mientras que *D. hansenii* y *S. cerevisiae* presentaron menor número de colonias en comparación con las otras levaduras.



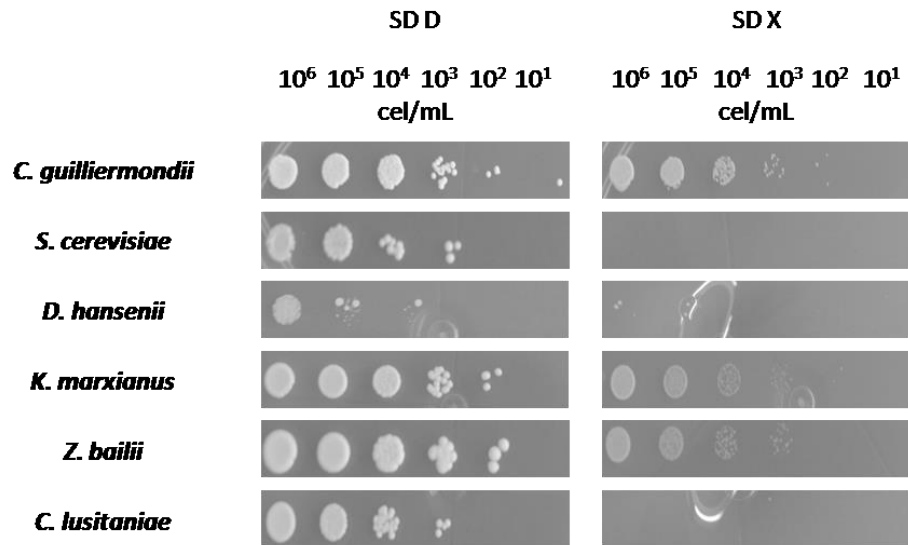
**Figura 7. Crecimiento en glucosa y xilosa con inóculo de 24 h en YPX.** A partir de cultivos de 24 h en medio líquido YPX se realizaron diluciones seriadas en agua destilada  $10^6 - 10^1$  cel mL<sup>-1</sup>. Se colocaron en agar YP con glucosa o xilosa y se incubaron a 30°C por 48 h.

Debido a que está reportado que *S. cerevisiae* no crece en presencia de xilosa, se realizó el mismo experimento pero en medio mínimo SD sin aminoácidos para comprobar que fuera el azúcar la principal fuente de carbono y no otros componentes del medio YP.

En los medios mínimos con glucosa a partir de los diferentes inóculos sí hubo crecimiento de todas las cepas; sin embargo, para *D. hansenii* fue menor (Fig. 8). En el medio mínimo con xilosa, no hubo crecimiento para las cepas de *D. hansenii*, *C. lusitaniae* y *S. cerevisiae* sin importar de qué inóculo provinieran (Fig. 8 y Fig. 9).

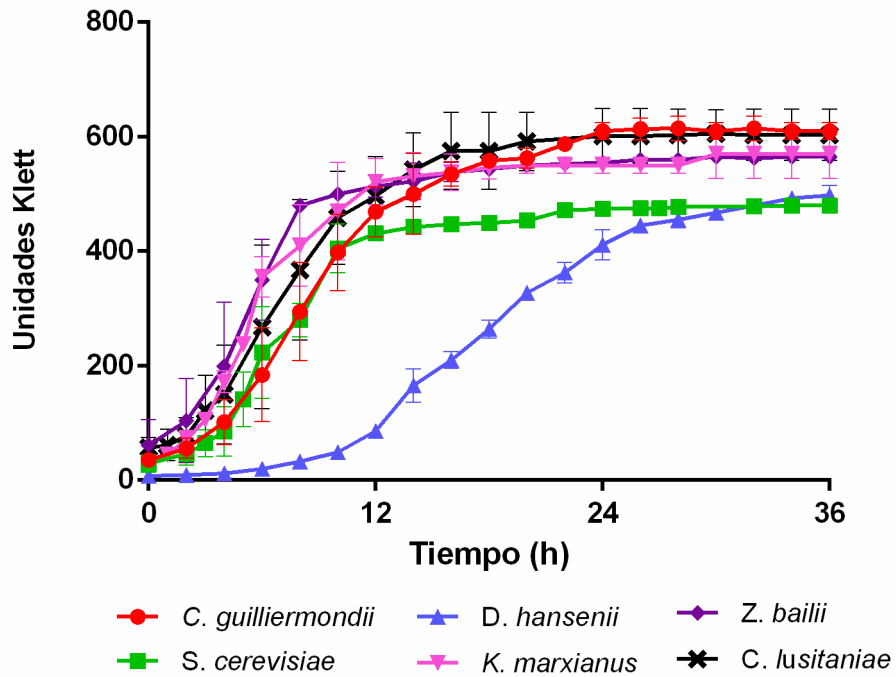


**Figura 8. Crecimiento en glucosa y xilosa en medio mínimo con inóculo de 24 h en YPD.** A partir de cultivos de 24 h en medio líquido YPD se realizaron diluciones seriadas en agua destilada  $10^6 - 10^1 \text{ cel mL}^{-1}$ . Se colocaron en agar de medio mínimo SD con glucosa o xilosa y se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  por 48 h.



**Figura 9. Crecimiento en glucosa y xilosa en medio mínimo con inóculo de 24 h en YPX.** A partir de cultivos de 24 h en medio líquido YPX se realizaron diluciones seriadas en agua destilada  $10^6 - 10^1 \text{ cel mL}^{-1}$ . Se colocaron en agar de medio mínimo SD con glucosa o xilosa y se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  por 48 h.

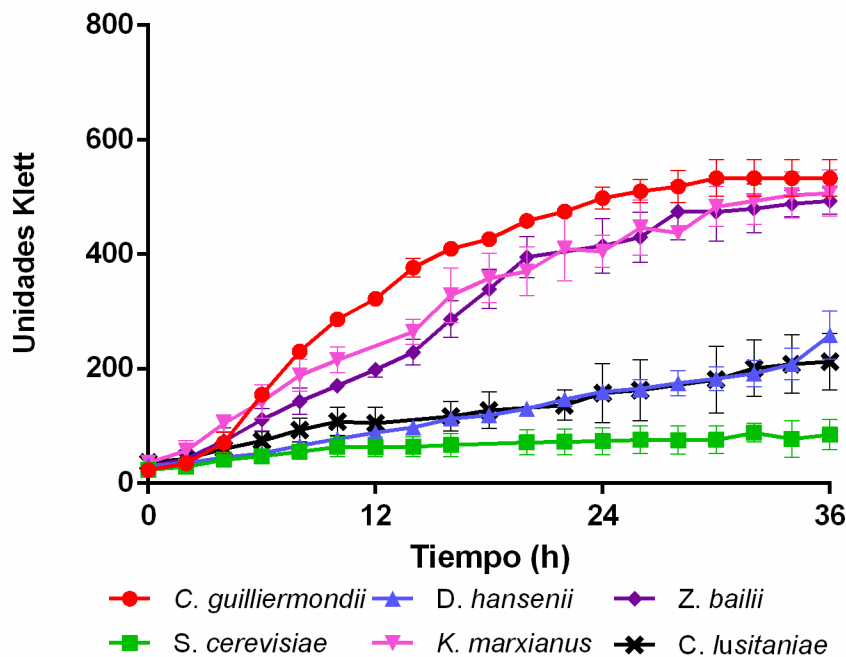
## 6.2 Cinéticas de crecimiento



**Figura 10. Curvas de crecimiento en medio YPD.** Las curvas de crecimiento se realizaron con lecturas en fotocolorímetro Klett-Summerson durante 36 h a 30 °C y 250 rpm con mediciones cada 2 h. Lectura inicial 50 unidades Klett = 0.1 abs a 600 nm. n=3 Gráficas obtenidas con el software GraphPadPrism 6.

En las curvas de crecimiento en YPD realizadas con el colorímetro Klett-Summerson, la mayoría de las cepas alcanzaron la fase estacionaria alrededor de las 8 horas (Fig. 10). A *D. hansenii* le tomó aproximadamente 20 h. *K. marxianus* presentó la mayor velocidad de crecimiento, seguida por *C. lusitaniae*, *Z. bailii*, *S. cerevisiae*, *C. guilliermondii* y finalmente *D. hansenii* con la menor velocidad de crecimiento (Tabla 1).

Para el caso de las curvas en medio YPX (Fig. 11), *C. guilliermondii*, *K. marxianus* y *Z. bailii* se distinguen como las levaduras con mayor crecimiento, en comparación con *D. hansenii*, *C. lusitaniae* y *S. cerevisiae*.



**Figura 11. Curvas de crecimiento en medio YPX.** Las curvas de crecimiento se realizaron con lecturas en fotocolorímetro Klett-Summerson durante 36 h a 30 °C y 250 rpm con mediciones cada 2 h. Lectura inicial 50 unidades Klett = 0.1 abs a 600 nm. n=3. Gráficas obtenidas con el software GraphPadPrism 6.

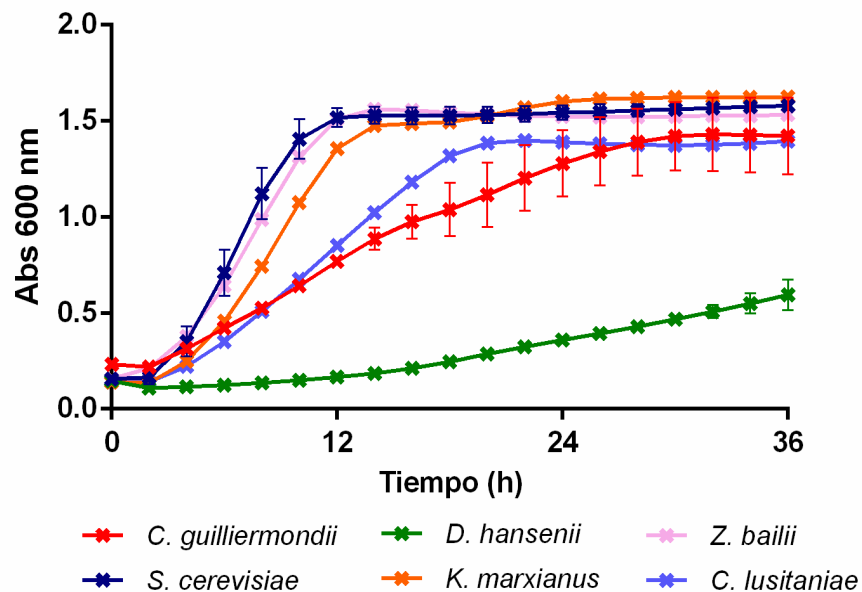
La velocidades de crecimiento en medio YPX de *C. guilliermondii* ( $0.715 \text{ h}^{-1}$ ) y *D. hansenii* ( $0.447 \text{ h}^{-1}$ ) fueron muy similares a las velocidades en YPD ( $0.754 \text{ h}^{-1}$  y  $0.445 \text{ h}^{-1}$ ); no obstante, fueron *K. marxianus* ( $0.738 \text{ h}^{-1}$ ) y *Z. bailii* ( $0.734 \text{ h}^{-1}$ ) las de mayor velocidad para medio YPX. *S. cerevisiae* y *C. lusitaniae* disminuyeron la velocidad en un 50% en comparación con la velocidad de crecimiento en YPD (Tabla 1).

**Tabla 1. Velocidades máximas de crecimiento en medios YPD y YPX.**

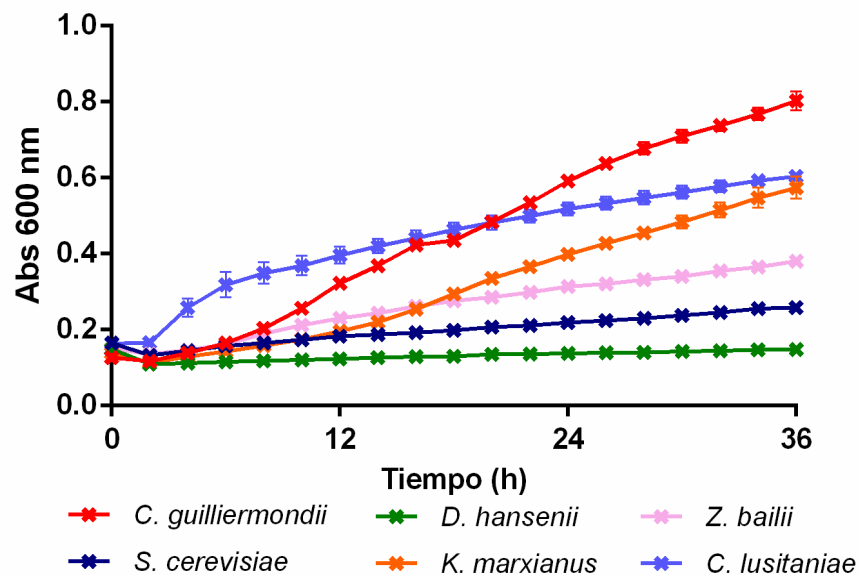
Cepa	$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	
	YPD	YPX
<i>C. guilliermondii</i>	$0.754 \pm 0.06$	$0.715 \pm 0.08$
<i>S. cerevisiae</i>	$0.882 \pm 0.07$	$0.449 \pm 0.06$
<i>D. hansenii</i>	$0.445 \pm 0.16$	$0.447 \pm 0.09$
<i>K. marxianus</i>	$1.201 \pm 0.20$	$0.738 \pm 0.09$
<i>Z. bailii</i>	$0.973 \pm 0.13$	$0.734 \pm 0.02$
<i>C. lusitaniae</i>	$1.011 \pm 0.13$	$0.483 \pm 0.07$

n=3

Las curvas de crecimiento con medios mínimos se realizaron en el equipo Bioscreen C (Fig. 12-13). Para el caso de la glucosa, se puede apreciar que *S. cerevisiae*, *Z. bailii* y *K. marxianus* alcanzaron la fase estacionaria a las 10-12 h, el doble de tiempo que les tomó en medio YPD. *C. lusitaniae* terminó su fase exponencial a las 20 h, mientras que *C. guilliermondii* llegó a la misma densidad óptica que las anteriores hasta las 26 horas. *D. hansenii* presentó poco crecimiento en ambos medios. En medio mínimo con xilosa, el crecimiento fue diez veces menor para todas las levaduras. *C. guilliermondii* alcanzó la densidad óptica más alta a las 36 h (0.8), seguida de *C. lusitaniae* y *K. marxianus* con valores de 0.6 y 0.56, respectivamente. *Z. bailii* y *S. cerevisiae* alcanzaron una densidad óptica final menor a las anteriores (0.38 y 0.258). Al igual que en medio mínimo con glucosa, *D. hansenii* fue la levadura con menor crecimiento.



**Figura 12. Curvas de crecimiento en medio mínimo con glucosa.** Las curvas de crecimiento se realizaron con lecturas en Bioscreen C durante 36 h con mediciones cada 2 h. Lectura inicial 0.3= 0.1 abs a 600 nm. n=4 Gráficas obtenidas con el software GraphPadPrism 6.

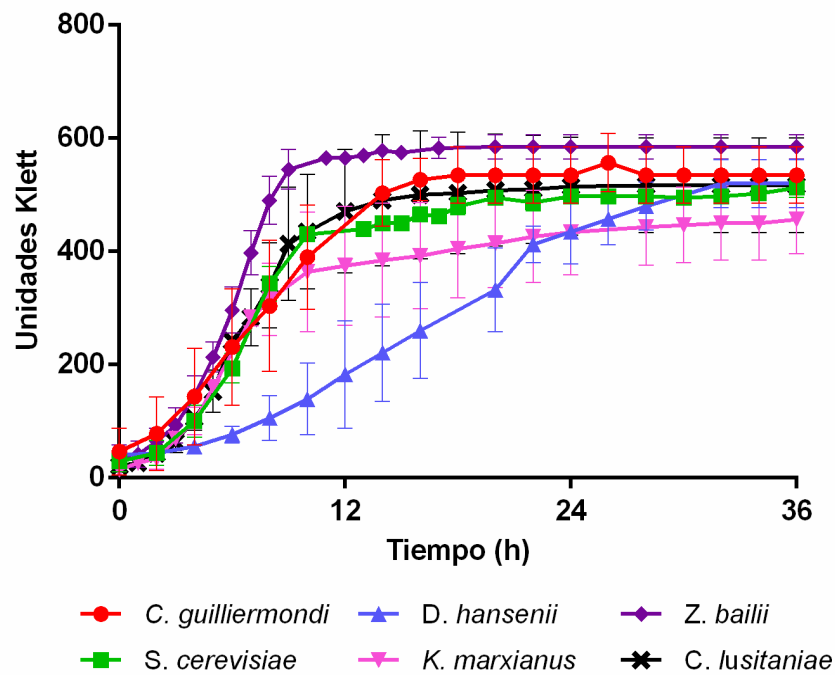


**Figura 13. Curvas de crecimiento en medio mínimo con xilosa.** Las curvas de crecimiento se realizaron con lecturas en Bioscreen C durante 36 horas con mediciones cada hora. Lectura inicial 0.3 = 0.1 abs a 600 nm. n=4 Gráficas obtenidas con el software GraphPadPrism 6.

### 6.3 Parámetros cinéticos a diferentes pHs

Para saber si la entrada de azúcares en las células era promovida por un pH bajo y si ésta tenía un efecto en el crecimiento en medio líquido, se realizaron cinéticas de crecimiento en medio YPD y YPX con pH ajustado a 4 y 6. Las curvas de crecimiento se realizaron siguiendo la misma metodología que en el apartado anterior, utilizando un fotocolorímetro Klett-Summerson con lecturas cada dos horas y tomando muestra en los intervalos indicados para analizar el consumo de sustrato y la producción de etanol y xilitol.

Las curvas de crecimiento en YPD a los diferentes pHs (Figs. 14-15) no mostraron diferencia en comparación con el medio YPD sin ajuste de pH (Fig. 10). El comportamiento de las diferentes levaduras fue similar y las fases de crecimiento definidas. *D. hansenii* fue la levadura con la menor densidad óptica a las 36 horas. Las velocidades de crecimiento de *C. guilliermondii*, *S. cerevisiae*, *D. hansenii* y *K. marxianus* fueron ligeramente mayores a pH 6; mientras que para *Z. bailii* y *C. lusitaniae* fueron mayores a pH 4 (Tabla 2). Sin embargo, la diferencia entre las velocidades no es considerable para probar que algún valor de pH favorece el crecimiento en medio YPD.



**Figura 14. Curvas de crecimiento en YPD pH 4.** Se incubaron a 30°C y 250 rpm por 36 horas tomando lectura en Fotocolorímetro Klett-Summerson cada 2 horas. Se ajustó el pH del medio con tartárico-HCl 50 mM. n=3 Gráficas obtenidas con el software GraphPadPrism 6.

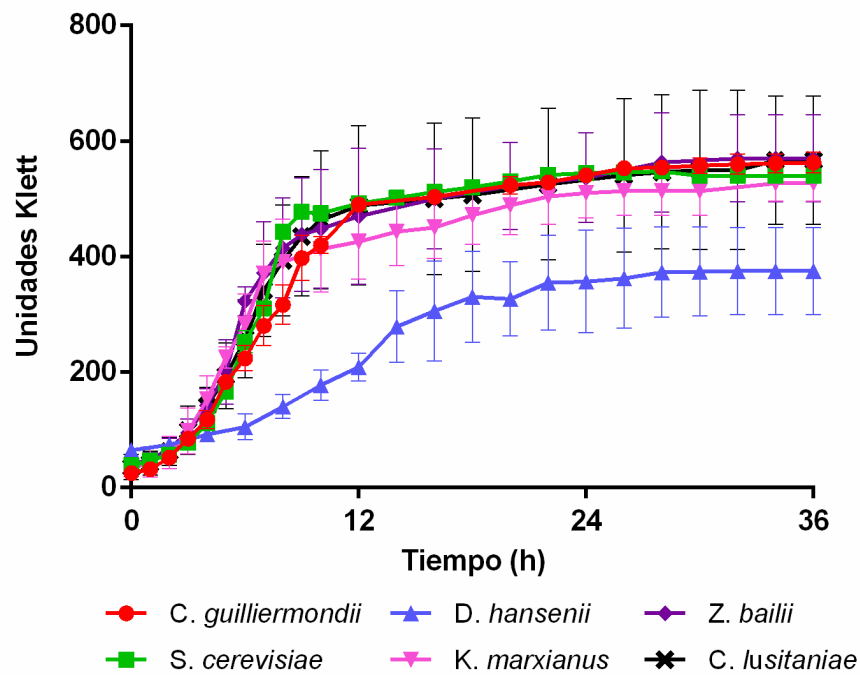
Así mismo, con los valores de peso seco en 36 h se obtuvo la cantidad de biomasa máxima producida en medio YPD (Tabla 3) los cuáles van desde 2.7 g L<sup>-1</sup> hasta 6.1 g L<sup>-1</sup> sin que exista diferencia significativa entre alguna levadura a ninguno de los pHs utilizados.

**Tabla 2. Velocidades máximas de crecimiento en YPD pH 4 y pH 6.**

Cepa	$\mu_{\text{máx}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	
	pH 4	pH 6
<i>C. guilliermondii</i>	0.863 ± 0.05	1.093 ± 0.20
<i>S. cerevisiae</i>	0.836 ± 0.10	0.901 ± 0.08
<i>D. hansenii</i>	0.574 ± 0.18	0.595 ± 0.15
<i>K. marxianus</i>	0.969 ± 0.10	1.026 ± 0.12
<i>Z. bailii</i>	1.017 ± 0.25	0.856 ± 0.13
<i>C. lusitaniae</i>	0.979 ± 0.07	0.862 ± 0.07

n=3





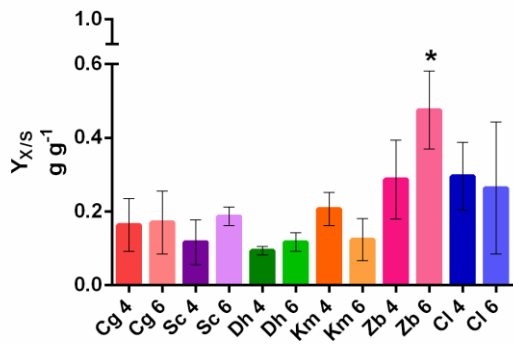
**Figura 15. Curvas de crecimiento en YPD pH 6.** Se incubaron a 30°C y 250 rpm por 36 horas tomando lectura en Fotocolorímetro Klett-Summerson cada 2 horas. Se ajustó el pH del medio con MES-TEA 50 mM. n=3 Gráficas obtenidas con el software GraphPadPrism 6.

**Tabla 3. Biomasa máxima producida en 36 h en YPD pH 4 y 6.**

Cepa	$X_{\text{máx}}$ (g L <sup>-1</sup> )	
	pH 4	pH 6
<i>C. guilliermondii</i>	4.906 ± 1.79	5.366 ± 2.23
<i>S. cerevisiae</i>	4.333 ± 2.44	5.500 ± 0.91
<i>D. hansenii</i>	2.700 ± 0.55	3.400 ± 0.81
<i>K. marxianus</i>	3.066 ± 1.66	3.366 ± 1.06
<i>Z. bailii</i>	6.100 ± 2.44	3.766 ± 2.82
<i>C. lusitaniae</i>	3.600 ± 1.13	4.150 ± 0.07

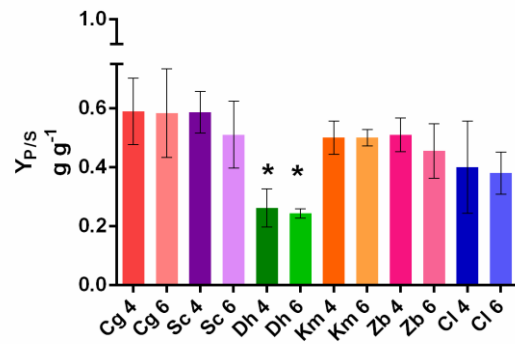
n=3

Para obtener el rendimiento de producción de biomasa por gramo de glucosa consumida ( $Y_{x/s}$ ) se utilizaron los valores iniciales y finales de peso seco y de glucosa en el medio. (Figura 16). Así mismo, el rendimiento de etanol con respecto a la glucosa consumida se calculó utilizando los valores iniciales y finales de etanol y glucosa en el medio (Fig. 17).



**Figura 16. Rendimiento  $Y_{x/s}$  en medio YPD.**

Calculado a partir de la concentración de biomasa producida (cuantificada por peso seco) entre la concentración de glucosa consumida durante 36 h de incubación. n=3. Análisis ANOVA con  $p < 0.05$  realizado en software GraphPad Prism.



**Figura 17. Rendimiento  $Y_{p/s}$  en medio YPD.**

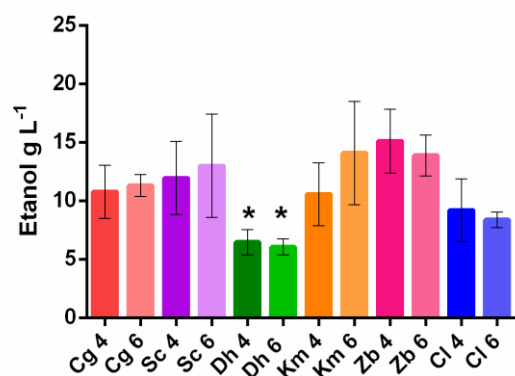
Calculado a partir de la concentración de etanol producido entre la concentración de glucosa consumida durante 36 h de incubación. n=3. Análisis ANOVA con  $p < 0.05$  realizado en software GraphPad Prism.

El rendimiento biomasa/sustrato  $Y_{x/s}$  únicamente fue mayor para *Z. bailii* a pH 6 con un valor promedio de  $0.475 \text{ g g}^{-1}$ , mientras las otras levaduras no mostraron diferencia significativa entre pH ni entre ellas (Fig. 16). Los valores del rendimiento oscilan entre 0.2 y 0.4 gramos de biomasa producida por gramos de glucosa consumida.

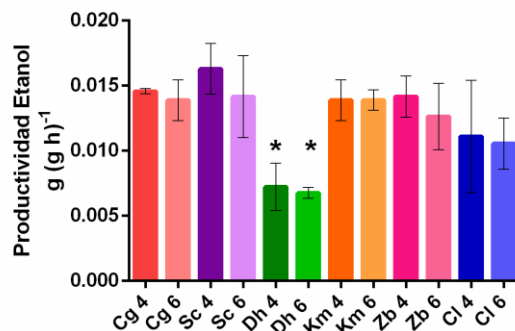
El rendimiento producto/sustrato  $Y_{p/s}$ , en este caso etanol/glucosa, fue mayor a  $0.5 \text{ g g}^{-1}$  para *C. guilliermondii*, *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *Z. bailii* y *C. lusitaniae*, en ambos pHs; mientras que para *D. hansenii* fue aproximadamente de  $0.3 \text{ g g}^{-1}$  a pH 4 y 6. Colocándola así como la levadura con menor rendimiento de etanol a partir de glucosa. Los diferentes valores de pH no provocaron cambios en la producción de etanol (Fig. 17).

La concentración de etanol usando glucosa como fuente de carbono acumulado en 36 h fue desde  $5 \text{ g L}^{-1}$  hasta  $17 \text{ g L}^{-1}$ . El rendimiento porcentual de etanol fue de: 100% para *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *Z. bailii* en ambos valores de pH, 96% y 99% para *C. guilliermondii* pH 4 y 6 respectivamente, 83% y 73% en *C. lusitaniae* pH 4 y 6; y finalmente de 51% en *D. hansenii* tanto en pH 4 como en pH 6. *D. hansenii* fue la levadura con menor acumulación de etanol en ambos valores de pH ( $\approx 5 \text{ g L}^{-1}$ ).

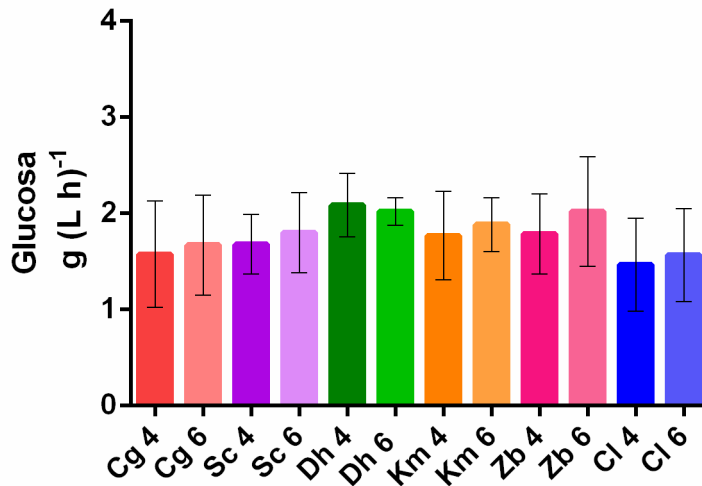
Entre las otras levaduras no hubo diferencia significativa entre el pH y los diferentes géneros (Fig. 18).



**Figura 18. Producción de etanol en medio YPD.**  
 Concentración final de etanol durante 36 h de incubación. n=3. Análisis ANOVA con  $p < 0.05$  realizado en software GraphPad Prism.



**Figura 19. Productividad de etanol en medio YPD.** Calculado a partir del rendimiento  $Y_{p/s}$  entre el tiempo total de fermentación (36 h). Análisis ANOVA con  $p < 0.05$  realizado en software GraphPad Prism.

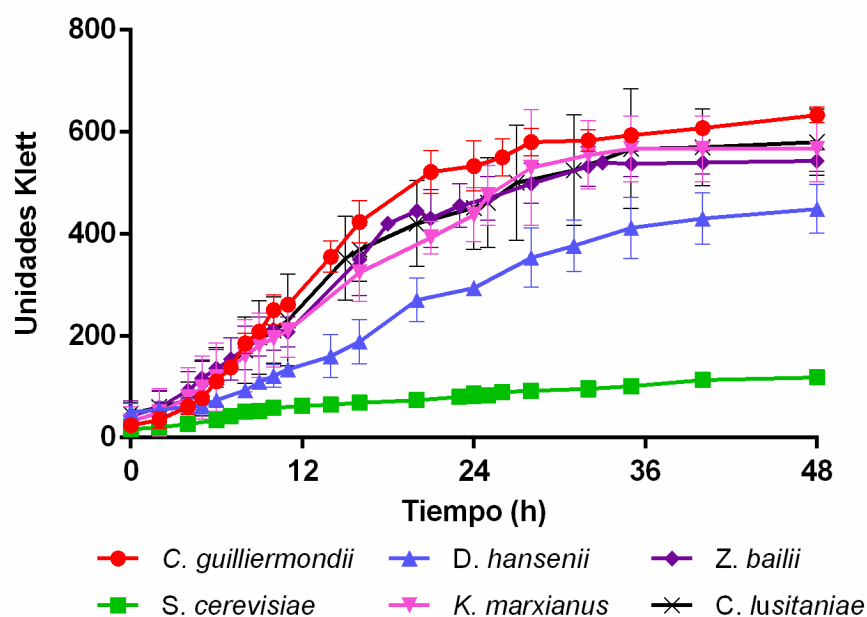


**Figura 20. Velocidad de consumo de glucosa en medio YPD.** Análisis ANOVA con  $p < 0.05$  realizado en software GraphPad Prism.

La productividad de etanol en las 36 h de fermentación obtenida fue entre  $0.010$  y  $0.017$   $(g\ h)^{-1}$  para *C. guilliermondii*, *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *Z. bailii* y *C. lusitaniae* sin importar el valor de pH. *D. hansenii* presentó un valor de productividad de etanol menor

de  $0.010 \text{ g (g h)}^{-1}$  en ambos pH, por lo que se colocó como el género con menor productividad específica de etanol en las condiciones utilizadas (Fig. 19).

Para cuantificar la velocidad de consumo de glucosa se tomó muestra al tiempo 0, 4, 10 y hasta las 12 h donde el sustrato fue agotado. Siendo así que todas las levaduras en ambos valores de pH presentaron una velocidad de consumo muy similar ( $1.5 - 2 \text{ g (L h)}^{-1}$ ) sin diferencia significativa entre unas y otras (Fig. 20).

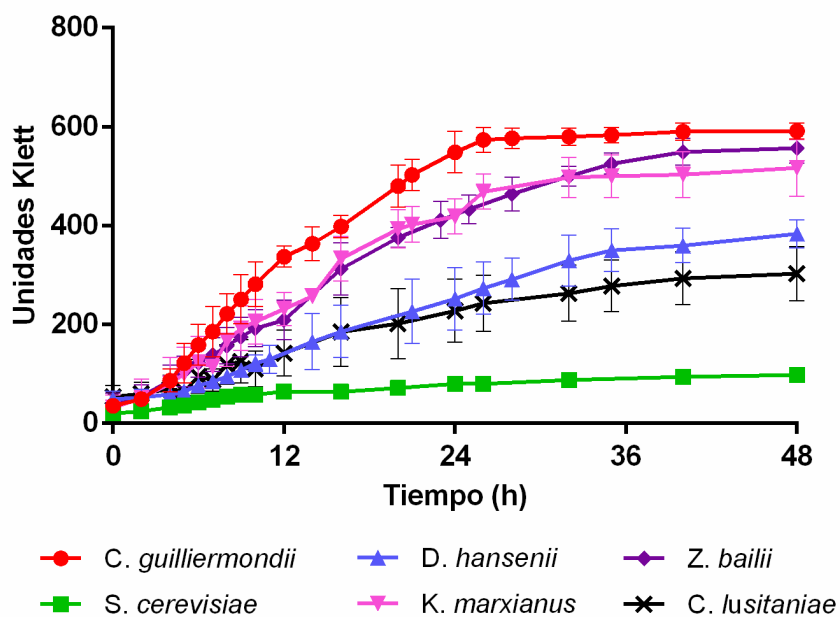


**Figura 21. Curvas de crecimiento en YPX pH 4.** Se incubaron a  $30^{\circ}\text{C}$  y 250 rpm por 36 h tomando lectura en Fotocolorímetro Klett-Summerson cada 2 h. Se ajustó el pH del medio con buffer tartárico-HCl 50 mM. Gráficas obtenidas con el software GraphPadPrism 6.

En los medios YPX con pH ajustado (Figs. 21-22), se observó que *D. hansenii* y *C. lusitaniae* tuvieron un crecimiento y comportamiento igual al de *C. guilliermondii*, *K. marxianus* y *Z. bailii*. Esto fue diferente en el medio sin ajuste de pH (Fig. 11) donde su crecimiento fue igual al de *S. cerevisiae*, la cual vuelve a ser la levadura con menor crecimiento.

Las velocidades máximas de crecimiento fueron mayores en ambos valores de pH (Tabla 4) en comparación con el medio sin ajuste de pH (Tabla 1). Las diferencias entre las velocidades de *D. hansenii*, *K. marxianus*, *Z. bailii* y *C. lusitaniae* en los diferentes valores de pH no son significativamente representativas. Para el caso de *C. guilliermondii* la mayor velocidad fue a pH 6 siendo también el mayor valor de entre todas las levaduras

utilizadas. *S. cerevisiae* presentó mayor velocidad de crecimiento a pH 4, casi el doble del valor a pH 6, aunque el valor de densidad óptica en ambos valores de pH es menor al de los demás géneros.



**Figura 22. Curvas de crecimiento en YPX pH 6.** Se incubaron a 30°C y 250 rpm por 36 horas tomando lectura en Fotocolorímetro Klett-Summerson cada 2 h. Se ajustó el pH del medio con MES-TEA 50 mM. Gráficas obtenidas con el software GraphPadPrism 6.

**Tabla 4. Velocidades máximas de crecimiento en YPX pH 4 y pH 6.**

Cepa	$\mu_{\text{máx}} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	
	pH 4	pH 6
<i>C. guilliermondii</i>	1.062 ± 0.08	1.177 ± 0.04
<i>S. cerevisiae</i>	1.018 ± 0.03	0.492 ± 0.03
<i>D. hansenii</i>	0.877 ± 0.09	0.640 ± 0.19
<i>K. marxianus</i>	1.077 ± 0.04	0.946 ± 0.25
<i>Z. bailii</i>	1.324 ± 0.23	0.917 ± 0.31
<i>C. lusitaniae</i>	1.010 ± 0.11	0.940 ± 0.07

n=3

La cantidad de biomasa máxima producida en medios YPX en 48 h (Tabla 5) va desde 3.5 g L<sup>-1</sup> hasta 8.6 g L<sup>-1</sup>. *S. cerevisiae* fue la levadura con la menor cantidad de biomasa (3.5 y 3.7 g L<sup>-1</sup>) en ambos pH. Estos valores fueron incluso menores a los obtenidos en medios

YPD. Para las demás levaduras no se reportó diferencia significativa entre los valores de biomasa máxima producida en ambos pHs.

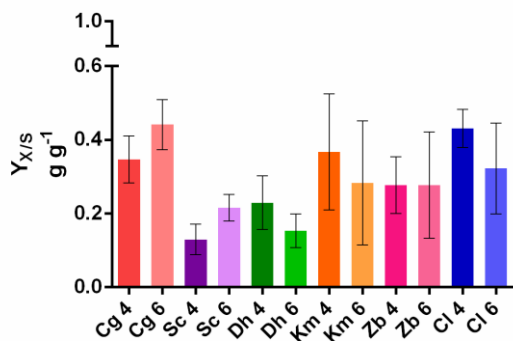
Tabla 5. Biomasa máxima producida en 48 h en YPX pH 4 y 6.

Cepa	$X_{\text{máx}}$ (g L <sup>-1</sup> )	
	pH 4	pH 6
<i>C. guilliermondii</i>	7.933 ± 1.70	7.100 ± 1.30
<i>S. cerevisiae</i>	3.500 ± 0.51	3.766 ± 0.68
<i>D. hansenii</i>	5.300 ± 0.96	4.100 ± 1.21
<i>K. marxianus</i>	8.500 ± 0.10	7.433 ± 1.93
<i>Z. bailii</i>	7.266 ± 1.02	8.600 ± 1.31
<i>C. lusitaniae</i>	5.500 ± 1.27	4.500 ± 0.70

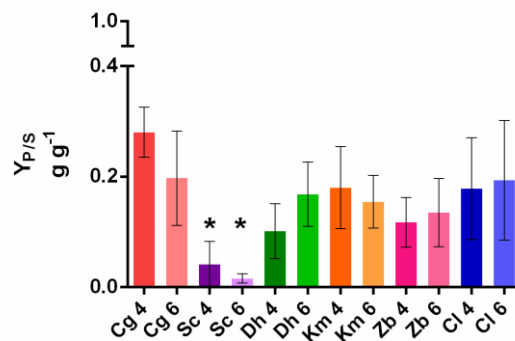
n=3

En cuanto al rendimiento de biomasa producida por cantidad de xilosa consumida ( $Y_{x/s}$ ), fue *C. guilliermondii* la levadura con el mayor rendimiento a pH 6 ( $\approx 0.5 \text{ g g}^{-1}$ ). *S. cerevisiae* también produjo mayor cantidad de biomasa a pH 6 ( $\approx 0.2 \text{ g g}^{-1}$ ) que a pH 4 ( $\approx 0.1 \text{ g g}^{-1}$ ), junto con *D. hansenii* ( $0.2$  y  $0.15 \text{ g g}^{-1}$ ) fueron las levaduras con menor rendimiento. *K. marxianus* mostró valores muy similares a ambos pHs ( $0.4$ - $0.5 \text{ g g}^{-1}$ ), al igual que *Z. bailii* ( $0.35$ - $0.4 \text{ g g}^{-1}$ ) y *C. lusitaniae* ( $0.38$ - $0.4 \text{ g g}^{-1}$ ). No obstante, el análisis estadístico no mostró diferencia significativa entre ninguna de las levaduras ni entre valores de pH (Fig. 23).

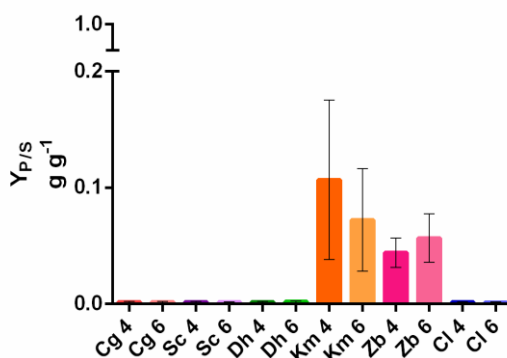
El rendimiento de xilitol a partir de xilosa, calculado entre la hora inicial y la hora final (48 h), fue menor a  $0.4 \text{ g g}^{-1}$  para todas las levaduras. *C. guilliermondii* y *C. lusitaniae* fueron los géneros con mayores rendimientos ( $0.3$ - $0.4 \text{ g g}^{-1}$ ). *S. cerevisiae* presentó el menor rendimiento en ambos pH ( $0.041$  y  $0.016 \text{ g g}^{-1}$ ). *D. hansenii*, *K. marxianus* y *Z. bailii* tuvieron rendimientos entre  $0.10$  y  $0.25 \text{ g g}^{-1}$ . (Fig. 24). A las 48 h las únicas levaduras en las que hubo una concentración detectable de etanol en ambos valores de pH fueron *K. marxianus* y *Z. bailii* con rendimientos de  $0.10$ ,  $0.06$  y  $0.04$ ,  $0.05 \text{ g g}^{-1}$  respectivamente (Fig. 25).



**Figura 23. Rendimiento  $Y_{x/s}$  en medio YPX.** Calculado a partir de la concentración de biomasa producida (cuantificada por peso seco) entre la concentración de xilosa consumida en 48 h de incubación. n=3. Análisis ANOVA con  $p < 0.05$  realizado en software GraphPad Prism.



**Figura 24. Rendimiento  $Y_{p/s}$  (xilitol) en medio YPX.** Calculado a partir de la concentración xilitol producido entre la concentración de xilosa consumida en 48 h de incubación. n=3. Análisis ANOVA con  $p < 0.05$  realizado en software GraphPad Prism.

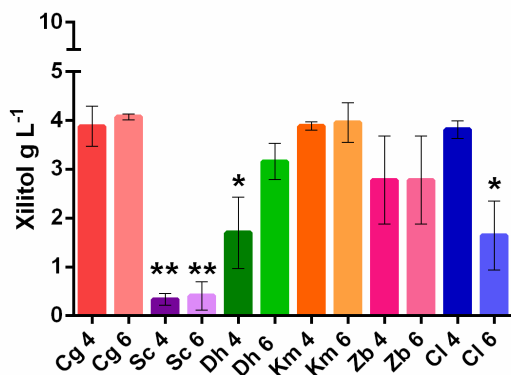


**Figura 25. Rendimiento  $Y_{p/s}$  (etanol) en medio YPX.** Calculado a partir de la concentración etanol producida entre la concentración de xilosa consumida en 48 h de incubación. n=3. Análisis ANOVA con  $p < 0.05$  realizado en software GraphPad Prism.

La concentración de xilitol detectable a las 48 h de fermentación fue diferente para cada género. *C. guilliermondii* y *K. marxianus* acumularon mayor cantidad de xilitol ( $4 \pm 0.08$  g L<sup>-1</sup>), sin diferencia entre pH 4 y pH 6. *S. cerevisiae* acumuló aproximadamente 0.3 g L<sup>-1</sup> en ambos pHs. En *D. hansenii* con pH 4 se detectó una concentración de 2 g L<sup>-1</sup> mientras que a pH 6 fue de hasta 3.1 g L<sup>-1</sup>. *Z. bailii* con 3.5 g L<sup>-1</sup> en ambos valores de pH. *C. lusitaniae* acumuló hasta 3.8 g L<sup>-1</sup> de xilitol a pH 4 mientras que a pH 6 fue de 1.6 g L<sup>-1</sup> (Fig. 26). El rendimiento teórico de xilitol a partir de 20 g L<sup>-1</sup> de xilosa es de 1.83 g. Por lo tanto, los rendimientos porcentuales obtenidos fueron de: 39% (pH 4) y 21.6% (pH 6) para *C. guilliermondii*, siendo estos los valores más altos. Enseguida, *C. lusitaniae* con

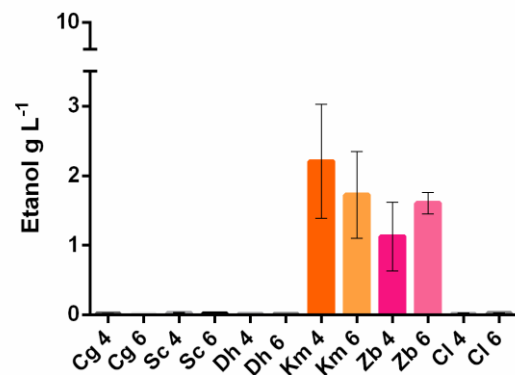
rendimientos porcentuales de 31.8% a pH 4 y de 8.6% a pH 6. *K. marxianus* presentó un rendimiento del 20% en pH 4 y 17% en pH 6. *Z. bailii* de 13% en pH 4 y 15% en pH 6. *D. hansenii* con 11% a pH 4 y 13% a pH 6; y finalmente, *S. cerevisiae* con los valores porcentuales más bajos tanto en pH 4 como en pH 6 (5.7% y 2.8% respectivamente).

El etanol cuantificado en las fermentaciones de *K. marxianus* fue de 3 g L<sup>-1</sup> en pH 4 y 2.3 en pH 6. Por otro lado, en *Z. bailii* fueron de 1.5 g L<sup>-1</sup> en pH 4 y 1.7 g L<sup>-1</sup> en pH 4 (Fig. 27). No se reportó diferencia significativa entre los valores de *K. marxianus* y *Z. bailii* a los diferentes valores de pH.



**Figura 26. Producción de xilitol en medio YPX.**

Concentración final de xilitol producido a partir de xilosa en 48 h de incubación. n=3. Análisis ANOVA con  $p < 0.05$  realizado en software GraphPad Prism.



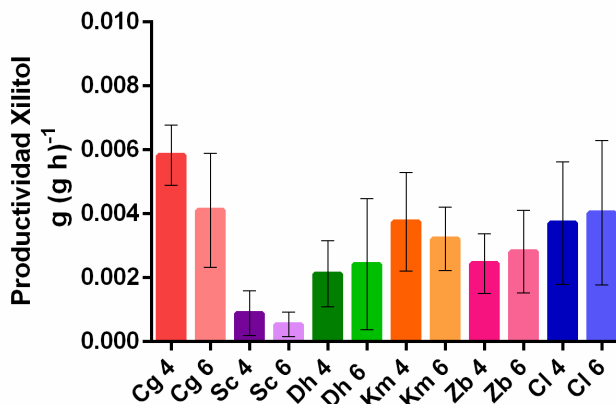
**Figura 27. Producción de etanol en medio YPX.**

Concentración final de etanol producido a partir de xilosa en 48 h de incubación. n=3. Análisis ANOVA con  $p < 0.05$  realizado en software GraphPad Prism.

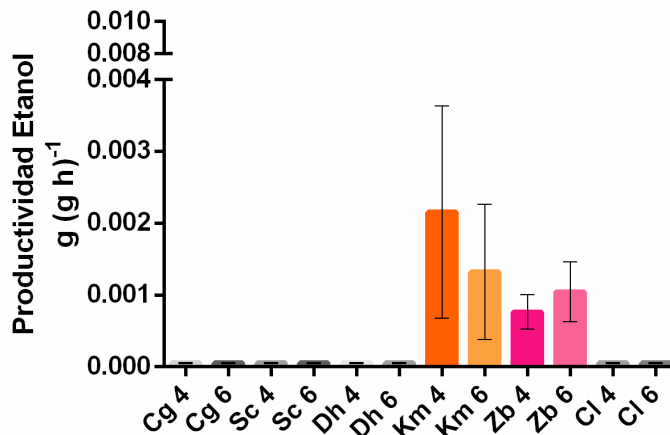
*C. guilliermondii* presentó la mejor productividad de xilitol ( $0.0058 \pm 0.0009$  g (g h)<sup>-1</sup> a pH 4, mientras que a pH 6 alcanzó un valor de  $0.004 \pm 0.001$  g (g h)<sup>-1</sup>. En *C. lusitaniae* se obtuvieron valores similares a los de *C. guilliermondii* ( $0.004 \pm 0.002$  g (g h)<sup>-1</sup>) para ambos pHs, aunque con una ligera tendencia a ser mayor a pH 6. En *S. cerevisiae*, la levadura con menor productividad de xilitol, se alcanzaron valores de  $0.0008$  y  $0.0005$  g (g h)<sup>-1</sup> en pH 4 y pH 6 respectivamente. *D. hansenii* mostró valores de  $0.0021$  y  $0.0024$  g (g h)<sup>-1</sup>. *K. marxianus* con una productividad de  $0.0037 \pm 0.0015$  g (g h)<sup>-1</sup> a pH 4, mayor que a pH 6 ( $0.0032 \pm 0.0009$  g (g h)<sup>-1</sup>). *Z. bailii* mostró una productividad de  $0.0024 \pm 0.0009$  g (g h)<sup>-1</sup> a pH 4 y de  $0.0028 \pm 0.0012$  g (g h)<sup>-1</sup> a pH 6 (Fig. 28).



La productividad de etanol a partir de xilosa, únicamente cuantificable en *K. marxianus* fue de 0.0021 g (g h)<sup>-1</sup> a pH 4 y 0.0012 g (g h)<sup>-1</sup> a pH 6; y en *Z. bailii* de 0.0007 g (g h)<sup>-1</sup> a pH 4 y 0.001 g (g h)<sup>-1</sup> en pH 6 (Fig. 29).



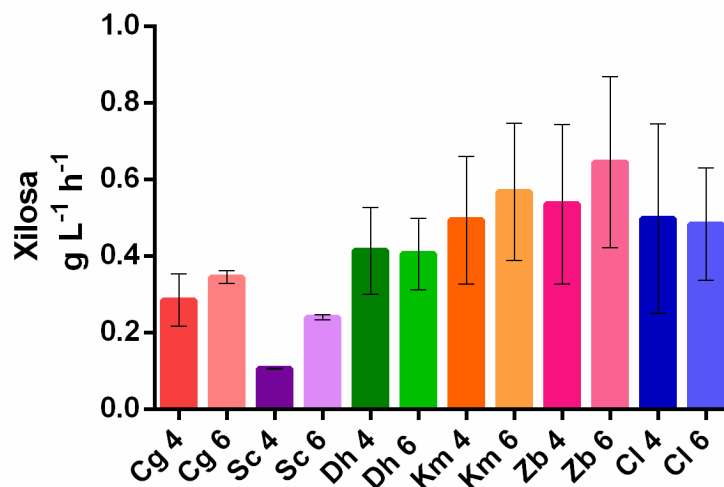
**Figura 28. Productividad de xilitol en medio YPX.** Calculado a partir del rendimiento  $Y_{p/s}$  entre el tiempo total de fermentación (48 h). Análisis ANOVA con  $p < 0.05$  realizado en software GraphPad Prism.



**Figura 29. Productividad de etanol en medio YPX.** Calculado a partir del rendimiento  $Y_{p/s}$  entre el tiempo total de fermentación (48 h). Análisis ANOVA con  $p < 0.05$  realizado en software GraphPad Prism.

La velocidad de consumo de xilosa se cuantificó únicamente con el valor inicial y final debido a que a las 48 h no se había agotado el azúcar en ninguna de las fermentaciones. *C. guilliermondii* presentó una velocidad de  $\approx 0.35$  g (L h)<sup>-1</sup> en ambos pHs. En *S.*

*cerevisiae* hubo una diferencia entre pH 4 ( $0.18 \text{ g (L h)}^{-1}$ ) y pH 6 ( $0.3 \text{ g (L h)}^{-1}$ ). *D. hansenii* presentó la misma velocidad a pH 4 y 6 ( $0.48 \text{ g (L h)}^{-1}$ ). Para *K. marxianus* la velocidad fue de  $0.66 \text{ g (L h)}^{-1}$  a pH 4 y de hasta  $0.74 \text{ g (L h)}^{-1}$  en pH 6. *Z. bailii* a pH 4 con una velocidad de  $0.75 \text{ g (L h)}^{-1}$  y a pH 6 de hasta  $0.86 \text{ g (L h)}^{-1}$ , siendo este valor el mayor entre todas las levaduras. *C. lusitaniae* presentó velocidades de  $\approx 0.58 \text{ g (L h)}^{-1}$  para ambos pHs (Fig. 30).



**Figura 30. Velocidad de consumo de xilosa en medio YPX.** Análisis ANOVA con  $p < 0.05$  realizado en software GraphPad Prism.

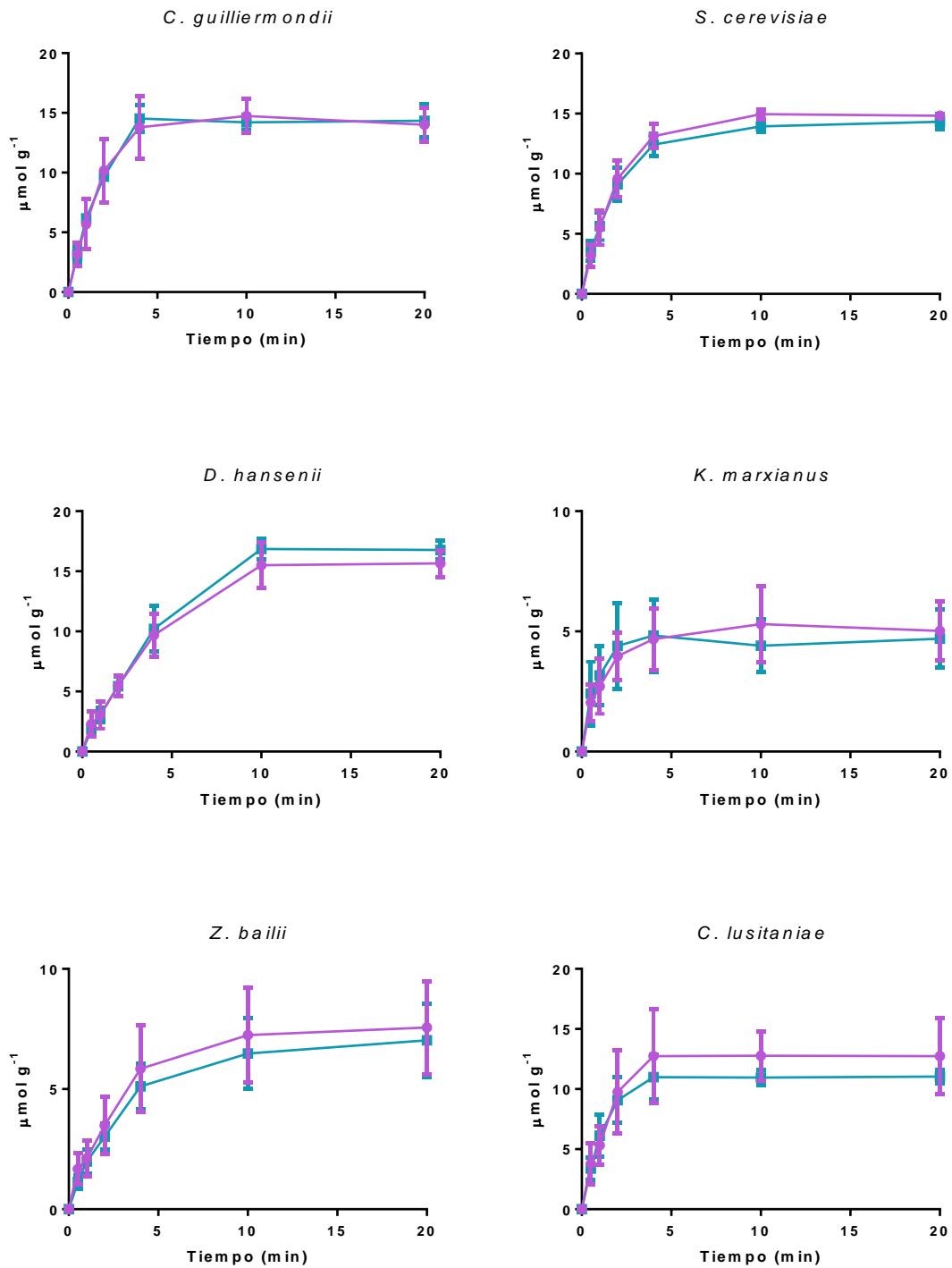
## 6.4 Transporte y acumulación de $^{14}\text{C}$ -glucosa

Dado que uno de los objetivos del trabajo era aclarar el mecanismo del transporte de la xilosa, que se ha propuesto a través de un simportador  $\text{H}^+$ /xilosa, se midieron en una primera parte las velocidades de transporte a dos valores de pH, 4 y 6.

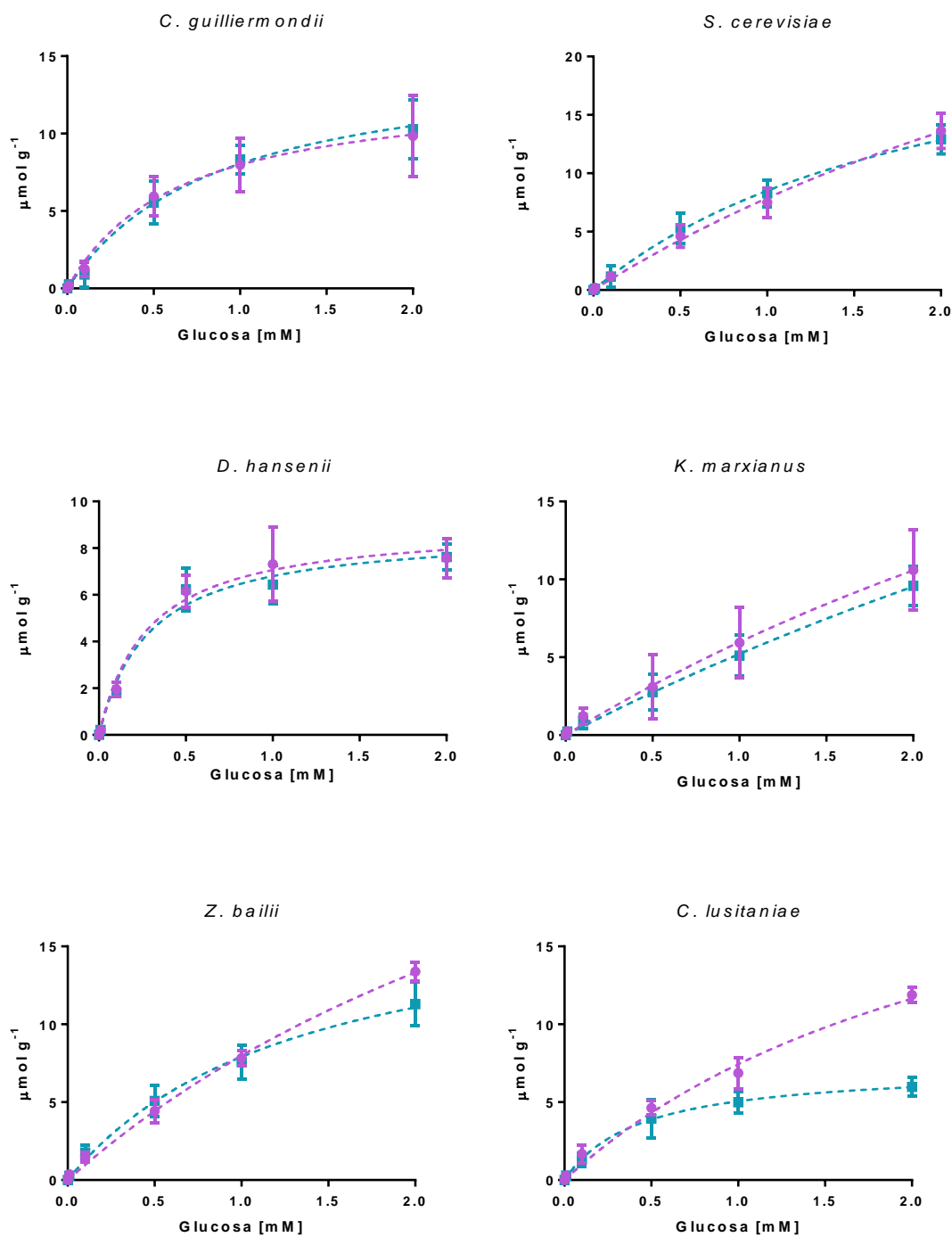
En los ensayos del transporte de glucosa realizados con una concentración final de glucosa de  $1 \text{ mM}$  (Fig. 31), para *C. guilliermondii*, *S. cerevisiae* y *C. lusitaniae* se saturó la curva a los 5 minutos con un transporte de aproximadamente  $15 \mu\text{mol}$  de glucosa por gramo de levadura. En *D. hansenii* se observó la misma saturación pero a los 10 minutos. No así para las cepas de *K. marxianus* y *Z. bailii*, las cuales únicamente lograron

transportar  $5 \mu\text{mol g}^{-1}$ , saturándose poco antes de los 5 minutos. Ninguna de las levaduras mostró diferencia significativa de transporte de glucosa a los diferentes pH.

Las cinéticas de transporte de glucosa se llevaron a cabo durante 5 minutos, con concentraciones desde 0.01 mM hasta 2 mM de glucosa (Fig. 32). Se observó para *C. guilliermondii* una saturación con 1 mM transportando hasta  $10 \mu\text{mol g}^{-1}$ , mientras que para *S. cerevisiae* y *K. marxianus* no fue evidente la saturación a ninguna concentración utilizada. En *D. hansenii* la curva se saturó a 0.5 mM de glucosa transportando apenas  $5 \mu\text{mol/g}$ . Para *Z. bailii* se observó una diferencia entre pH 4 al cual no se saturó la curva a 2 mM y siguió un comportamiento exponencial. Por el contrario, a pH 6 la curva se saturó a 1 mM, transportando aproximadamente  $10 \mu\text{mol g}^{-1}$ . *C. lusitaniae* presentó el mismo comportamiento que *Z. bailii*: a pH 4 no hubo saturación mientras que a pH 6 se saturó a 0.5 mM transportando  $5 \mu\text{mol g}^{-1}$ .



**Figura 31. Acumulación de  $^{14}\text{C}$ -glucosa.** Se incubaron las células en buffer pH 4 (●) (tartárico-HCl 20 mM) o pH 6 (■) (MES-TEA 20 mM) y  $^{14}\text{C}$ -glucosa 1 mM. Se tomaron muestras a diferentes tiempos (0.5, 1, 2, 4, 10 y 20 min) y se hicieron pasar por filtros de celulosa lavándolas con una solución 10 mM de glucosa. n=4. Se utilizó una concentración final de 500  $\text{mg mL}^{-1}$  de células ayunadas por 12 horas. Los resultados se procesaron en el software GraphPadPrism 6.



**Figura 32. Cinéticas de transporte de  $^{14}\text{C}$ -glucosa.** Se incubaron las células en buffer pH 4 [●] (tartárico-HCl 20 mM) o pH 6 [■] (MES-TEA 20 mM) y con diferentes concentraciones de  $^{14}\text{C}$ -glucosa (0.1, 0.5, 1 y 2 mM). Se tomó muestra de cada incubación a los 5 min y se hicieron pasar por filtros de celulosa lavándolas con una solución 10 mM de glucosa. Se utilizó una concentración final de  $500 \text{ mg mL}^{-1}$  de células ayunadas por 12 h. Se obtuvieron los valores de  $V_{\text{máx}}$  y  $K_{\text{m}}$  del transporte de glucosa para cada levadura. El análisis se realizó con el software GraphPadPrism 6 Enzyme Kinetics Michaelis-Menten. n=4

Al calcular los parámetros cinéticos del transporte de glucosa se obtuvo que: a pH 4 *S. cerevisiae* presentó la  $V_{m\acute{a}x}$  más alta (48.78  $\mu\text{mol (g min}^{-1}\text{)}$ ), seguida de *K. marxianus* y *Z. bailii* (45.91 y 40.48  $\mu\text{mol (g min}^{-1}\text{)}$ ). Para *C. lusitaniae* el valor de  $V_{m\acute{a}x}$  fue mucho menor que el de las levaduras anteriores (26.87  $\mu\text{mol (g min}^{-1}\text{)}$ ). *C. guilliermondii* y *D. hansenii* tuvieron los valores de  $V_{m\acute{a}x}$  más bajos en este pH (13.15 y 9.03  $\mu\text{mol (g min}^{-1}\text{)}$ ). A pH 6 *K. marxianus* aumentó su velocidad máxima de transporte (55.9  $\mu\text{mol (g min}^{-1}\text{)}$ ), al igual que *C. guilliermondii* (15.08  $\mu\text{mol (g min}^{-1}\text{)}$ ). Sin embargo, en *S. cerevisiae*, *Z. bailii* y *C. lusitaniae* el valor de  $V_{m\acute{a}x}$  disminuyó considerablemente (26.26, 18.54 y 7.25  $\mu\text{mol (g min}^{-1}\text{)}$ ) respectivamente). *D. hansenii* tuvo el valor más bajo de  $V_{m\acute{a}x}$  también en pH 6 (8.75  $\mu\text{mol (g min}^{-1}\text{)}$ ). La cepa con mayor afinidad por glucosa tanto a pH 4 como a pH 6 fue *D. hansenii* con una  $K_m$  de 0.27-0.28  $\mu\text{M}$ , seguida de *C. guilliermondii* con valores de  $K_m$  entre 0.64 y 0.87  $\mu\text{M}$  a pH 4 y 6 respectivamente. *C. lusitaniae*, *Z. bailii* y *S. cerevisiae* mostraron mayor afinidad por glucosa a pH 6 (Tabla 6).

**Tabla 6. Parámetros cinéticos del transporte de  $^{14}\text{C}$ -glucosa.**

Cepa	$V_{m\acute{a}x}(\mu\text{mol (g min}^{-1}\text{)})$		$K_m(\mu\text{M})$	
	pH 4	pH 6	pH 4	pH 6
<i>C. guilliermondii</i>	13.15 ± 1.827	15.08 ± 1.885	0.64 ± 0.230	0.87 ± 0.245
<i>S. cerevisiae</i>	48.78 ± 16.8	26.26 ± 3.913	5.19 ± 2.336	2.08 ± 0.521
<i>D. hansenii</i>	9.03 ± 0.560	8.75 ± 0.522	0.27 ± 0.064	0.28 ± 0.063
<i>K. marxianus</i>	45.91 ± 37.43	55.90 ± 41.34	6.68 ± 6.768	9.72 ± 8.31
<i>Z. bailii</i>	40.48 ± 6.514	18.54 ± 2.521	4.07 ± 0.905	1.34 ± 0.343
<i>C. lusitaniae</i>	26.87 ± 4.332	7.25 ± 0.638	2.61 ± 0.644	0.43 ± 0.114

n=3-5

Debido a que algunos valores de  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_m$  mostraron desviaciones estándar muy elevadas, se decidió calcular la eficiencia del transporte de glucosa con los valores promedios (Tabla 7). De esta manera es *D. hansenii* con un valor de 33.4 a pH 4 y 31.25 pH 6, la levadura con mayor eficiencia en el transporte de glucosa. *C. guilliermondii* se colocó en segundo lugar con valores de 20.54 a pH 4 y 17.33 a pH 6, seguida de *C. lusitaniae* (10.29 a pH 4 y 16.86 a pH 6). Posteriormente, *Z. bailii* y *S. cerevisiae* con valores muy similares (9.95 y 9.34 a pH 4; 13.83 y 12.62 a pH 6 respectivamente). En

último lugar *K. marxianus* con una eficiencia de transporte de glucosa de 6.87 a pH 4 y de 5.75 a pH 6.

Tabla 7. Eficiencia transporte de glucosa.

Cepa	$V_{\text{máx}} / K_m$	
	pH 4	pH 6
<i>C. guilliermondii</i>	20.54	17.33
<i>S. cerevisiae</i>	9.34	12.62
<i>D. hansenii</i>	33.44	31.25
<i>K. marxianus</i>	6.87	5.75
<i>Z. bailii</i>	9.95	13.83
<i>C. lusitaniae</i>	10.29	16.86

n=3-5

## 6.5 Transporte y acumulación de $^{14}\text{C}$ -xilosa

Los ensayos para el transporte de xilosa se realizaron también con una concentración de 1 mM. *C. guilliermondii* logró transportar más de 15  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de xilosa en 20 minutos. El caso contrario fue *S. cerevisiae*, la cual transportó menos de 1  $\mu\text{mol g}^{-1}$  en 20 minutos. *D. hansenii* transportó hasta 4  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de xilosa, aunque no presentó saturación a los 20 minutos. *K. marxianus* no transportó más de 2  $\mu\text{mol g}^{-1}$  al igual que *Z. bailii*. *C. lusitaniae* logró transportar hasta 3  $\mu\text{mol g}^{-1}$ . No se observó diferencia significativa entre el transporte de xilosa en ambos pH (Figura 33).

Las cinéticas de transporte de xilosa también realizadas por 5 minutos con concentraciones desde 0.01 mM hasta 2 mM de xilosa dieron los siguientes resultados (Fig. 34): en *C. guilliermondii* se observó un transporte de hasta 6  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de xilosa a una concentración de 2 mM. *S. cerevisiae* transportó menos de 2  $\mu\text{mol g}^{-1}$  a esa misma concentración, al igual que *K. marxianus*. *Z. bailii* transportó poco más de  $\mu\text{mol g}^{-1}$  y *D.*

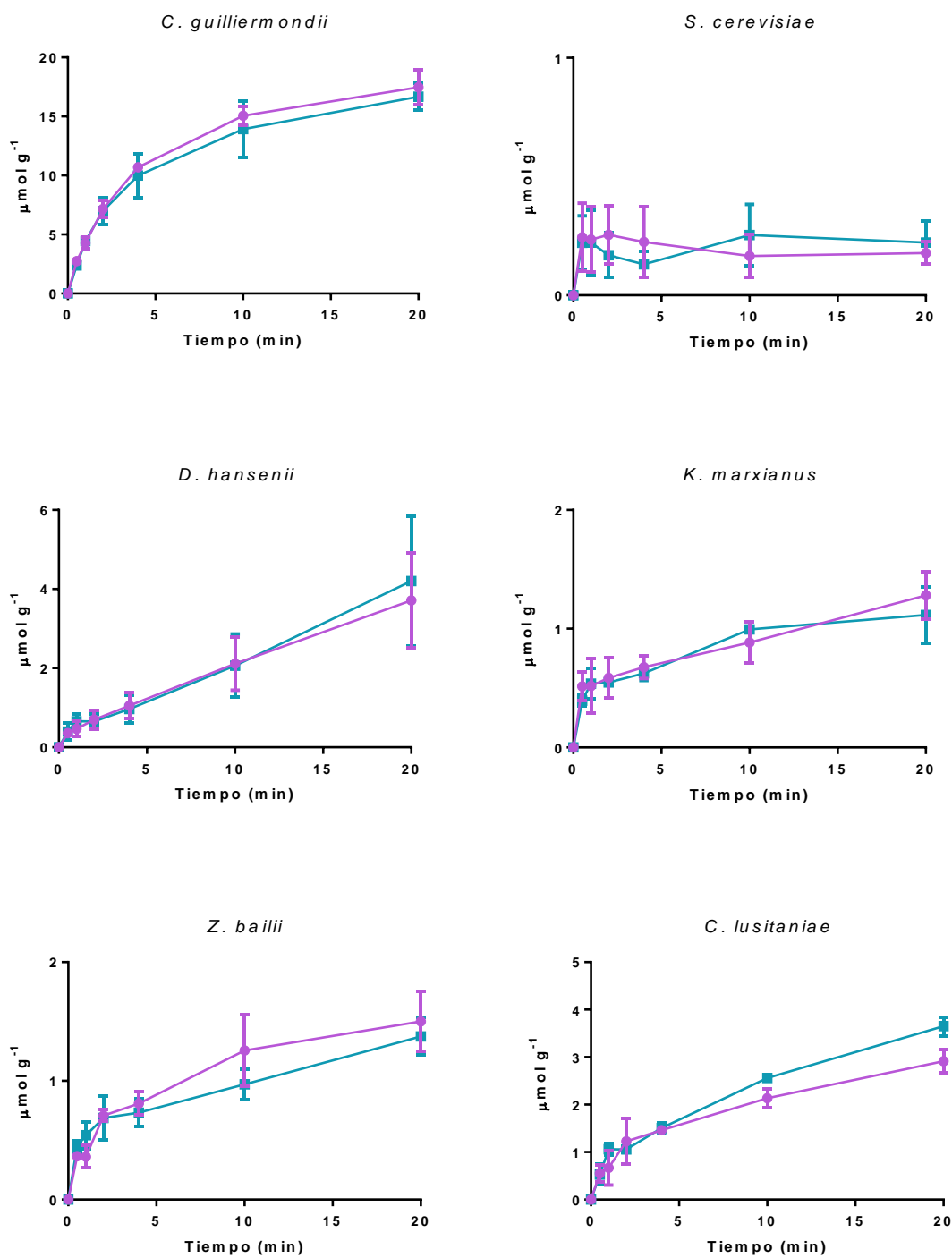
*hansenii* aproximadamente  $4 \mu\text{mol g}^{-1}$  de xilosa  $2 \text{ mM}$ . Ninguna cepa mostró saturación de la curva en alguna concentración de xilosa y no hubo diferencia entre pH 4 y pH 6.

En *C. lusitaniae* los valores de  $V_{\text{máx}}$  fueron los más altos entre las levaduras no-convencionales utilizadas en este estudio ( $33.79 \mu\text{mol (g min}^{-1})$  a pH 4 y  $22.36 \mu\text{mol (g min}^{-1})$  a pH 6) (Tabla 8). *C. guilliermondii* presentó valores de  $V_{\text{máx}}$  de  $11.18$  y  $14.18 \mu\text{mol (g min}^{-1})$  para pH 4 y pH 6 respectivamente. Estos valores son muy similares a los obtenidos en el transporte de glucosa (Tabla 6). Todos los valores obtenidos por las demás levaduras se encontraron debajo de estos. Resaltó el caso de *S. cerevisiae*, donde el valor de  $V_{\text{máx}}$  en ambos pHs no es calculable utilizando el método descrito debido a que carece de un transportador efectivo para xilosa, por lo tanto su afinidad por xilosa es muy baja. *C. guilliermondii* presentó la mayor afinidad tanto a pH 4 como a pH 6, ligeramente mayor en el medio ácido ( $K_m = 1.10 \mu\text{M}$  a pH 4 y  $1.55 \mu\text{M}$  a pH 6). De igual manera, para *D. hansenii* y *K. marxianus* la mayor afinidad se encontró a pH 4 con valores de  $K_m$  de  $1.41 \mu\text{M}$  y  $1.23 \mu\text{M}$ , mientras que en *Z. bailii* y *C. lusitaniae* el menor valor de  $K_m$  se encontró a pH 6 ( $1.92 \mu\text{M}$  y  $11.52 \mu\text{M}$ ). Aun así, la diferencia entre los valores de  $K_m$  a pH 4 y pH 6 de cada levadura no es garantía de la presencia de un simportador puesto que los valores son muy cercanos.

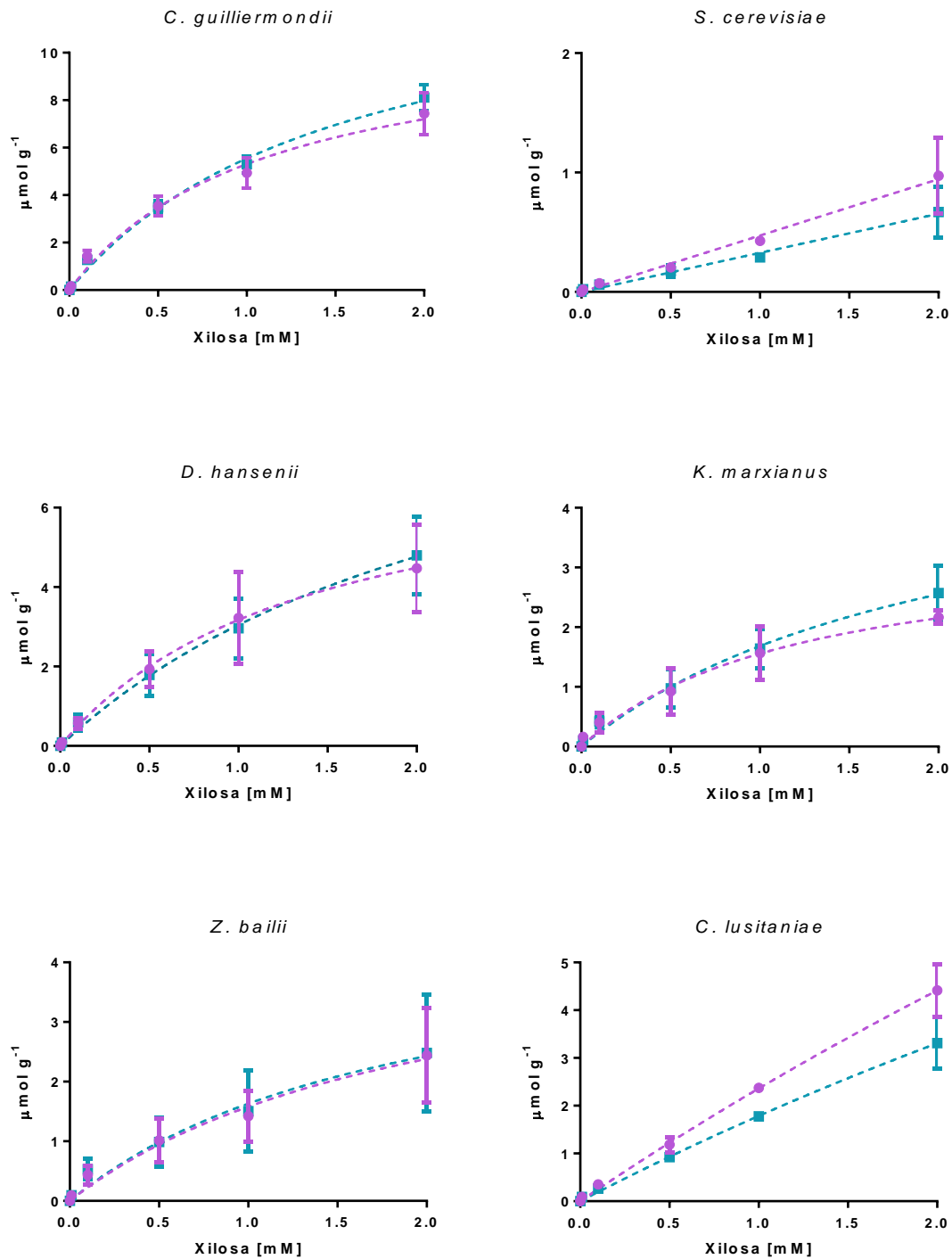
Se calculó también la eficiencia del transporte de xilosa (Tabla 9) de la misma manera que para el transporte de glucosa (Tabla 7). De esta manera se obtuvo que para pH 4 y 6 la levadura con mayor eficiencia de transporte fue *C. guilliermondii* con valores de  $10.16$  y  $9.14$ , seguida de *D. hansenii* ( $5.41$  y  $4.21$ ). A continuación *K. marxianus* ( $2.83$  y  $2.48$ ), *Z. bailii* ( $2.35$  y  $2.48$ ) y *C. lusitaniae* ( $2.53$  y  $1.94$ ). Finalmente, fue *S. cerevisiae* la levadura con menor eficiencia en el transporte de xilosa con valores de  $0.33$  a pH 4 y  $0.5$  a pH 6.

El transporte medido corresponde a todos los transportadores presentes en la membrana de las levaduras, por lo que las constantes cinéticas determinadas ( $V_{\text{máx}}$  y  $K_m$ ) se refieren a la capacidad celular de transporte y no de una proteína en específico.





**Figura 33. Acumulación de <sup>14</sup>C-xilosa.** Se incubaron las células en buffer pH 4 [●] (Tartárico-HCl 20 mM) o pH 6 [■] (MES-TEA 20 mM) y <sup>14</sup>C-xilosa 1 mM. Se tomaron muestras a diferentes tiempos (0.5, 1, 2, 4, 10 y 20 min) y se hicieron pasar por filtros de celulosa lavándolas con una solución 10 mM de glucosa. n=4. Se utilizó una concentración final de 50 mg/mL de células ayunadas por 12 horas. Los resultados se procesaron en el software GraphPadPrism 6.



**Figura 34. Cinéticas de transporte de <sup>14</sup>C-xilosa.** Se incubaron las células en buffer pH 4 (●) (tartárico-HCl 20 mM) o pH 6 (■) (MES-TEA 20 mM) y con diferentes concentraciones de <sup>14</sup>C-xilosa (0.1, 0.5, 1 y 2 mM). Se tomó muestra de cada incubación a los 5 min y se hicieron pasar por filtros de celulosa lavándolas con una solución 10 mM de xilosa. Se utilizó una concentración final de 50 mg/mL de células ayunadas por 12 h. Se obtuvieron los valores de  $V_{\text{máx}}$  y  $K_m$  del transporte de xilosa para cada levadura. El análisis se realizó con el software GraphPadPrism 6 Enzyme Kinetics Michaelis-Menten.

n=4

Tabla 8. Parámetros cinéticos del transporte de <sup>14</sup>C-xilosa.

Cepa	V <sub>máx</sub> (μmol (g·min) <sup>-1</sup> )		K <sub>m</sub> (μM)	
	pH 4	pH 6	pH 4	pH 6
<i>C. guilliermondii</i>	11.18 ± 1.173	14.18 ± 1.117	1.10 ± 0.237	1.55 ± 0.221
<i>S. cerevisiae</i>	1*10 <sup>13</sup>	5*10 <sup>13</sup>	3*10 <sup>13</sup>	1*10 <sup>14</sup>
<i>D. hansenii</i>	7.64 ± 1.922	10.97 ± 3.435	1.41 ± 0.682	2.6 ± 1.273
<i>K. marxianus</i>	3.48 ± 0.792	5.24 ± 1.333	1.23 ± 0.544	2.11 ± 0.896
<i>Z. bailii</i>	4.83 ± 1.903	4.76 ± 2.222	2.05 ± 1.365	1.92 ± 1.545
<i>C. lusitaniae</i>	33.79 ± 25.16	22.36 ± 16.44	13.31 ± 11.20	11.52 ± 9.69

n=3-5

Tabla 9. Eficiencia transporte de xilosa.

Cepa	V <sub>máx</sub> / K <sub>m</sub>	
	pH 4	pH 6
<i>C. guilliermondii</i>	10.16	9.14
<i>S. cerevisiae</i>	0.33	0.5
<i>D. hansenii</i>	5.41	4.21
<i>K. marxianus</i>	2.83	2.48
<i>Z. bailii</i>	2.35	2.48
<i>C. lusitaniae</i>	2.53	1.94

n=3-5

## 6.6 Producción de NADH

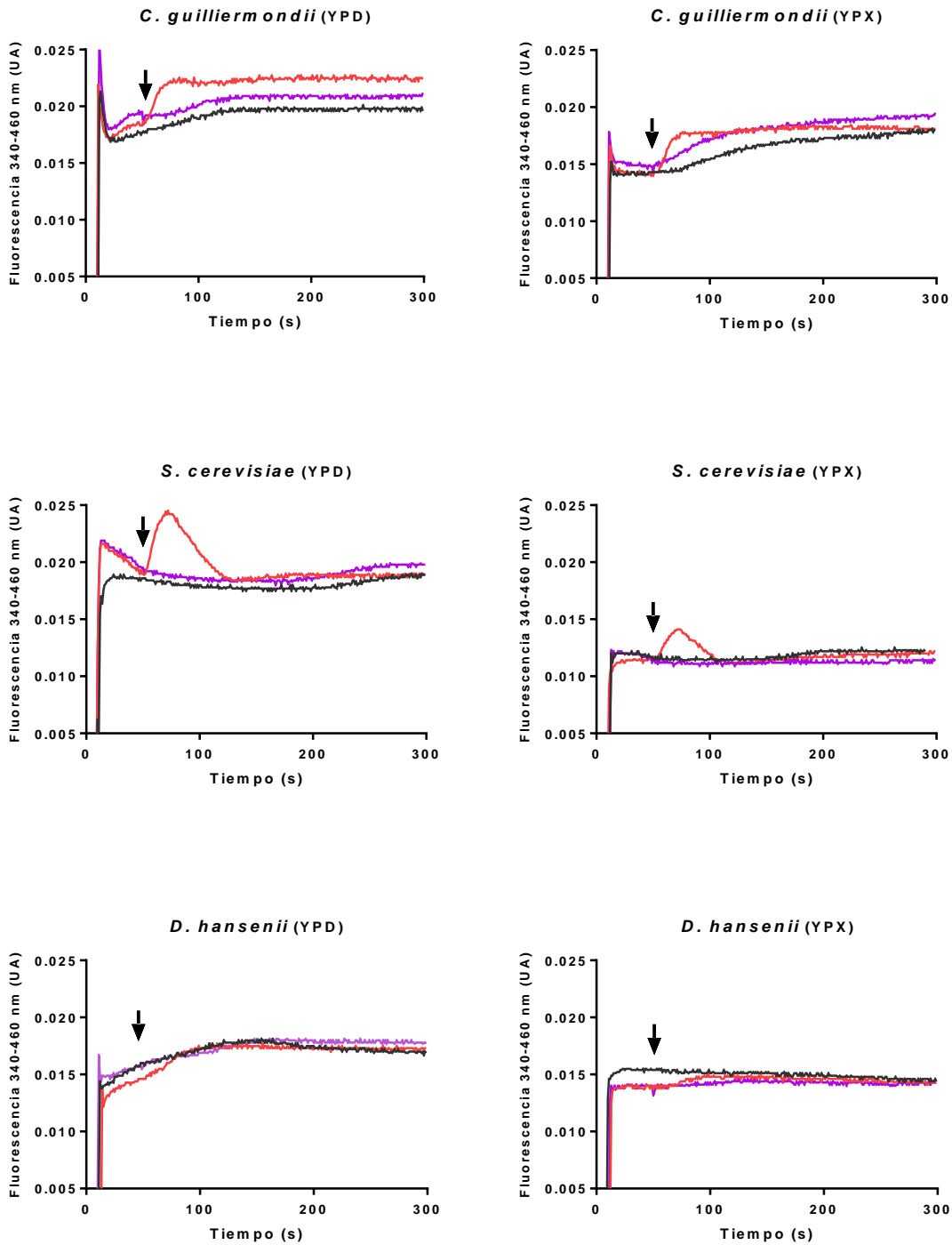
Además de la entrada de glucosa o xilosa, otra prueba para analizar el metabolismo de ambos azúcares consistió en observar los cambios de la fluorescencia al agregar cada uno de ellos. Tanto la glucosa como la xilosa, en su metabolismo producen la reducción

del NAD<sup>+</sup> o el NADP<sup>+</sup>, que en su forma reducida (NADH o NADPH) fluorescen a 460 nm, excitando a 340 nm. Se utilizaron células de levadura provenientes de un inóculo tanto de YPD como YPX con el fin de analizar si la condición de cultivo tendría algún efecto en el NADH o NADPH producido. Inhibidores de la cadena respiratoria, tales como cianuro de potasio y octil galato, fueron agregados a la preparación para evitar que se observara algún pico de fluorescencia causado por la aparición de NADH o NADPH a nivel respiratorio.

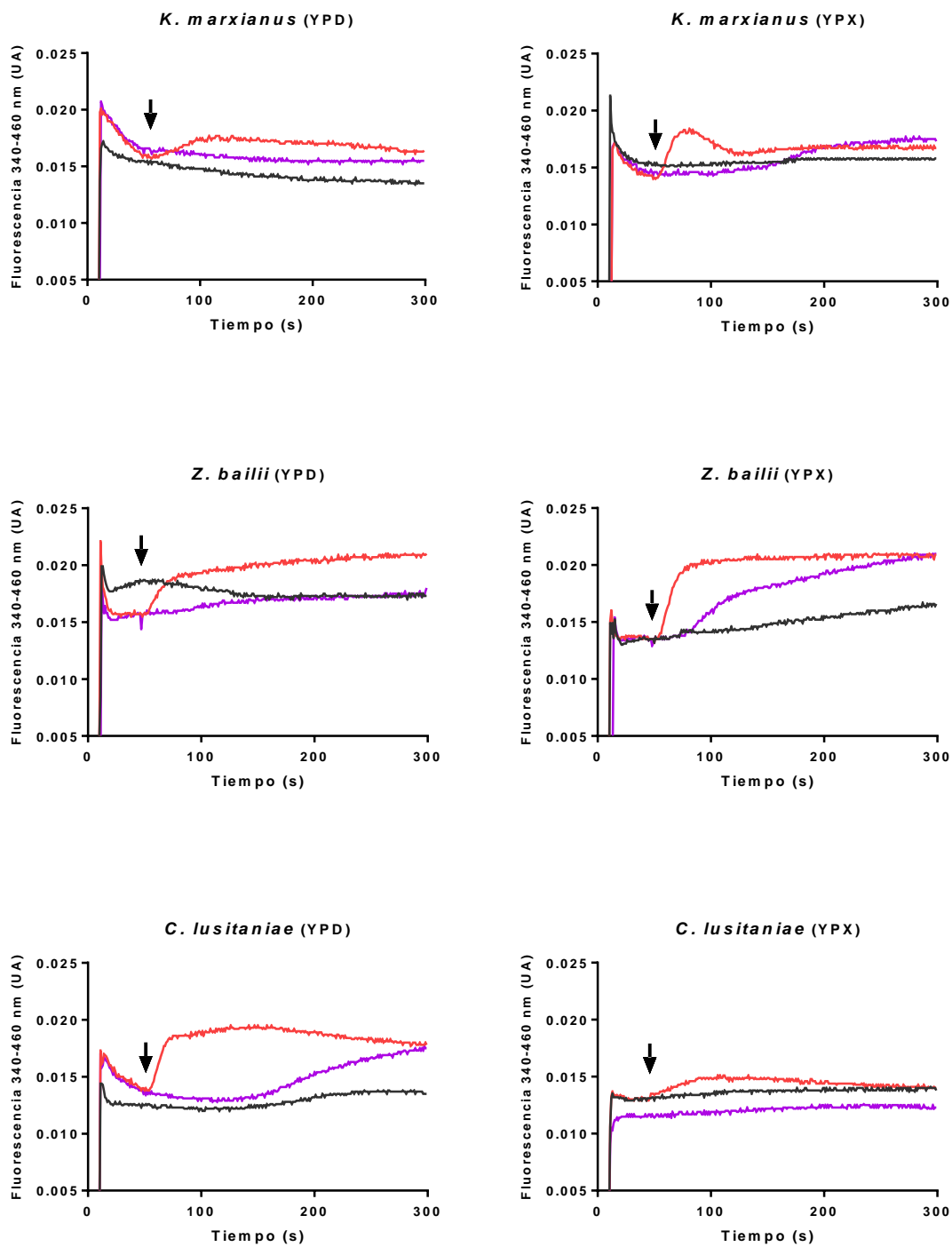
Al ser ayunadas las levaduras durante 24 h, se esperaba que no hubiera producción alguna de NADH o NADPH sin sustrato. Con *C. guilliermondii*, sin embargo, ayunada durante 48 h, aún se observó un aumento en el nivel de fluorescencia sin glucosa o xilosa no comparable con el pico de fluorescencia producido al agregar glucosa para ambos inóculos (YPD o YPX). Para esta levadura la xilosa no produjo un efecto observable en la reducción del NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup>. Para *S. cerevisiae* se observó un incremento en la fluorescencia al adicionar glucosa, independientemente del inóculo del que provinieran las células. El NADH es consumido inmediatamente al continuar con la ruta fermentativa. La xilosa no tuvo efecto alguno. En *D. hansenii* no hubo efecto cuantificable por parte de glucosa ni xilosa en ninguno de los inóculos (Fig. 35).

En *K. marxianus* la adición de glucosa provocó un aumento de la fluorescencia el cual fue agotado en aquellas células crecidas en medio YPX. Al agregar xilosa se observó un efecto tardío de producción de NADH o NADPH únicamente en las células inoculadas en YPX. *Z. bailii* presentó un pico de fluorescencia al adicionar glucosa y al igual que con *K. marxianus*, la xilosa tuvo un efecto retardado sólo en las células provenientes de YPX. Para el caso de *C. lusitanae* se presentó el pico de fluorescencia tras la adición de glucosa; sin embargo, la adición de xilosa provocó un efecto contrario al de las otras dos levaduras (*K. marxianus* y *Z. bailii*). El aumento de fluorescencia sólo se presentó en las células crecidas en YPD también con un tiempo de retraso en comparación con el causado por la glucosa (Fig. 36).

El efecto tardío que presentó la xilosa en las levaduras con inóculo en YPX es congruente con la producción de etanol a partir de xilosa que logran estos géneros (*K. marxianus* y *Z. bailii*). No obstante el efecto en *C. lusitanae* no se observa en la producción de etanol a partir de xilosa porque las cinéticas de fermentación en xilosa provienen de un inóculo también de xilosa.



**Figura 35. Producción de NADH/NADPH en presencia de glucosa o xilosa.** Se observó la reducción del  $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$  por fluorescencia (340-460 nm) en buffer MES-TEA 10 mM pH 6 sin sustrato (-), al agregar glucosa (-) o xilosa (-) 20 mM (al tiempo que indica la flecha) durante 300 s utilizando NaCN (200  $\mu\text{M}$ ) y octil galato (30  $\mu\text{M}$ ) como inhibidores de la respiración. Se utilizaron células (500  $\text{mg mL}^{-1}$ ) ayunadas por 24 h (*C. guilliermondii* 48 h), provenientes de cultivos en medio líquido YPD o YPX de 24 h. Datos representativos de 5 experimentos.



**Figura 36. Producción de NADH/NADPH en presencia de glucosa o xilosa.** Se observó la reducción del  $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$  por fluorescencia (340-460 nm) en buffer MES-TEA 10 mM pH 6 sin sustrato (-), al agregar glucosa (-) o xilosa (-) 20 mM (al tiempo que indica la flecha) durante 300 s utilizando NaCN (200  $\mu\text{M}$ ) y octil galato (30  $\mu\text{M}$ ) como inhibidores de la respiración. Se utilizaron células (500  $\text{mg mL}^{-1}$ ) ayunadas por 24 h provenientes de cultivos en medio líquido YPD o YPX de 24 h. Datos representativos de 5 experimentos.

## 6.7 Respiración

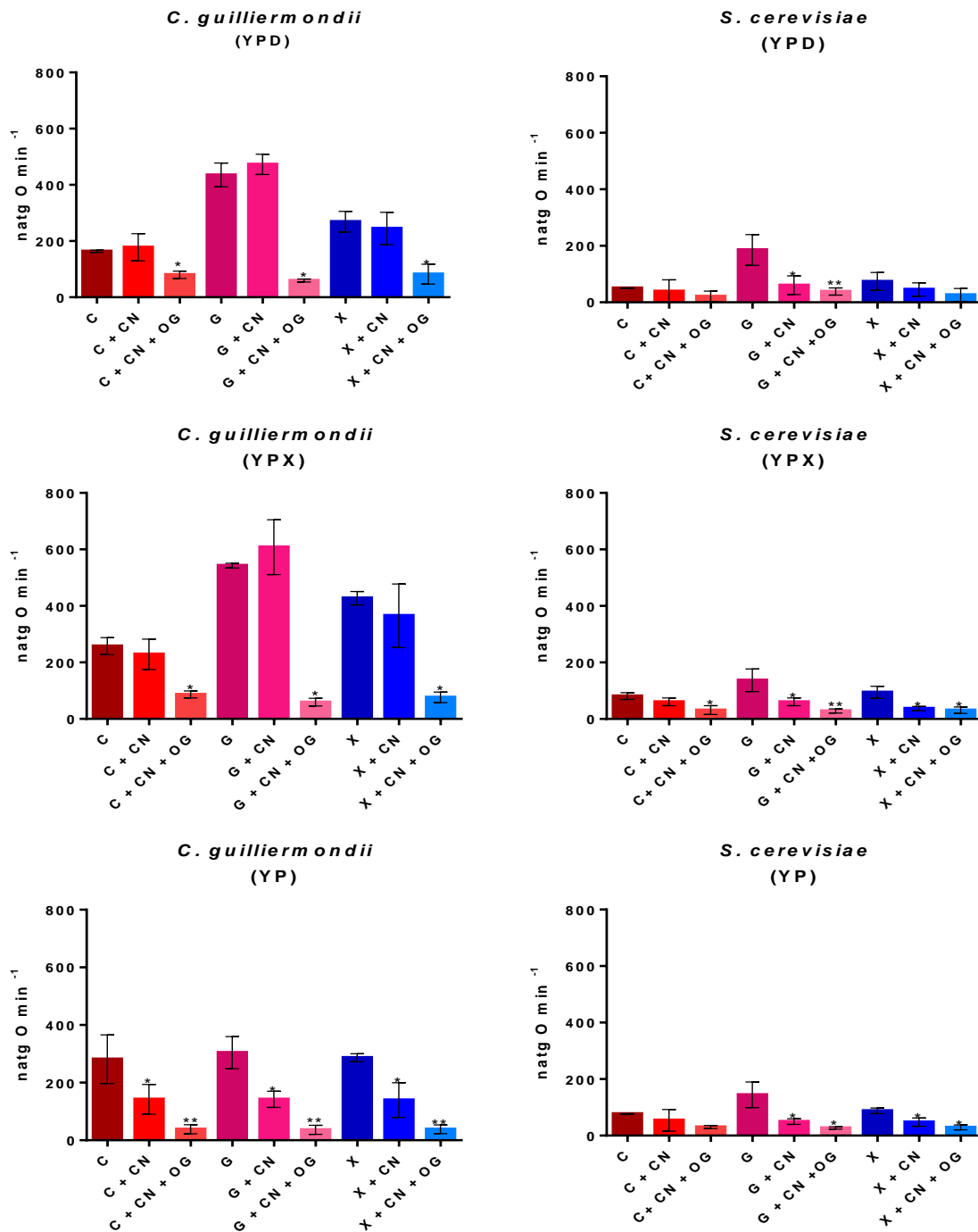
Para observar la producción de NADH o NADPH citosólico se utilizó en primer lugar únicamente cianuro de sodio como inhibidor de la cadena respiratoria en las diferentes levaduras. A pesar de ello, algunas levaduras mostraron aumento en la fluorescencia, por lo que se usó octil galato para inhibir la respiración resistente a cianuro que pudiera estar funcionando en alguna de estas levaduras. Además, se decidió medir el consumo de oxígeno de las diferentes levaduras bajo el efecto de ambos inhibidores en células de levadura ayunadas por 24 h. Las células fueron inoculadas en tres medios (YPD, YPX y YP) para tratar de entender si las diferencias en la respuesta a cianuro y octil galato eran causadas por la fuente de carbono consumida durante el crecimiento.

*C. guilliermondii*, inoculada en medio YPD, presentó una velocidad de consumo de oxígeno, sin adición de sustrato, aproximadamente de 160  $\text{natg O min}^{-1}$  por 50 mg de células, la cual aumentó hasta 220  $\text{natg O min}^{-1}$  en aquellas inoculadas en YPX y hasta de 300  $\text{natg O min}^{-1}$  en las provenientes de YP. Al agregar glucosa la velocidad aumentó en YPD (470  $\text{natg O min}^{-1}$ ) y YPX (600  $\text{natg O min}^{-1}$ ) pero en YP (300  $\text{natg O min}^{-1}$ ) se mantuvo igual. La velocidad de consumo de oxígeno al agregar xilosa también fue mayor a la basal pero no mayor a la velocidad con glucosa como sustrato (269, 427 y 286  $\text{natg O min}^{-1}$ ). Al adicionar cianuro de sodio, se observó un aumento en la velocidad de consumo de oxígeno cuando la glucosa fue el sustrato y solamente en aquellas células provenientes de YPD (472  $\text{natg O min}^{-1}$ ) y YPX (608  $\text{natg O min}^{-1}$ ). Agregando xilosa y cianuro, la velocidad no aumentó. Al añadir el octil galato, la velocidad disminuyó considerablemente sin importar el sustrato o el inóculo. Para *S. cerevisiae* la velocidad de consumo de oxígeno fue muy baja en todos los medios y no aumentó al adicionar cianuro como inhibidor (Fig. 37).

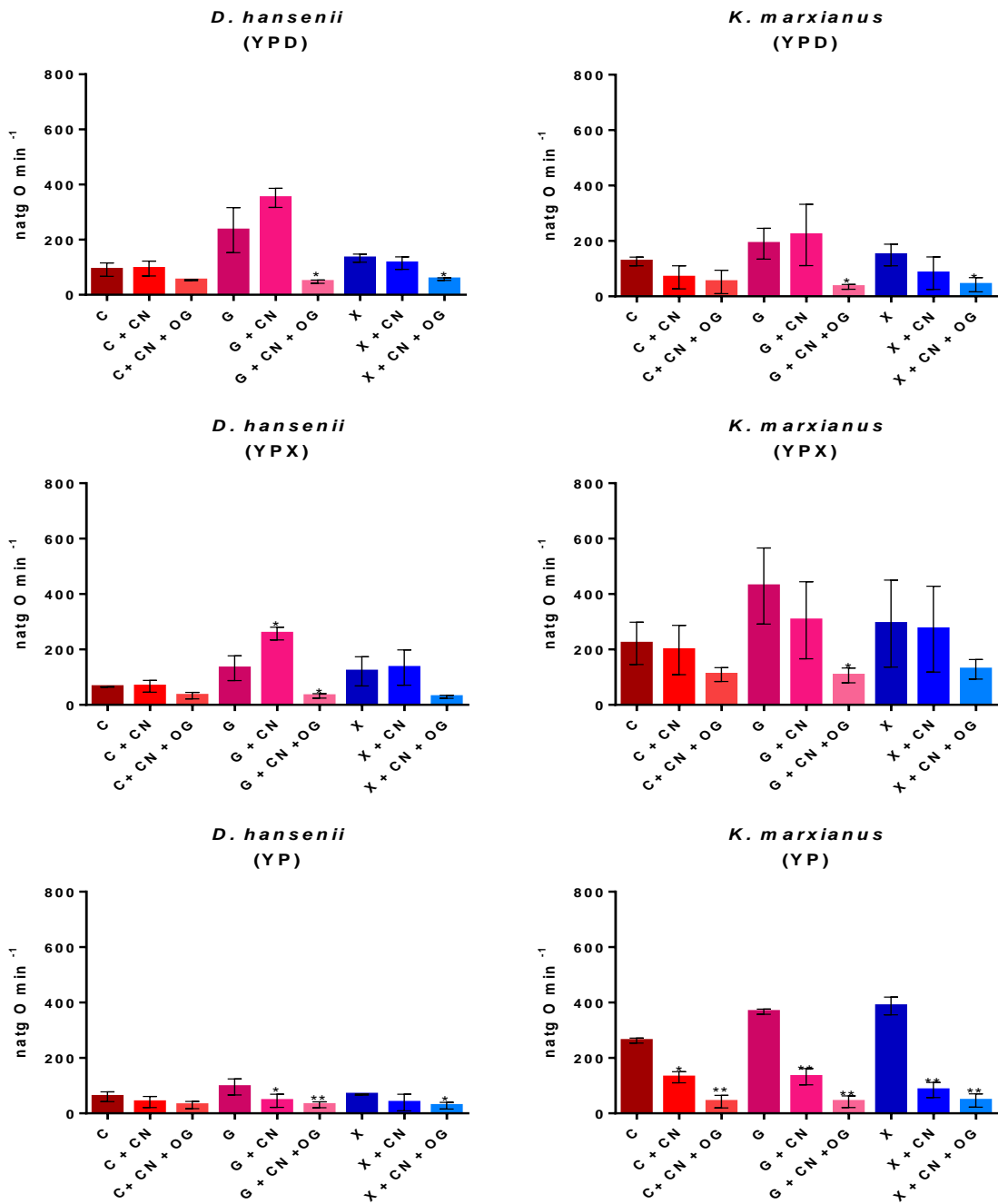
En *D. hansenii* se presentó el mismo efecto como respuesta al cianuro que en *C. guilliermondii*, congruente con la similitud entre estos dos géneros. Para *K. marxianus*, se observó un aumento en la velocidad de consumo de oxígeno en los medios sin glucosa (YPX y YP) al no adicionar inhibidores. Este aumento pareció ser una tendencia a expresar un mecanismo de respuesta al estrés causado por la ausencia de glucosa como fuente de carbono (Fig. 38). Para estas dos levaduras el octil galato también inhibió casi en su totalidad la respiración.

*Z. bailii* presentó baja velocidad de consumo de oxígeno en las células incubadas en YPD sin sustrato y con glucosa o xilosa (126, 190, 150  $\text{natg O min}^{-1}$ ). En las células provenientes de YPX, la velocidad de consumo aumentó en todas las condiciones comparadas con las de YPD (304, 475, 353  $\text{natg O min}^{-1}$ ). Sin embargo, la velocidad aumentó bastante al agregar cianuro (780  $\text{natg O min}^{-1}$  con glucosa y 590  $\text{natg O min}^{-1}$  con xilosa). Estas velocidades disminuyeron considerablemente al agregar octil galato. En *C. lusitaniae*, la velocidad de consumo de oxígeno aumentó al adicionar glucosa sin importar el medio del cual provenía el inóculo. De igual manera hubo inhibición por parte del cianuro y en mayor medida por parte del octil galato (Fig. 39).

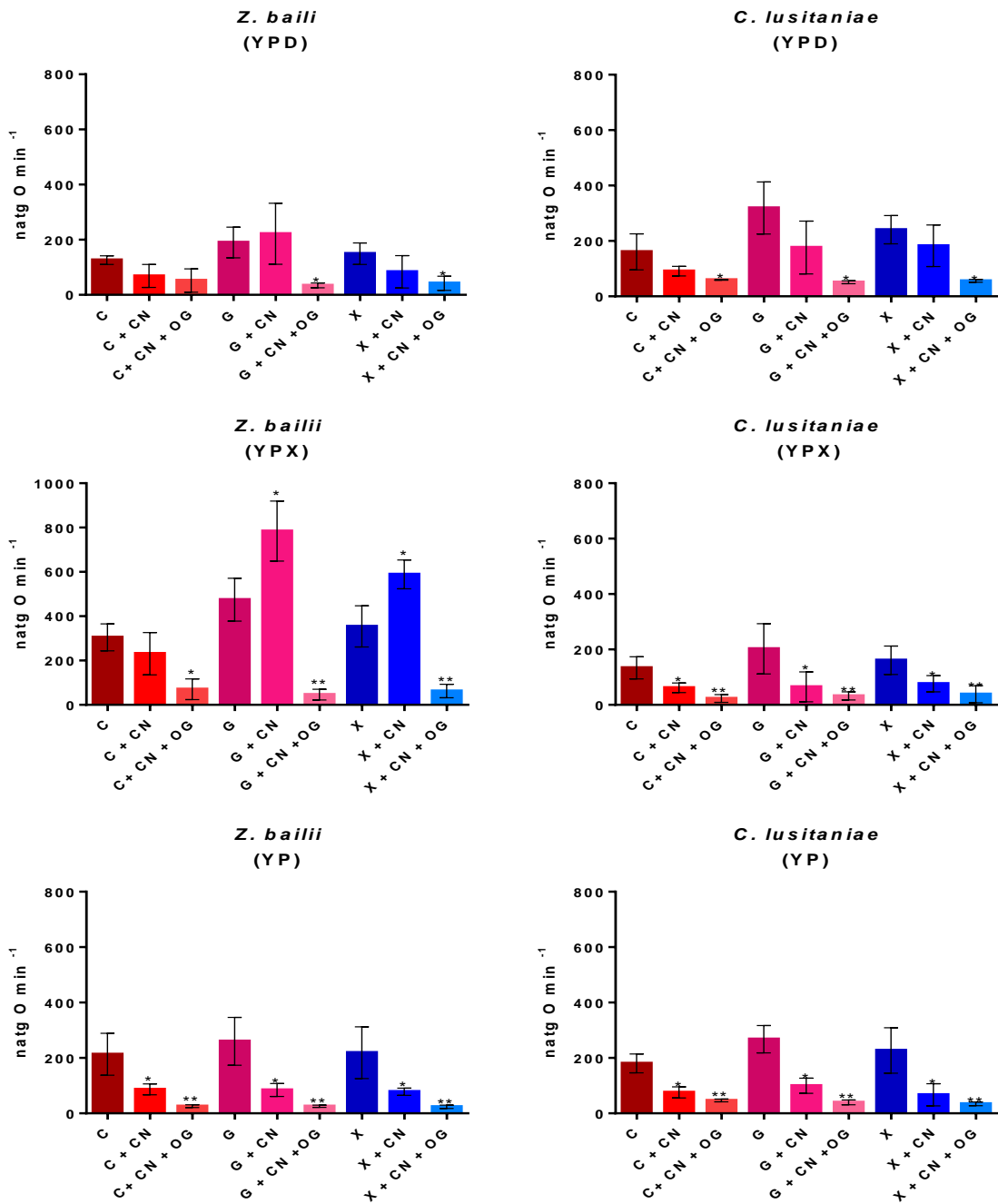




**Figura 37. Consumo de oxígeno en *C. guilliermondii* y *S. cerevisiae*.** Se midió la velocidad de consumo de oxígeno en 5 mL de buffer MES-TEA 10 mM pH6 a 30 °C, sin sustrato, con glucosa 20 mM, o xilosa 20 mM. Así como los efectos del cianuro (NaCN 200  $\mu$ M) y octil galato (30  $\mu$ M). Las velocidades se reportan en natg O min<sup>-1</sup> por 50 mg de células considerando la concentración de oxígeno en la Ciudad de México (400 natg O mL<sup>-1</sup>). Se utilizaron células (500 mg mL<sup>-1</sup>) ayunadas por 24 h provenientes de cultivos en medio líquido YPD, YPX y YP de 24 h. n=3-5. Análisis ANOVA con p < 0.05 realizado en software GraphPad Prism.



**Figura 38. Consumo de oxígeno en *D. hansenii* y *K. marxianus*.** Se midió la velocidad de consumo de oxígeno en 5 mL de buffer MES-TEA 10 mM pH6 a 30 °C, sin sustrato, con glucosa 20 mM, o xilosa 20 mM. Así como los efectos del cianuro (NaCN 200  $\mu$ M) y octil galato (30  $\mu$ M). Las velocidades se reportan en natg O min<sup>-1</sup> por 50 mg de células considerando la concentración de oxígeno en la Ciudad de México (400 natg O mL<sup>-1</sup>). Se utilizaron células (500 mg mL<sup>-1</sup>) ayunadas por 24 h provenientes de cultivos en medio líquido YPD, YPX y YP de 24 h. n= 3-5. Análisis ANOVA con p < 0.05 realizado en software GraphPad Prism.



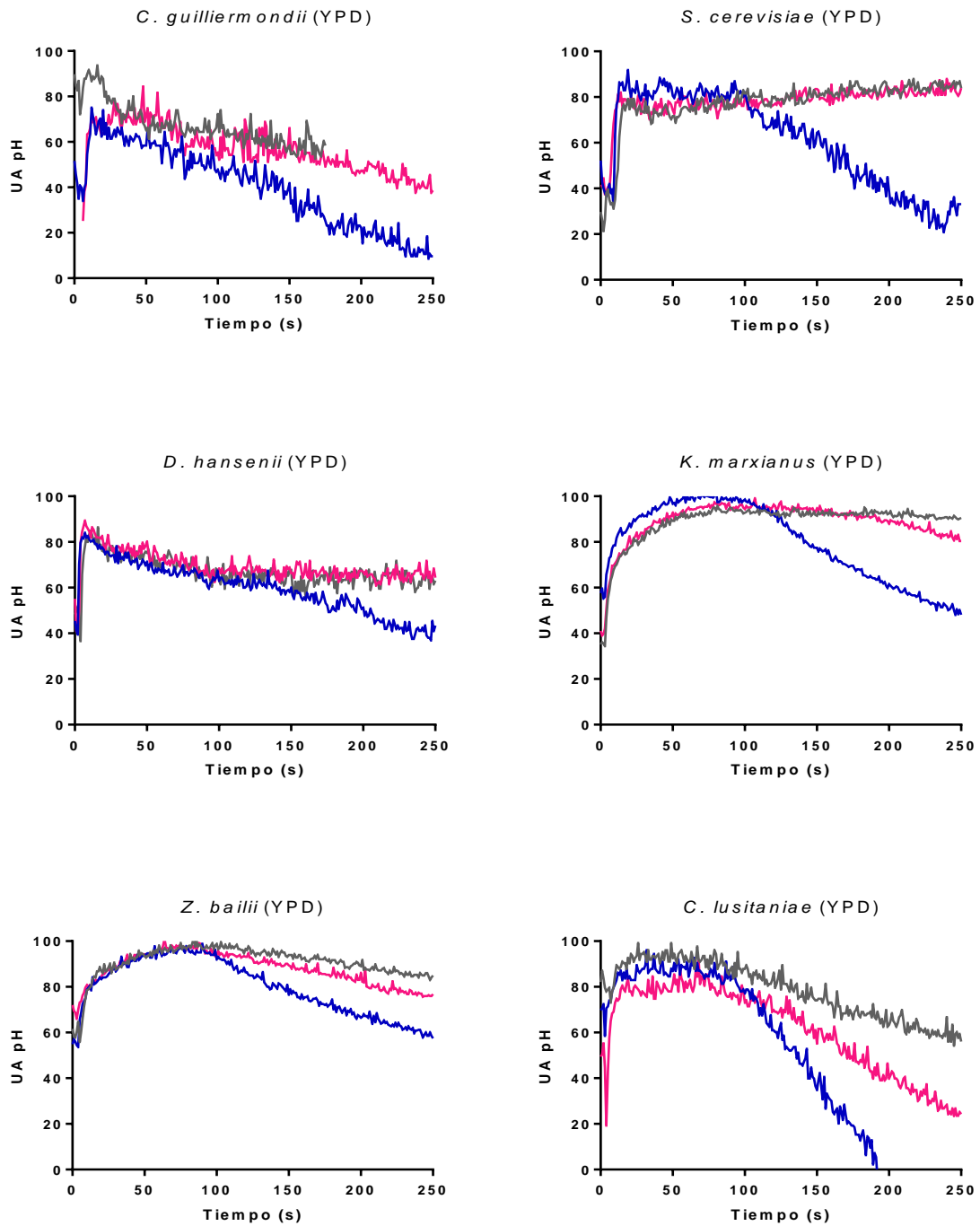
**Figura 39. Consumo de oxígeno en *Z. bailii* y *C. lusitaniae*.** Se midió la velocidad de consumo de oxígeno en 5 mL de buffer MES-TEA 10 mM pH6 a 30 °C, sin sustrato, con glucosa 20 mM, o xilosa 20 mM. Así como los efectos del cianuro (NaCN 200 μM) y octil galato (30 μM). Las velocidades se reportan en natg O min<sup>-1</sup> por 50 mg de células considerando la concentración de oxígeno en la Ciudad de México (400 natg O mL<sup>-1</sup>). Se utilizaron células (500 mg mL<sup>-1</sup>) ayunadas por 24 h provenientes de cultivos en medio líquido YPD, YPX y YP de 24 h. n=3-5. Análisis ANOVA con p < 0.05 realizado en software GraphPad Prism.

## 6.8 Alcalinización del medio

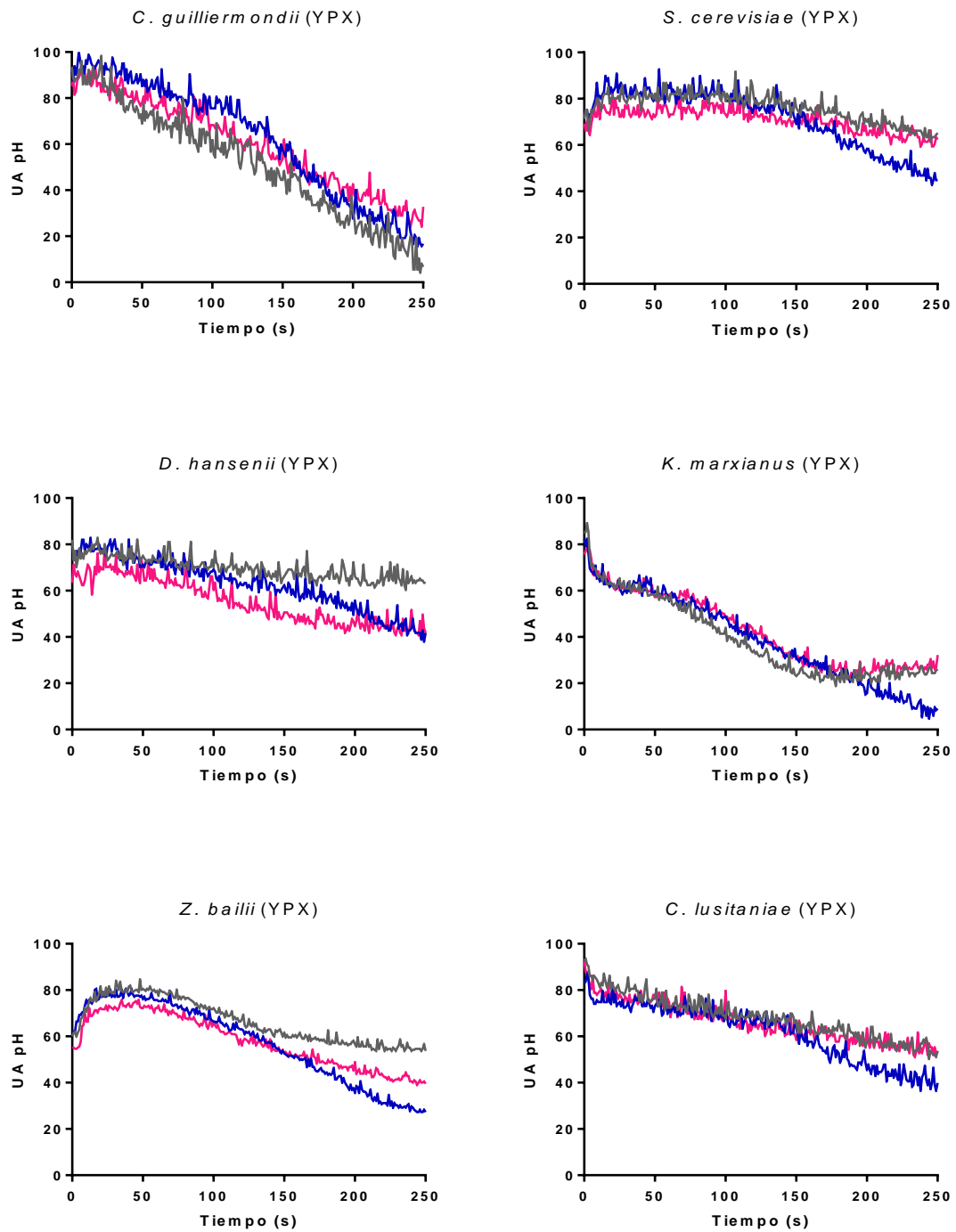
Como una prueba para definir el mecanismo del transporte, se midieron los cambios del pH de un medio con baja capacidad amortiguadora. De existir un simportador  $H^+$ /xilosa, se esperaría que el pH aumentara al agregar el azúcar. Los experimentos se realizaron sin cuantificar los cambios de pH, debido a que sólo se esperaba observar un aumento o disminución arbitrarios dependiente del sustrato adicionado.

Las pruebas se realizaron con células de levaduras crecidas tanto en YPD como YPX durante 24 h ayunadas durante 24 h. Se corrió una prueba sin adicionar algún azúcar como control para verificar que el pH no aumentara por otros factores diferentes a la adición de azúcares. El trazo se siguió durante 250 segundos.

Para las levaduras que provenían de YPD se observó una disminución en el pH del medio posterior a la adición de glucosa (Fig. 40). No obstante, el efecto de la adición de xilosa no difiere de los experimentos control (sin sustrato). En las levaduras con inóculo en YPX, tanto los experimentos control como la adición de glucosa y/o xilosa mostraron una disminución en el pH externo (Fig. 41). Ninguno de estos experimentos demostró la presencia de un simportador  $H^+$ /xilosa en ninguno de los géneros estudiados bajo las condiciones aplicadas.



**Figura 40. Bombeo de protones en presencia de glucosa o xilosa.** Se observaron los cambios de pH en volts sin sustrato (-), con glucosa (-) o xilosa (-) adicionadas a los 100 s en buffer MES-TEA 10 mM pH 6. Se siguió el trazo durante 250 s. Se utilizaron células (50 mg/mL) ayunadas por 24 h provenientes de cultivos en medio líquido YPD de 24 h. Datos representativos de 3 experimentos.



**Figura 41. Bombeo de protones en presencia de glucosa o xilosa.** Se observaron los cambios de pH en volts sin sustrato (-), con glucosa (-) o xilosa (-) adicionadas a los 100 s en buffer MES-TEA 10 mM pH 6. Se siguió el trazo durante 250 s. Se utilizaron células (50 mg/mL) ayunadas por 24 h provenientes de cultivos en medio líquido YPD de 24 h. Datos representativos de 3 experimentos.

## 7 Discusión

### 7.1 Asimilación de fuentes de carbono

Las pruebas de asimilación de ambas fuentes de carbono permiten identificar las levaduras que pueden transportar y metabolizar xilosa, y también son una prueba para discernir si alguna levadura que presenta crecimiento en medio con xilosa lo hace debido a otros factores.

En las figuras 6 y 7 se aprecia que el inóculo en YPD o YPX únicamente mostró diferencias en el crecimiento en medio con xilosa para *C. lusitaniae*. Sin embargo, en las figuras 8 y 9 se observa que *D. hansenii*, *C. lusitaniae* y *S. cerevisiae* son incapaces de crecer en medio mínimo con xilosa en 48 horas. Esto es contrario a lo reportado para levaduras del género *Clavispora* (Nigam et al., 1985) y *D. hansenii* (Amaral-Collaco et al., 1989) que se encuentran entre las mejores para convertir rápidamente xilosa a etanol y/o xilitol. Es necesario señalar que es probable que en nuestros experimentos no presentaran crecimiento debido a la temperatura que se utilizó (30°C) y a los requerimientos de oxígeno en la caja de Petri.

### 7.2 La xilosa como fuente de carbono para el crecimiento

Es notable que todas las levaduras mostraron preferencia por un medio rico en glucosa, pero a pesar de ello sí hubo crecimiento en todas las cepas en medio con 20 g L<sup>-1</sup> de xilosa, aunque con velocidades máximas diferentes. El comportamiento en medio líquido fue congruente con los resultados obtenidos en el crecimiento en caja donde solamente 3 géneros presentaron crecimiento (*C. guilliermondii*, *K. marxianus* y *Z. bailii*). Estas levaduras mostraron velocidades de crecimiento muy similares en medio YPX. *C. guilliermondii* no mostró diferencia en su crecimiento para ninguno de los medios complejos, lo cual puede significar que no tiene preferencia por algún azúcar en particular y puede transportar y metabolizar ambos.

### 7.3 Parámetros cinéticos a diferente pH

Las velocidades máximas de crecimiento en YPD mostraron valores desde  $0.574 \text{ h}^{-1}$  hasta  $1.093 \text{ h}^{-1}$ , mientras que en medios YPX fueron desde  $0.492 \text{ h}^{-1}$  hasta  $1.177 \text{ h}^{-1}$ , las cuales son mayores que las reportadas por Furlan et al., 1994 para *P. stiptis* en medio con  $20 \text{ g L}^{-1}$  de xilosa con valores de  $0.21\text{-}0.5 \text{ h}^{-1}$  y a los obtenidos en *C. tropicalis* de  $0.465 \text{ h}^{-1}$  (Sánchez et al., 2007).

En YPD, el rendimiento de biomasa producida por gramo consumido de glucosa fue similar en todas las levaduras a todos los pH, excepto para *Z. bailii* a pH 6 en la que fue mayor que en todas las anteriores. En comparación con el rendimiento de biomasa obtenido a partir de xilosa, éste es mayor para la mayoría de las cepas, a excepción de *S. cerevisiae* y *D. hansenii*, las cuales presentaron dificultad para crecer en los medios con xilosa (Tabla 10 y 12). La biomasa máxima producida en medios con xilosa es hasta de  $8.5 \text{ g L}^{-1}$  con rendimientos biomasa/sustrato de hasta  $0.4 \text{ g g}^{-1}$ . Furlan et al. (1997) reportan para *C. parapsilopsis* producción de biomasa de hasta  $6.1 \text{ g L}^{-1}$  en 126 h y un rendimiento final de  $0.28 \text{ g g}^{-1}$ . Preziosi-Belloy et al. (2000) reportaron en *C. guilliermondii* rendimientos de  $0.1$  y  $0.3 \text{ g g}^{-1}$  de biomasa. Diz et al. (2002) obtuvieron en cepas de *D. hansenii* valores de biomasa máxima de  $6 \text{ g L}^{-1}$  en más de 90 h de fermentación. Mussatto et al. (2006) reportan un rendimiento de biomasa de  $0.05 \text{ g g}^{-1}$  en *C. guilliermondii*.

Con esto se prueba que nuestras levaduras aún en condiciones no óptimas de crecimiento y fermentación, son buenas productoras de biomasa a partir de  $20 \text{ g L}^{-1}$  de xilosa durante 48 h. Posiblemente al alargar el tiempo de fermentación los rendimientos de xilitol y/o etanol se incrementarían.



Tabla 10. Rendimientos obtenidos en medio YPD con pH ajustado.

	$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	$X_{\text{máx}} (\text{g L}^{-1})$	$Y_{x/s} (\text{g g}^{-1})$
<b>Cg 4</b>	$0.863 \pm 0.05$	$4.906 \pm 1.79$	$0.16 \pm 0.07$
<b>Cg 6</b>	$1.093 \pm 0.02$	$5.366 \pm 2.23$	$0.17 \pm 0.08$
<b>Sc 4</b>	$0.836 \pm 0.10$	$4.333 \pm 2.44$	$0.11 \pm 0.06$
<b>Sc 6</b>	$0.901 \pm 0.08$	$5.500 \pm 0.91$	$0.18 \pm 0.02$
<b>Dh 4</b>	$0.574 \pm 0.18$	$2.700 \pm 0.55$	$0.09 \pm 0.01$
<b>Dh 6</b>	$0.595 \pm 0.15$	$3.400 \pm 0.81$	$0.11 \pm 0.02$
<b>Km 4</b>	$0.969 \pm 0.10$	$3.066 \pm 1.66$	$0.20 \pm 0.04$
<b>Km 6</b>	$1.026 \pm 0.12$	$3.366 \pm 1.06$	$0.12 \pm 0.05$
<b>Zb 4</b>	$1.017 \pm 0.25$	$6.100 \pm 2.44$	$0.28 \pm 0.10$
<b>Zb 6</b>	$0.856 \pm 0.13$	$3.766 \pm 2.82$	$0.47 \pm 0.10$
<b>Cl 4</b>	$0.979 \pm 0.07$	$3.600 \pm 1.13$	$0.29 \pm 0.09$
<b>Cl 6</b>	$0.862 \pm 0.07$	$4.150 \pm 0.07$	$0.26 \pm 0.17$

Tabla 11. Rendimientos obtenidos en medio YPD con pH ajustado (2).

	$Y_{p/s} (\text{g g}^{-1})$	Etanol ( $\text{g L}^{-1}$ )	$Q_s (\text{g (g h}^{-1}))$
<b>Cg 4</b>	$0.59 \pm 0.11$	$10.73 \pm 2.26$	$0.014 \pm 0.0002$
<b>Cg 6</b>	$0.58 \pm 0.14$	$11.3 \pm 0.93$	$0.014 \pm 0.0016$
<b>Sc 4</b>	$0.58 \pm 0.07$	$11.94 \pm 3.12$	$0.016 \pm 0.002$
<b>Sc 6</b>	$0.51 \pm 0.11$	$12.99 \pm 4.31$	$0.014 \pm 0.003$
<b>Dh 4</b>	$0.26 \pm 0.06$	$6.46 \pm 1.08$	$0.007 \pm 0.001$
<b>Dh 6</b>	$0.24 \pm 0.01$	$6.06 \pm 0.67$	$0.006 \pm 0.0004$
<b>Km 4</b>	$0.50 \pm 0.05$	$8.55 \pm 3.96$	$0.014 \pm 0.001$
<b>Km 6</b>	$0.50 \pm 0.02$	$14.08 \pm 4.4$	$0.014 \pm 0.0008$
<b>Zb 4</b>	$0.51 \pm 0.05$	$15.11 \pm 2.72$	$0.014 \pm 0.0016$
<b>Zb 6</b>	$0.45 \pm 0.09$	$13.88 \pm 1.74$	$0.012 \pm 0.002$
<b>Cl 4</b>	$0.4 \pm 0.15$	$9.20 \pm 2.69$	$0.011 \pm 0.004$
<b>Cl 6</b>	$0.38 \pm 0.07$	$8.37 \pm 0.67$	$0.010 \pm 0.002$

Tabla 12. Rendimientos obtenidos en medio YPX con pH ajustado.

	$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$X_{\text{máx}}$ ( $\text{g L}^{-1}$ )	$Y_{\text{x/s}}$ ( $\text{g g}^{-1}$ )	$Y_{\text{p/s}}$ ( $\text{g g}^{-1}$ )	Xilitol ( $\text{g L}^{-1}$ )
<b>Cg 4</b>	1.062 ± 0.08	7.933 ± 1.70	0.34 ± 0.06	0.28 ± 0.04	3.87 ± 0.41
<b>Cg 6</b>	1.117 ± 0.04	7.100 ± 1.30	0.44 ± 0.06	0.19 ± 0.08	4.07 ± 0.06
<b>Sc 4</b>	1.018 ± 0.03	3.500 ± 0.51	0.12 ± 0.04	0.04 ± 0.04	0.33 ± 0.12
<b>Sc 6</b>	0.492 ± 0.03	3.766 ± 0.68	0.21 ± 0.03	0.01 ± 0.008	0.40 ± 0.29
<b>Dh 4</b>	0.877 ± 0.09	5.300 ± 0.96	0.22 ± 0.07	0.10 ± 0.04	1.77 ± 0.73
<b>Dh 6</b>	0.640 ± 0.19	4.100 ± 1.21	0.15 ± 0.04	0.16 ± 0.05	3.15 ± 0.37
<b>Km 4</b>	1.077 ± 0.04	8.500 ± 0.10	0.36 ± 0.15	0.18 ± 0.07	3.88 ± 0.08
<b>Km 6</b>	0.946 ± 0.25	7.433 ± 1.93	0.28 ± 0.16	0.15 ± 0.04	3.95 ± 0.40
<b>Zb 4</b>	1.324 ± 0.23	7.266 ± 1.02	0.27 ± 0.07	0.11 ± 0.04	2.77 ± 0.90
<b>Zb 6</b>	0.917 ± 0.31	8.600 ± 1.31	0.27 ± 0.14	0.13 ± 0.06	3.75 ± 0.27
<b>Cl 4</b>	1.010 ± 0.11	5.500 ± 1.27	0.43 ± 0.05	0.17 ± 0.09	3.80 ± 0.18
<b>Cl 6</b>	0.940 ± 0.07	4.500 ± 0.70	0.32 ± 0.12	0.19 ± 0.10	1.64 ± 0.70

Tabla 13. Rendimientos obtenidos en medio YPX con pH ajustado (2).

	$Y_{\text{p/s}}$ ( $\text{g g}^{-1}$ )	Etanol ( $\text{g L}^{-1}$ )	Qs xilitol ( $\text{g (g h}^{-1}\text{)})$	Qs etanol ( $\text{g (g h}^{-1}\text{)})$
<b>Cg 4</b>	0	0	0.0058 ± 0.0009	0
<b>Cg 6</b>	0	0	0.0041 ± 0.0017	0
<b>Sc 4</b>	0	0	0.0008 ± 0.0007	0
<b>Sc 6</b>	0	0	0.0005 ± 0.0003	0
<b>Dh 4</b>	0	0	0.0021 ± 0.0010	0
<b>Dh 6</b>	0	0	0.0024 ± 0.0020	0
<b>Km 4</b>	0.10 ± 0.06	2.20 ± 0.81	0.0037 ± 0.0015	0.0022 ± 0.0015
<b>Km 6</b>	0.07 ± 0.04	1.72 ± 0.62	0.0032 ± 0.0009	0.0013 ± 0.0009
<b>Zb 4</b>	0.04 ± 0.01	1.12 ± 0.49	0.0024 ± 0.0009	0.0008 ± 0.0002
<b>Zb 6</b>	0.05 ± 0.02	1.60 ± 0.15	0.0028 ± 0.0012	0.0010 ± 0.0004
<b>Cl 4</b>	0	0	0.0037 ± 0.0019	0
<b>Cl 6</b>	0	0	0.0040 ± 0.0022	0

El rendimiento de etanol fue de hasta 0.6 g etanol por g glucosa, con concentraciones finales de hasta 17 g L<sup>-1</sup> para la mayoría de las levaduras en ambos pH. Para *D. hansenii* cuyo metabolismo es preferentemente respiratorio (Sánchez et al., 2006), estos valores fueron muy bajos. El rendimiento de etanol producido a partir de xilosa fue de apenas 0.1 g etanol/ g xilosa y únicamente se presentó en las cepas de *K. marxianus* y *Z. bailii* con concentraciones finales de etanol de hasta 3 g L<sup>-1</sup>. Se han reportado distintas cepas de *K.*

*marxianus* que alcanzan concentraciones de etanol a partir de xilosa de hasta 3.1 g L<sup>-1</sup> en 48 horas de fermentación, mientras que para algunas cepas de *C. guilliermondii* no es detectable alguna concentración de etanol a las 48 horas pero sí a las 24 horas de aproximadamente 0.75 g L<sup>-1</sup> (Barbosa et al., 1988). Para *Z. bailii* no existen reportes de producción de etanol a partir de xilosa, aunque los resultados obtenidos son cercanos a aquellos en *K. marxianus* (Fig. 25 y 27) (Tabla 11 y 12).

Aunque la producción de etanol a partir de xilosa es muy baja comparada con aquella a partir de glucosa, se esperaría que la producción de xilitol fuera comparable por lo menos para las cepas reconocidas como buenas productoras de xilitol (*C. guilliermondii* y *D. hansenii*). Ojamo et al. (1994) y Roberto et al. (1999); reportan rendimientos xilitol/xilosa de hasta 0.78 para *C. guilliermondii* con concentraciones iniciales de xilosa de 250 y 62 g L<sup>-1</sup>, no obstante Hallborn et al. 1991 y 1994 reportan rendimientos de 0.95 y 0.81 para una cepa recombinante de *S. cerevisiae*. Zhang et al. 2014, obtuvieron transformantes de *K. marxianus* con rendimientos de producción de xilitol de hasta 0.83 g g<sup>-1</sup>. De igual manera Prakash et al. (2011) reportan para *D. hansenii* rendimientos de 0.78-0.82 g g<sup>-1</sup> en 108 horas de fermentación con 50 y 100 g L<sup>-1</sup> de xilosa respectivamente. La máxima concentración de xilitol que se reporta en este trabajo es de 4 g/L en *C. guilliermondii*, *K. marxianus* y *C. lusitaniae* (pH 4); a las 48 horas de fermentación. Varios autores reportan concentraciones de 16 g L<sup>-1</sup> para *C. guilliermondii* y 5 g L<sup>-1</sup> para *K. marxianus* a partir de 20 g L<sup>-1</sup> de xilosa (Barbosa et al., 1988); de hasta 71.2 g L<sup>-1</sup> para *D. hansenii* con 156 h de fermentación a 40 °C (Prakash et al. 2011). Preziosi-Belloy et al. (2000) obtienen en *C. guilliermondii* rendimientos de 0.4-0.8 g g<sup>-1</sup> de xilitol, así como 0.27 g g<sup>-1</sup> de etanol. Diz et al. (2002) obtuvieron en cepas de *D. hansenii* valores de 15.83 g L<sup>-1</sup> de xilitol con rendimiento de 0.6-0.8 g g<sup>-1</sup> y 1.75 g L<sup>-1</sup> de etanol en más de 90 h de fermentación. Mussatto et al. (2006) reportan un rendimiento de xilitol de 0.68 g g<sup>-1</sup> en *C. guilliermondii*.

No obstante los rendimientos de xilitol a partir de xilosa obtenidos en este trabajo fueron muy bajos y muy cercanos entre todas las levaduras (con excepción de *S. cerevisiae*, control negativo), esto puede atribuirse a la baja concentración de xilosa utilizada, así como los requerimientos de oxígeno que la conversión del azúcar implica.

Los valores de productividad de etanol a partir de glucosa son similares para todas las cepas, excepto para *D. hansenii* cuya productividad de etanol es del 50% del valor de las demás (Tabla 11). La productividad de etanol a partir de xilosa en *K. marxianus* y *Z. bailii*

es 10 veces menor que a partir de glucosa. En cuanto la de xilitol a partir de xilosa sigue siendo menor que aquella de etanol a partir de glucosa (Tabla 13).

*C. guilliermondii*, utilizada como control positivo, fue la levadura con mejor productividad de xilitol en 48 horas de fermentación (Tabla 13). Aun así, *Z. bailii* y *C. lusitaniae* se perfilan como buenas productoras de xilitol, siempre y cuando se encuentren las condiciones óptimas de crecimiento, mantenimiento y producción para cada una. *C. lusitaniae* fue la única levadura con bajo crecimiento en medio sólido que en medio líquido y con pH ajustado tanto 4 como 6, logró incrementar su crecimiento y producción de xilitol.

El tiempo de consumo de sustrato es bastante diferentes para cada azúcar. Todas las levaduras consumieron los 20 g L<sup>-1</sup> de glucosa entre 10 y 12 horas con velocidades de aproximadamente 2 g (L h)<sup>-1</sup>. Para el caso de xilosa, ninguna de las levaduras la consumió después de 48 horas de fermentación y la velocidad de consumo fue de hasta 1 g (L h)<sup>-1</sup>. Se encuentran reportes de cepas de *C. guilliermondii* que consumen del 95 al 100 % de la xilosa utilizada, *K. marxianus* del 91 al 97 % (Barbosa et al., 1988); *D. hansenii* del 62 % (Pal et al., 2013) en 48 h. Los resultados obtenidos son también evidencia de la baja eficiencia del transporte del azúcar, así como de los obstáculos intrínsecos de la ruta metabólica de xilosa.

Se logró comprobar que existen géneros de levaduras que pueden metabolizar tanto glucosa como xilosa; sin embargo, otros presentan dificultades para utilizarlas como sustrato fermentativo debido a la maquinaria enzimática presente y la preferencia por rutas fermentativas o respiratorias.

## 7.4 El transporte y acumulación de azúcares

De los experimentos se llegó a conocer que las 6 cepas crecen en medio con glucosa y algunas presentan crecimiento en medio con xilosa; sin embargo, al estudiar sus capacidades para transportar ambos azúcares se puede nueva caracterizar a cada una de las levaduras como transportadora de hexosas, pentosas o ambas.

Existen varios reportes sobre la  $K_m$  del transporte de glucosa y xilosa en ciertos géneros de levadura. Algunos mencionan que ésta es 8 veces menor para glucosa que para xilosa en *D. hansenii* (Nobre et al., 1999). Para algunas *S. cerevisiae* recombinantes las  $K_m$  para

el transporte de xilosa son de hasta 143 mM con  $V_{\text{máx}}$  de  $10 \text{ mmol (g h)}^{-1}$  y para *C. intermedia* PYCC 4715 una  $K_m$  de 0.2 mM y  $V_{\text{máx}}$  de  $1 \text{ mmol (g h)}^{-1}$  (Gárdonyi et al., 2002, 2003). Estos valores cambian dependiendo del sustrato en el que sean crecidas las células, así como las condiciones de cultivo, debido a que bajo represión por glucosa las células muestran un transportador de baja afinidad por xilosa operado por difusión facilitada, mientras que se ha reportado que en algunas cepas de *D. fabryi* y *D. hansenii* cultivadas en xilosa o glucosa y ayunadas muestran un transporte por simportador protón/azúcar de alta afinidad (Ferreira et al., 2013).

En este estudio se utilizaron células crecidas en el mismo azúcar en el cual se midió el transporte después de un ayuno de 12 horas. Esto permitió observar que para glucosa a pH 4, *S. cerevisiae* tiene la  $V_{\text{máx}}$  mayor. Para el caso de pH 6, fue *K. marxianus* la que presentó una  $V_{\text{máx}}$  mayor. A estas condiciones de crecimiento es *D. hansenii* la que presentó mayor afinidad por la glucosa, independientemente del pH utilizado.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en el transporte de xilosa bajo las mismas condiciones obtenemos que, las velocidades máximas no pasan de los  $22 \mu\text{mol (g min)}^{-1}$ , y las  $K_m$  no son menores de  $1.1 \mu\text{M}$ . En este caso es *C. guilliermondii* presentó la mayor  $V_{\text{máx}}$  en ambos pH con las  $K_m$  más bajas, lo que la convierte en la mejor cepa para continuar con el estudio de una proteína transportadora de xilosa en levaduras.

Aunque hay diferencia de afinidades entre los diferentes pH y en algunas cepas es mayor al pH bajo, ello no es evidencia suficiente de la existencia de un simportador protón-xilosa en ninguna de ellas.

## 7.5 Reducción del NAD<sup>+</sup>.

Bruinenberg et al., (1983), concluyen que la utilización anaeróbica de xilosa lleva intrínsecamente a un cambio del balance redox, que evita una rápida fermentación alcohólica. Siendo ésta la principal razón de la producción de xilitol y no etanol en ciertas cepas, es necesario conocer el estado redox de las células al agregar xilosa al medio. Las levaduras con altas tasas de fermentación alcohólica, como *S. cerevisiae*, agotan y reoxidan rápidamente el NADH formado al añadir glucosa, porque su metabolismo lleva a la producción de acetaldehído, que es rápidamente reducido a etanol, con la reoxidación de este nucleótido. En presencia de xilosa, no actúan las mismas enzimas, por lo cual no

se genera la misma cantidad de NADH al instante. Siendo la transformación a xilitol el primer paso del metabolismo de la xilosa en las levaduras, la enzima xilosa reductasa requiere NADPH y en el paso subsecuente, la conversión a xilulosa, se genera NADH por la xilitol deshidrogenasa (Verduyn, et al., 1985). La alta producción de xilitol se da porque se produce una acumulación de NADH y se inhibe la enzima xilitol deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup>. Este fenómeno es conocido como el Efecto Custer, resultado de la incapacidad de las levaduras para compensar el exceso de NADH y que no tienen actividad de transhidrogenasa (Van Dijken et al., 1986).

Si bien se observó una diferencia en la producción de NADH/NADPH posterior a la adición de glucosa en las cepas con inóculo en YPD y YPX, esta diferencia, aunque no inmediata, tras la adición de xilosa sólo se observó en 3 casos: *C. lusitaniae* con inóculo en YPD, *K. marxianus* y *Z. bailii* con inóculo en YPX.

El efecto tardío que presentó la xilosa en las levaduras con inóculo en YPX es congruente con la producción de etanol a partir de xilosa que logran estos géneros. No obstante, el efecto en *C. lusitaniae* no se observa en la producción de etanol porque las cinéticas de fermentación en xilosa provienen de un inóculo también de xilosa.

## 7.6 Consumo de oxígeno y efectos de inhibidores de cadena respiratoria

La cuantificación del consumo de oxígeno por los diferentes géneros bajo las diferentes condiciones presentó resultados diversos y característicos de cada levadura. En primer lugar se observó que la levadura modelo *S. cerevisiae* al ser fermentativa presentó bajos niveles de respiración en todas las condiciones, al igual que *C. lusitaniae* que también resultó buena productora de etanol a partir de glucosa. Al contrario, *C. guilliermondii* tuvo una respiración elevada en todos los medios y con ambos azúcares. Para las cepas de *K. marxianus* y *Z. bailii* el cambio de inóculo de YPD a YPX logró que aumentaran sus velocidades de consumo de oxígeno tanto con glucosa como xilosa como sustrato. *D. hansenii*, a pesar de tener preferencia por un metabolismo respiratorio, mostró bajas velocidades de consumo de oxígeno en todas las condiciones.

Se comprobó que el medio de cultivo utilizado como inóculo sí representa un factor a considerar para cuantificar el consumo de oxígeno, ya que dependiendo de la fuente de carbono utilizada previamente se promueven o inhiben rutas fermentativas o respiratorias propias de cada género. El inóculo en YP únicamente promovió la respiración en la cepa de *K. marxianus*, por lo que las diferencias en velocidades de consumo de oxígeno entre las levaduras se deben a los efectos de la glucosa y la xilosa como fuente de carbono.

En cuanto a los efectos del cianuro y el octilgalato sobre la capacidad respiratoria de cada género, se obtuvieron resultados congruentes con la literatura y algunos otros no estudiados previamente.

Se ha propuesto que la respiración resistente a cianuro (CRR, Cyanide-resistant respiration) podría servir como una función reguladora del sobre flujo del exceso de electrones cuando la vía de citocromos está saturada o limitada, esto por acción de una oxidasa alterna (AOX). Se propone también, que dicha respiración es inducida bajo diferentes condiciones de estrés como un mecanismo que les permite sobrevivir. Levaduras de los géneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia* y *Yarrowia* presentan este tipo de respiración en diferentes condiciones (Fig. 42) (McIntosh et al., 1998; Camougrand et al. 1991; Zimmer et al., 1997; Akimenko et al., 1979).

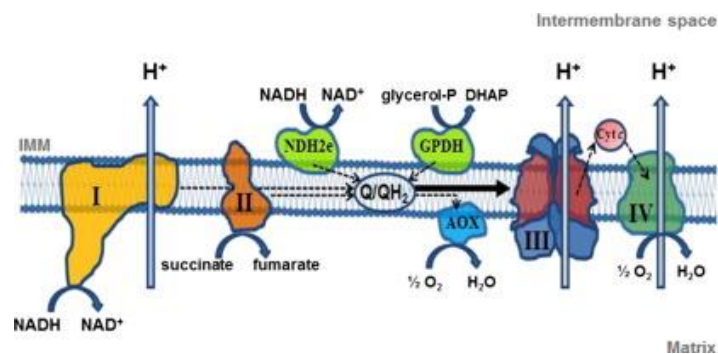


Figura 42. Cadena respiratoria ramificada en *D. hansenii*. (Tomado de Cabrera-Orefice et al., 2014).

Las cepa utilizada de *D. hansenii* en este estudio sí presentó una respiración resistente a cianuro en inóculo YPX, aunque únicamente cuando la glucosa fue utilizada como sustrato.

La CRR se reporta como ausente en levaduras Crabtree-positivo (Veiga et al., 2000) tales como *Z. bailii* y *S. cerevisiae*. En *K. marxianus*, a pesar de ser Crabtree-negativa, estos

autores no reportan una respiración resistente a cianuro. Tales resultados son contrarios los obtenidos con nuestra cepa de *Z. bailii* en las cuales se observó una respiración resistente a cianuro en aquellas provenientes de medio YPX con glucosa y xilosa como sustrato.

La expresión de una oxidasa alterna en aquellas levaduras inoculadas en YPX podría explicarse por un desabasto de ATP resultado del transporte de alta afinidad de xilosa, el cual consume 1 mol de ATP por cada protón co-transportado (Weusthuis et al., 1993). Sin embargo, dicho estrés puede deberse también al desequilibrio redox provocado en los primeros pasos de la conversión de xilosa a xilitol, pues nuestros experimentos señalan que muy probablemente, tal cotransporte H<sup>+</sup>/xilosa no existe.

## 7.7 La no alcalinización del medio

De existir un simportador protón-xilosa para transportar la xilosa a las células bajo condiciones de ayuno, se esperaría que el medio exterior se alcalinizara al realizarse dicho transporte. La presencia de un simportador protón-xilosa en levaduras del género *Rhodotorula* ha sido reportada por Höfer et al. (1978) y Kilian et al. (1993) por alcalinización del medio al adicionar xilosa como sustrato a levaduras ayunadas.

Las condiciones de estudio de nuestras cepas para elucidar si existe un simportador dieron resultados negativos. Sin embargo, algunos otros autores afirman que la ausencia de una alcalinización observable no puede ser tomada como evidencia de la ausencia de un simportador (Prasad & Höfer, 1987; Loureiro-Dias, 1988). Lo anterior puede deberse a la baja velocidad del transporte de la xilosa, que implicaría un cambio de pH del medio que no se observa.

Existe en las bases de datos una secuencia de simportador protón-xilosa (Xylhp) en *D. hansenii* CBS 767, la cual no ha sido confirmada. No obstante, al realizar un BLAST para encontrar una secuencia similar en las levaduras utilizadas no se encontró ningún resultado positivo.



## 8 Conclusiones

Con los resultados obtenidos se puede concluir que los diferentes géneros de levaduras utilizados muestran comportamientos diferentes en glucosa y xilosa, pero no al modificar el pH.

La levadura que se utilizó como control positivo, *C. guilliermondii*, es efectivamente la que presenta mejores resultados tanto de crecimiento, transporte y asimilación de xilosa; así como producción de xilitol bajo las condiciones utilizadas. *S. cerevisiae*, control negativo, presentó los rendimientos más bajos de consumo de xilosa y producción de xilitol, así como de transporte de xilosa.

Para el caso de *D. hansenii*, al no utilizar la temperatura ni los niveles de oxígeno reportados como óptimos para su crecimiento y producción de xilitol, los resultados obtenidos son bajos y no comparables con otras de las levaduras utilizadas.

*C. lusitaniae* alcanza rendimientos equivalentes a los de *C. guilliermondii* en presencia de xilosa. Sin embargo, la afinidad por xilosa es 10 veces menor que en *C. guilliermondii*.

Tanto *K. marxianus* como *Z. bailii* tuvieron un comportamiento inesperado al ser las únicas con producción de etanol cuantificable a las 48 h a partir de xilosa; aun así, sus rendimientos de xilitol son equivalentes a los obtenidos en *C. guilliermondii* y *C. lusitaniae*. Esto, junto con la habilidad de revertir el desequilibrio redox y las modificaciones presentadas en su capacidad respiratoria al ser expuestas a la xilosa, las coloca como las mejores candidatas para continuar con la búsqueda del mecanismo de transformación de xilosa que permita satisfacer las demandas biotecnológicas de productos derivados de este azúcar.

Bajo las condiciones utilizadas y los análisis realizados, se concluye que la cepa utilizada de *K. marxianus* es la levadura con la que se obtendrían mejores rendimientos tanto de etanol como xilitol a partir de xilosa. Esto debido a su rápida duplicación, alta producción de biomasa, acumulación de ambos alcoholes y estabilidad de los cultivos durante 48 h.

Los experimentos señalan que el transporte de xilosa en las levaduras utilizadas no es llevado a cabo por un simportador protón/xilosa.

## 9 Perspectivas

Estudiar con más detalle y por separado las cepas de *C. guilliermondii*, *K. marxianus*, *Z. bailii* y *C. lusitaniae* para mejorar tanto las condiciones como parámetros de transporte, crecimiento y producción de cada una.

Con la secuencia reportada del transportador de xilosa XYLH en *D. hansenii* es posible realizar experimentos para conocer si existe la misma secuencia en las otras cepas, si codifica para la misma proteína y si tiene la misma función; así como evaluar sus propiedades cinéticas en la proteína aislada.

Las cepas de los géneros *K. marxianus* y *Z. bailii* mostraron datos que abren una oportunidad para continuar con el estudio del metabolismo de la xilosa en levaduras no convencionales, tales como las enzimas involucradas en la ruta metabólica, así como el mecanismo para restaurar el desequilibrio redox y los efectos de la xilosa en otros procesos dentro de la célula. Con estos datos se puede prescindir de utilizar la misma cepa de laboratorio y explorar otras opciones a partir de levaduras silvestres o de aquellas levaduras cuyo estudio ha quedado limitado por falta de técnicas o conocimientos más profundos sobre cada género.

Finalmente, para poder competir con la producción industrial de xilitol será necesario obtener una cepa o consorcio microbiano que pueda hidrolizar los residuos lignocelulósicos, lograr un cultivo de alta densidad, transportar la xilosa sin inhibición por parte de la glucosa y transformar toda la xilosa consumida, o al menos una buena parte de ella en xilitol sin comprometer en su totalidad el crecimiento del cultivo. Para eso es preciso encontrar y estudiar enzimas hidrolíticas, proteínas transportadoras de xilosa con alta afinidad, enzimas propias de la ruta metabólica (XR, XDH), así como mecanismos de clonación y transformación en levaduras no convencionales que permitan realizar la menor cantidad de modificaciones en cepas que ya tengan la mayoría de las características esperadas.

## 10 Referencias

- Abbas, C. a, & Sibirny, A. (2011). Genetic Control of Biosynthesis and Transport of Riboflavin and Flavin Nucleotides and Construction of Robust Biotechnological Producers. *Microbiol Mol Biol Rev*, 75(2), 321–360.
- Akimenko, V. K., Golovchenko, N. P., & Medentsev, A. G. (1979). The absence of energy conservation coupled with electron transfer via the alternative pathway in cyanide-resistant yeast mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, 545(3), 398-403.
- Albuquerque, T. L. de, da Silva, I. J., de Macedo, G. R., & Rocha, M. V. P. (2014). Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review. *Process Biochem*, 49(11), 1779–1789.
- Alexander, M. a., Yang, V. W., & Jeffries, T. W. (1988). Levels of pentose phosphate pathway enzymes from *Candida shehatae* grown in continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29(2–3), 282–288.
- Almeida, J. R., Modig, T., Petersson, A., Hähn-Hägerdal, B., Lidén, G., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 82(4), 340-349.
- Amaral-Collaco, M. T., Gírio, F. M., & Peito, M. A. (1989). Utilization of the hemicellulosic fraction of agro-industrial residues by yeasts. *Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation.*, 221-230.
- Basso, L. C., Basso, T. O., & Rocha, S. N. (2011). Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In *Biofuel Production-recent Developments and Prospects*. InTech.
- Barbosa, M. F. S., de Medeiros, M. B., de Mancilha, I. M., Schneider, H., & Lee, H. (1988). Screening of yeasts for production of xylitol from d-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *J. Ind. Microbiol.*, 3(4), 241–251.
- Barnett, J. A., Payne, R. W., & Yarrow, D. (1979). *A guide to identifying and classifying yeasts*. Cambridge University Press.
- Bergmeyer, H.U. (1986). Ethanol. In *Methods of enzymatic analysis*. Vol. 5. 3<sup>rd</sup>. Edn. Verlag Chemie: Weinheim/Academic Press: New York. 598.

- Bergmeyer, H.U. (1986). Glucose. In *Methods of enzymatic analysis*. Vol. 5. 3<sup>rd</sup>. Edn. Verlag Chemie: Weinheim/Academic Press: New York. 163.
- Bergmeyer, H.U. (1986). Xylitol. In *Methods of enzymatic analysis*. Vol. 5. 3<sup>rd</sup>. Edn. Verlag Chemie: Weinheim/Academic Press: New York. 484.
- Bergmeyer, H.U. (1986). Xylose. In *Methods of enzymatic analysis*. Vol. 5. 3<sup>rd</sup>. Edn. Verlag Chemie: Weinheim/Academic Press: New York. 453, 457.
- Bideaux, C., Montheard, J., Cameleyre, X., Molina-Jouve, C., & Alfenore, S. (2016). Metabolic flux analysis model for optimizing xylose conversion into ethanol by the natural C5-fermenting yeast *Candida shehatae*. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 100(3), 1489–1499.
- Breuer, U., & Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii* - An extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23(6), 415–437.
- Brown, A. D. (1990). *Microbial water stress physiology. Principles and perspectives*. John Wiley & Sons.
- Bruinenberg, P. M., de Bot, P. H. M., van Dijken, J. P., & Scheffers, W. A. (1983). The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 18(5), 287–292.
- Bruinenberg, P. M., Jonker, R., Dijken, J. P., & Scheffers, W. A. (1985). Utilization of formate as an additional energy source by glucose-limited chemostat cultures of *Candida utilis* CBS 621 and *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066. *Arch. Microbiol.*, 142(3), 302-306.
- Bura, R., Vajzovic, A., & Doty, S. L. (2012). Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3 I: production of xylitol and ethanol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 39(7), 1003-1011.
- Cabrera-Orefice, A., Chiquete-Félix, N., Espinasa-Jaramillo, J., Rosas-Lemus, M., Guerrero-Castillo, S., Peña, A., & Uribe-Carvajal, S. (2014). The branched mitochondrial respiratory chain from *Debaryomyces hansenii*: components and supramolecular organization. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenerg.*, 1837(1), 73-84.
- Camougrand, N. M., Zniber, S., & Guérin, M. G. (1991). The antimycin-A-insensitive respiratory pathway of *Candida parapsilosis*: evidence for a second quinone involved specifically in its functioning. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, 1057(1), 124-130.

- Canettieri, E. V, Almeida e Silva, J. B., & Felipe, M. G. (2001). Application of factorial design to the study of xylitol production from eucalyptus hemicellulosic hydrolysate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 94(2), 159–168.
- Chen, L.-Q., Cheung, L. S., Feng, L., Tanner, W., & Frommer, W. B. (2015). Transport of Sugars. *Annu. Rev. Biochem.*, (February), 1–30.
- Chem.umass.edu. (2017). *Sugars and sugar substitutes*. [online] Available at: <http://www.chem.umass.edu/~cmartin/Courses/Chem250/Sugars/> [Accessed 24 Mar 2017].
- Chiang, C., & Knight, S. G. (1960). Metabolism of d-xylose by moulds. *Nature*, 188, 79–81.
- Chiang, L. C., Gong, C. S., Chen, L. F., & Tsao, G. T. (1981). D-Xylulose fermentation to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42(2), 284–289.
- Curran, B. P., Bugeja, V. (2006). Basic investigations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Protocol*, 1-13.
- Diz, J., Cruz, J. M., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2002). Xylitol production from eucalyptus wood hydrolysates in low-cost fermentation media. *Food Technol. Biotechnol.*, 40(3), 191-197.
- Domínguez, J. M. (1998). Xylitol production by free and immobilized *Debaryomyces hansenii*. *Biotechnol. Lett.*, 20(1), 53–56.
- Eliasson, a, Boles, E., Johansson, B., Osterberg, M., Thevelein, J. M., Spencer-Martins, I., Hahn-Hägerdal, B. (2000). Xylulose fermentation by mutant and wild-type strains of *Zygosaccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53(4), 376–382.
- Ferreira, D., Nobre, A., Silva, M. L., Faria-Oliveira, F., Tulha, J., Ferreira, C., & Lucas, C. (2013). XYLH encodes a xylose/H<sup>+</sup> symporter from the highly related yeast species *Debaryomyces fabryi* and *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res.*, 13(7), 585–596.
- Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., & Gombert, A. K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 79(3), 339–354.
- Franceschin, G., Sudiro, M., Ingram, T., Smirnova, I., Brunner, G., & Bertucco, A. (2011). Conversion of rye straw into fuel and xylitol: A technical and economical assessment

- based on experimental data. *Chem. Eng. Res. Des.*, 89(6), 631–640.
- Furlan, S. A., Bouilloud, P., & De Castro, H. F. (1994). Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. *Process Biochem.*, 29(8), 657-662.
- Furlan, S. A., Delia-Dupuy, M. L., & Strehaiano, P. (1997). Xylitol production in repeated fed batch cultivation. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 13(5), 591-592.
- Gárdonyi, M. A., Österberg, M. A., Rodrigues, C., Spencer-Martins, I., & Hahn-Hägerdal, B. (2003). High capacity xylose transport in *Candida intermedia* PYCC 4715. *FEMS Yeast Res.*, 3(1), 45–52.
- Ghindea, R., Csutak, O., Stoica, I., Tanase, A.-M., & Vassu, T. (2010). Production of xylitol by yeasts. *Rom. Biotechnol. Lett.*, 15(3), 5217–5222.
- Gírio, F. M., Amaro, C., Azinheira, H., Pelica, F., & Amaral-Collaco, M. T. (2000). Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Debaryomyces hansenii*. *Bioresour. Technol.*, 71(3), 245–251.
- Gírio, F. M., Carvalheiro, F., Duarte, L. C., & Bogel-Lukasik, R. (2012). Deconstruction of the hemicellulose fraction from lignocellulosic materials into simple sugars. In *d-Xylitol* (pp. 3-37). Springer Berlin Heidelberg.
- González-Hernández, J. C., Peña, A., Sánchez, N. S., & Calahorra, M. (2006). Fisiología y metabolismo celular de *Debaryomyces hansenii*. *Cienc. Nicolaita*, 44, 63–74.
- Hahn-Hägerdal, B., Jeppsson, H., Skoog, K., & Prior, B. A. (1994). Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microb. Technol.*, 16(11), 933–943.
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74(5), 937-953.
- Hallborn, J., Walfridsson, M., Airaksinen, U., Ojamo, H., Hahn-Hägerdal, B., Penttilä, M., & Keränen, S. (1991). Xylitol production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotechnol.*, 9(11), 1090-1095.
- Hallborn, J., Meinander, N., Hahn-Hägerdal, B., Gorwa, M. F., Penttilä, M., & Keränen, S. (1994). The influence of cosubstrate and aeration on xylitol formation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing the XYL1 gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42(2), 326-333.

- Hector, R. E., Mertens, J. A., Bowman, M. J., Nichols, N. N., Cotta, M. A., & Hughes, S. R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism requires gluconeogenesis and the oxidative branch of the pentose phosphate pathway for aerobic xylose assimilation. *Yeast*, 28(10), 645–660.
- Hensing, M., Vrouwenvelder, H., Hellinga, C., Baartmans, R., & van Dijken, H. (1994). Production of extracellular inulinase in high-cell-density fed-batch cultures of *Kluyveromyces marxianus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42(4), 516–521.
- Höfer, M., & Misra, P. C. (1978). Evidence for a proton/sugar symport in the yeast *Rhodotorula gracilis* (*glutinis*). *Biochem. J.*, 172(1), 15–22.
- de Hoog, G. S., & Guarro, J. (1995). *Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures*.
- Hou, X. (2012). Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 94(1), 205–214.
- Jackson, S., & Nicolson, S. W. (2002). Xylose as a nectar sugar: From biochemistry to ecology. *Comp. Biochem. Physiol. - Biochem. Mol. Biol.*, 131(4), 613–620.
- James, S.A., Stratford, M. (2011). Chapter 84-Zygosaccharomyces. In: Boekhoeut CPKWF. . (ed) *The Yeasts*, 5<sup>th</sup>edn. London: Elsevier, 937-947.
- Jeffries, T. W., & Jin, Y. S. (2000). Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. *Adv. Appl. Microbiol.*, 47, 221–268.
- Jeffries, T. W., & Jin, Y. S. (2004). Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63(5), 495–509.
- Jeppsson, H., Alexander, N. J., & Hahn-Hagerdal, B. (1995). Existence of cyanide-insensitive respiration in the yeast *Pichia stipitis* and its possible influence on product formation during xylose utilization. *Appl. Env. Microbiol.*, 61(7), 2596-2600.
- Kelloway, A., & Daoutidis, P. (2014). Process synthesis of biorefineries: Optimization of biomass conversion to fuels and chemicals. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 53(13), 5261–5273.
- Kilian, S. G., Prior, B. A., & Du Preez, J. C. (1993). The kinetics and regulation of D-xylose transport in *Candida utilis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 9(3), 357-360.
- Ko, C. H., Chiang, P. N., Chiu, P. C., Liu, C. C., Yang, C. L., & Shiau, I. L. (2008). Integrated xylitol production by fermentation of hardwood wastes. *J. Chem. Technol.*

*Biotechnol.*, 83(4), 534-540.

- Koutinas, A. a, Vlysidis, A., Pleissner, D., Kopsahelis, N., Lopez Garcia, I., Kookos, I. K., Lin, C. S. K. (2014). Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *Chem. Soc. Rev.*, 43(8), 2587–627.
- Kurtzman, C. P., & Fell, J. W. (2011). *The Yeasts a Taxonomic Study*. Elsevier.
- Kurtzman, C. P., & Suzuki, M. (2010). Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Milleromyces*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. *Mycoscience*.
- Lachance, M. A. (1995). Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 68, 151–160.
- Lachance, M. A., Phaff, H. J. (2011). Chapter 23- Clavispora. In: Boekhoeut CPKWF. (ed) *The Yeasts*, 5<sup>th</sup>edn. London: Elsevier, 148-152.
- Lachance, M. A. (2011). Chapter 36-Kluyveromyces. In: Boekhoeut CPKWF. (ed) *The Yeasts*, 5<sup>th</sup>edn. London: Elsevier, 227-237.
- Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suárez, T., García-Mendoza, A., & Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Res.*, 8, 1037–1052.
- Leandro, M. J., Gonçalves, P., & Spencer-Martins, I. (2006). Two glucose/xylose transporter genes from the yeast *Candida intermedia*: first molecular characterization of a yeast xylose-H<sup>+</sup> symporter. *Biochem. J.*, 395(3), 543–549.
- Lépingle, A., Casaregola, S., Neuvéglise, C., Bon, E., Nguyen, H.-V., Artiguenave, F., Gaillardin, C. (2000). Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts : *FEBS Lett.*, 487, 82–86.
- Lertwattanasakul, N., Kosaka, T., Hosoyama, A., Suzuki, Y., Rodrussamee, N., Matsutani, M., Yamada, M. (2015). Genetic basis of the highly efficient yeast *Kluyveromyces marxianus*: complete genome sequence and transcriptome analyses. *Biotechnol Biofuels*, 8(1), 47.
- Ling, H., Cheng, K., Ge, J., & Ping, W. (2011). Statistical optimization of xylitol production from corncob hemicellulose hydrolysate by *Candida tropicalis* HDY-02. *New*



*Biotechnology*, 28(6), 673-678.

Loureiro-Dias, M. C. (1988). Movements of protons coupled to glucose transport in yeasts. A comparative study among 248 yeast strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 54(4), 331-343.

Llorente, B., Malpertuy, A., Blandin, G., Artiguenave, F., Wincker, P., & Dujon, B. (2000). Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts :12. *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. *FEBS Lett.*, 487, 71–75.

Lucas, C., & van Uden, N. (1986). Transport of hemicellulose monomers in the xylose-fermenting yeast *Candida shehatae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 491–495.

Lucas, C., & van Uden, N. (1988). Interconversion and glucose-induced inactivation of glucose transport systems in *Candida shehatae*. *J. Basic Microbiol.*, 9, 639–643.

McIntosh, L., Eichler, T., Gray, G., Maxwell, D., Nickels, R., & Wang, Y. (1998). Biochemical and genetic controls exerted by plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, 1365(1), 278-284.

Malfeito-Ferreira, M., Lopes, I., & Loureiro, V. (1990). Characterization of spoilage yeasts in Portuguese bottled dry white wines. *Actualités Oenologiques*, 89, 293-296.

Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., Wium, H., & St Aubyn, A. (1990). Rapid characterization of yeast contaminants associated with sparkling wine production. *Industrie Dell Bevande*, 19(110), 504-506.

Misra, P. C., & Höfer, M. (1975). An energy-linked proton-extrusion across the cell membrane *Rhodotorula gracilis*. *FEBS Lett.*, 52(1), 95-99.

Misra, S., Raghuwanshi, S., & Saxena, R. K. (2013). Evaluation of corncob hemicellulosic hydrolysate for xylitol production by adapted strain of *Candida tropicalis*. *Carbohydrate Polymers*, 92(2), 1596-1601.

Miura, M., Watanabe, I., Shimotori, Y., Aoyama, M., Kojima, Y., & Kato, Y. (2013). Microbial conversion of bamboo hemicellulose hydrolysate to xylitol. *Wood Sci. Technol.*, 47(3), 515-522.

Mohamad, N. L., Mustapa Kamal, S. M., & Mokhtar, M. N. (2015). Xylitol biological production: a review of recent studies. *Food Rev. Int.*, 31(1), 74-89.

Mollapour, M., & Piper, P. W. (2001). Targeted gene deletion in *Zygosaccharomyces bailii*. *Yeast*, 18(2), 173-186.

- Mussatto, S. I., Silva, C. J., & Roberto, I. C. (2006). Fermentation performance of *Candida guilliermondii* for xylitol production on single and mixed substrate media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72(4), 681-686.
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.
- Nigam, J. N., Ireland, R. S., Margaritis, A., & Lachance, M. A. (1985). Isolation and screening of yeasts that ferment D-xylose directly to ethanol. *Appl. Env. Microbiol.*, 50(6), 1486–1489.
- Nigam, P., & Singh, D. (1995). Processes for fermentative production of xylitol - A sugar substitute. *Process Biochem.*, 30(2), 117–124.
- Nobre, A., Lucas, C., Leão, C., Nobre, A., Lea, L. I. A., Biologia, D. De, & Cie, C. De. (1999). Transport and Utilization of Hexoses and Pentoses in the Halotolerant Yeast *Debaryomyces hansenii*. *Appl. Env. Microbiol.*, 65(8), 3594–3598.
- Nonklang, S., Abdel-Banat, B. M., Cha-aim, K., Moonjai, N., Hoshida, H., Limtong, S., & Akada, R. (2008). High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042. *Appl. Env. Microbiol.*, 74(24), 7514-7521.
- Nolleau, V., Preziosi-Belloy, L., Delgenes, J. P., & Navarro, J. M. (1993). Xylitol production from xylose by two yeast strains: sugar tolerance. *Curr. Microbiol.* 27(4), 191-197.
- Norkrans, B. (1968). Studies on marine occurring yeasts: Respiration, fermentation and salt tolerance. *Arch. Mikrobiol.*, 62(4), 358–372.
- Ojamo, H. (1994). *Yeast xylose metabolism and xylitol production*. PhD thesis, Helsinki University of Technology, Finland.
- Pal, S., Choudhary, V., Kumar, A., Biswas, D., Mondal, A. K., & Sahoo, D. K. (2013). Studies on xylitol production by metabolic pathway engineered *Debaryomyces hansenii*. *Bioresour. Technol.*, 147, 449–455.
- Pal, S., Mondal, A. K., & Sahoo, D. K. (2016). Molecular strategies for enhancing microbial production of xylitol. *Process Biochem.* 51(7), 809–819.
- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.*, 74(1), 25-33.
- Papon, N., Savini, V., Lanoue, A., Simkin, A. J., Crèche, J., Giglioli-Guivarc'H, N., ...

- Sibirny, A. A. (2013). *Candida guilliermondii*: Biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. *Curr. Genet.*, 59(3), 73–90.
- Parajó, J. C., Domínguez, H., & Domínguez, J. M. (1998). Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresour. Technol.*, 65(3), 191–201.
- Pérez-Brito, D., Magaña-Alvarez, A., Lappe-Oliveras, P., Cortes-Velazquez, A., Torres-Calzada, C., Herrera-Suarez, T., Tapia-Tussell, R. (2015). Genetic diversity of *Clavispora lusitaniae* isolated from *Agave fourcroydes* Lem, as revealed by DNA fingerprinting. *J. Microbiol.*, 53(1), 14–20.
- Peña, A., Sánchez, N. S., González-López, O., & Calahorra, M. (2015). Mechanisms involved in the inhibition of glycolysis by cyanide and antimycin A in *Candida albicans* and its reversal by hydrogen peroxide. A common feature in *Candida* species. *FEMS Yeast Res.*, 15(8), fov083.
- Pina, C., Gonçalves, P., Prista, C., & Loureiro-Dias, M. C. (2004). Ffz1, a new transporter specific for fructose from *Zygosaccharomyces bailii*. *Microbiology*, 150(7), 2429-2433.
- Ping, Y., Ling, H. Z., Song, G., & Ge, J. P. (2013). Xylitol production from non-detoxified corncob hemicellulose acid hydrolysate by *Candida tropicalis*. *Biochem. Eng. J.*, 75, 86-91.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (1997). *Fungi and Food Spoilage* Blackie. Academic & Professional. New South Wales, Australia.
- Prakash, G., Varma, A. J., Prabhune, A., Shouche, Y., & Rao, M. (2011). Microbial production of xylitol from D-xylose and sugarcane bagasse hemicellulose using newly isolated thermotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Bioresour. Technol.*, 102(3), 3304-3308.
- Prasad, R., & Höfer, M. (1987). The electrochemical gradient of H<sup>+</sup> in *Candida albicans* and its relevance to the uptake of nutrients. *Biochem. Int.*, 14(4), 617-626.
- Preziosi-Belloy, L., Nollet, V., & Navarro, J. M. (2000). Xylitol production from aspenwood hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. *Biotechnol. Lett.*, 22(3), 239-243.
- Prista, C., Michán, C., Miranda, I. M., & Ramos, J. (2016). The halotolerant *Debaryomyces*

- hansenii*, the Cinderella of non-conventional yeasts. *Yeast*, 33, 5253–533.
- Roberto, I. C., De Mancilha, I. M., & Sato, S. (1999). Influence of kLa on bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate to xylitol. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 21(6), 505-508.
- Rodrigues, F., Zeeman, A. M., Cardoso, H., Sousa, M. J., Steensma, H. Y., Côte-Real, M., & Leão, C. (2004). Isolation of an acetyl-CoA synthetase gene (ZbACS2) from *Zygosaccharomyces bailii*. *Yeast*, 21(4), 325-331.
- Rodrigues, R. C. L. B., Sene, L., Matos, G. S., Roberto, I. C., Pessoa, A., & Felipe, M. G. A. (2006). Enhanced xylitol production by precultivation of *Candida guilliermondii* cells in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. *Curr. Microbiol.*, 53(1), 53–59.
- Rodrigues, R. C., Kenealy, W. R., & Jeffries, T. W. (2011). Xylitol production from DEO hydrolysate of corn stover by *Pichia stipitis* YS-30. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 38(10), 1649-1655.
- Rodrigues de Miranda, L. (1979). *Clavispora*, a new yeast genus of the Saccharomycetales. *Antonie van Leeuwenhoek*, 45, 479–483.
- Rodrussamee, N., Lertwattanasakul, N., Hirata, K., Limtong, S., Kosaka, T., & Yamada, M. (2011). Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 90(4), 1573.
- Romano, A. H. (1986). Microbial sugar transport systems and their importance in biotechnology. *TIBTECH*, (August), 207–213.
- Roseiro, J. C., Peito, M. A., Gírio, F. M., & Amaral-Collaço, M. T. (1991). The effects of the oxygen transfer coefficient and substrate concentration on the xylose fermentation by *Debaryomyces hansenii*. *Arch. Microbiol.*, 156, 484–490.
- Sampaio, F. C., Torre, P., Lopes Passos, F. M., Perego, P., Vieira Passos, F. J., & Converti, A. (2004). Xylose metabolism in *Debaryomyces hansenii* UFV-170. Effect of the specific oxygen uptake rate. *Biotechnol. Prog.*, 20(6), 1641–1650.
- Sampaio, F. C., Mantovani, H. C., Passos, F. J. V., De Moraes, C. A., Converti, A., & Passos, F. M. L. (2005). Bioconversion of D-xylose to xylitol by *Debaryomyces hansenii* UFV-170: product formation versus growth. *Process Biochem.*, 40(11), 3600-3606.

- San Millán, R. M., Wu, L. C., Salkin, I. F., & Lehmann, P. F. (1997). Clinical isolates of *Candida guilliermondii* include *Candida fermentati*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47(2), 385–93.
- Sánchez, S., Bravo, V., García, J. F., Cruz, N., & Cuevas, M. (2008). Fermentation of D-glucose and D-xylose mixtures by *Candida tropicalis* NBRC 0618 for xylitol production. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24(5), 709-716.
- Sánchez, N. S., Calahorra, M., González-Hernández, J. C., & Peña, A. (2006). Glycolytic sequence and respiration of *Debaryomyces hansenii* as compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 23(5), 361-374.
- Savini, V., Catavittello, C., Onofrillo, D., Masciarelli, G., Astolfi, D., Balbinot, A., D'Antonio, D. (2011). What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. *Mycoses*, 54(5), 434–441.
- Sene, L., Vitolo, M., Felipe, M. G. A., & Silva, S. S. (2000). Effects of environmental conditions on xylose reductase and xylitol dehydrogenase production by *Candida guilliermondii*. In *Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 371-380). Humana Press.
- Skoog, K., & Hahn-Hägerdal, B. (1988). Xylose fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, 10(2), 66–80.
- Skoog, K., & Hahn-Hägerdal, B. (1990). Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Appl. Env. Microbiol.*, 56(11), 3389–3394.
- Spencer-Martins, I. (1994). Transport of sugars in yeasts: Implications in the fermentation of lignocellulosic materials. *Bioresour. Technol.*, 50(1), 51–57.
- Spencer-Martins, I., & van Uden, N. (1985). Catabolite interconversion of glucose transport systems in the yeast *Candida wickerhamii*. *Biochim. Biophys. Acta*, 812, 168–172.
- Srivani, K., & Pydi Setty, Y. (2012). Parametric optimization of xylitol production from xylose by fermentation. *Asia-Pacific J. Chem. Eng.*, 7(May), S280–S284.
- Stambuk, B. U., Franden, M. A., Singh, A., & Zhang, M. (2003). D-Xylose transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 105–108, 255–263.
- Tamburini, E., Bianchini, E., Bruni, A., & Forlani, G. (2010). Cosubstrate effect on xylose reductase and xylitol dehydrogenase activity levels, and its consequence on xylitol

- production by *Candida tropicalis*. *Enzyme Microb. Technol.*, 46(5), 352-359.
- Tanner, F., Vojnovich, C., & Vanlanen, J. (1945). Riboflavin Production by *Candida* species. *Science*, 101, 180–181.
- Tavares, J. M., Duarte, L. C., Amaral-Collaco, M. T., & Gírio, F. M. (2000). The influence of hexoses addition on the fermentation of D-xylose in *Debaryomyces hansenii* under continuous cultivation. *Enzyme Microb. Technol.*, 26(9–10), 743–747.
- Taylor, M. P., Mulako, I., Tuffin, M., & Cowan, D. (2012). Understanding physiological responses to pre-treatment inhibitors in ethanologenic fermentations. *Biotechnol. J.*, 7(9), 1169-1181.
- Thomas, D. S., & Davenport, R. R. (1985). *Zygosaccharomyces bailii* - a profile of characteristics and spoilage activities. *Food Microbiol.*, 2(2), 157–169.
- van Dijken, J. P., Weusthuis, R. A., & Pronk, J. T. (1993). Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 63(3–4), 343–352.
- Veiga, A., Arrabaça, J. D., & Loureiro-Dias, M. C. (2000). Cyanide-resistant respiration is frequent, but confined to yeasts incapable of aerobic fermentation. *FEMS Microbiol. Lett.*, 190(1), 93-97.
- Verduyn, C., Van Kleef, R., Frank, J., Schreuder, H., Van Dijken, J. P., & Scheffers, W. A. (1985). Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Biochem. J.*, 226(3), 669-677.
- Walfridsson, M., Hallborn, J., Penttila, M., Keranen, S., & Hahn-Hagerdal, B. (1995). Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the TKL1 and TAL1 genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase. *Appl. Env. Microbiol.*, 61(12), 4184–4190.
- Walther, T., Hensirisak, P., & Agblevor, F. A. (2001). The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by *Candida tropicalis*. *Bioresour. Technol.*, 76(3), 213-220.
- Weusthuis, R. A., Pronk, J. T., Van Den Broek, P. J., & Van Dijken, J. P. (1994). Chemostat cultivation as a tool for studies on sugar transport in yeasts. *Microbiol. Rev.*, 58(4), 616-630.
- Winkelhausen, E., & Kuzmanova, S. (1998). Microbial conversion of D-xylose to xylitol. *J. Ferment. Bioeng.*, 86(1), 1–14.

- Yamada, Y., & Kondo, K. (1972). Taxonomic significance of the coenzyme Q system in yeasts and yeast-like fungi. *Yeasts and Yeast-like Microorganisms in Medical Science*, ed. by Iwata, K., University of Tokyo Press, Tokyo, 63-69.
- Young, E. M., Tong, A., Bui, H., Spofford, C., & Alper, H. S. (2014). Rewiring yeast sugar transporter preference through modifying a conserved protein motif. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 111(1), 131-136.
- Zimmer, E., Blanchard, S., Boze, H., Moulin, G., & Galzy, P. (1997). Glucose metabolism in the yeast *Schwanniomyces castellii*: role of phosphorylation site I and an alternative respiratory pathway. *Appl. Env. Microbiol.*, 63(7), 2779-2784.
- Zhang, J., Geng, A., Yao, C., Lu, Y., & Li, Q. (2012). Xylitol production from D-xylose and horticultural waste hemicellulosic hydrolysate by a new isolate of *Candida athensensis* SB18. *Bioresour. Technol.*, 105, 134-141.

## 11 Anexos

### 11.1 Rendimientos Fermentativos (Equivalencias)

La cantidad de biomasa se cuantificó con los siguientes métodos: peso seco, unidades de absorbancia, número de células y peso húmedo.

En el apartado de resultados se reportó el rendimiento  $Y_{x/s}$  de los medios (YPD y YPX) con pH ajustado únicamente a partir de los datos obtenidos con la cuantificación de biomasa por peso seco. Esto con el fin de poder comparar con los resultados existentes en la literatura. No obstante, se incluyen a continuación las equivalencias del cálculo del rendimiento  $Y_{x/s}$  utilizando los valores de biomasa obtenidos con unidades de absorbancia ( $ua\ g^{-1}$ ), número de células ( $\#cel\ g^{-1}$ ) y peso húmedo ( $g\ g^{-1}$ ).

Tabla 14. Rendimientos  $Y_{x/s}$  en medios YPD.

Cepas	$Y_{x/s}$			
	$g\ g^{-1}$ (peso seco)	$ua\ g^{-1}$ (600 nm)	$\#cel\ g^{-1}$	$g\ g^{-1}$ (peso húmedo)
<b>Cg 4</b>	$0.16 \pm 0.07$	$0.21 \pm 0.06$	$1.64E10 \pm 2.38E10$	$0.0016 \pm 0.0013$
<b>Cg 6</b>	$0.25 \pm 0.15$	$0.29 \pm 0.04$	$1.50E10 \pm 2.06E10$	$0.0018 \pm 0.0015$
<b>Sc 4</b>	$0.11 \pm 0.06$	$0.13 \pm 0.02$	$3.28E09 \pm 2.62E09$	$0.0008 \pm 0.0001$
<b>Sc 6</b>	$0.18 \pm 0.02$	$0.14 \pm 0.08$	$3.49E09 \pm 6.31E08$	$0.0010 \pm 0.0005$
<b>Dh 4</b>	$0.09 \pm 0.01$	$0.10 \pm 0.08$	$1.19E09 \pm 9.95E08$	$0.0014 \pm 0.0004$
<b>Dh 6</b>	$0.11 \pm 0.02$	$0.12 \pm 0.03$	$1.64E09 \pm 1.03E09$	$0.0008 \pm 0.0001$
<b>Km 4</b>	$0.20 \pm 0.06$	$0.11 \pm 0.04$	$3.63E09 \pm 1.96E09$	$0.0005 \pm 0.0005$
<b>Km 6</b>	$0.12 \pm 0.05$	$0.15 \pm 0.04$	$4.31E09 \pm 1.32E09$	$0.0010 \pm 0.0005$
<b>Zb 4</b>	$0.28 \pm 0.10$	$0.14 \pm 0.12$	$7.66E09 \pm 3.21E09$	$0.0010 \pm 0.0000$
<b>Zb 6</b>	$0.47 \pm 0.1$	$0.19 \pm 0.11$	$4.26E10 \pm 6.03E10$	$0.0027 \pm 0.0010$
<b>Cl 4</b>	$0.31 \pm 0.07$	$0.25 \pm 0.12$	$8.45E09 \pm 3.52E09$	$0.0018 \pm 0.0010$
<b>Cl 6</b>	$0.26 \pm 0.17$	$0.26 \pm 0.17$	$9.76E09 \pm 4.87E09$	$0.0010 \pm 0.0009$

n=3



Tabla 15. Rendimientos  $Y_{x/s}$  en medios YPX.

Cepas	$Y_{x/s}$			
	$g\ g^{-1}$ (peso seco)	$ua\ g^{-1}$ (600 nm)	$\#cel\ g^{-1}$	$g\ g^{-1}$ (peso húmedo)
<b>Cg 4</b>	$0.34 \pm 0.06$	$0.49 \pm 0.25$	$6.15E09 \pm 4.04E09$	$0.0030 \pm 0.0006$
<b>Cg 6</b>	$0.34 \pm 0.17$	$0.28 \pm 0.11$	$3.43E09 \pm 2.76E09$	$0.0013 \pm 0.0007$
<b>Sc 4</b>	$0.12 \pm 0.04$	$0.09 \pm 0.14$	$3.37E09 \pm 2.23E09$	$0.0010 \pm 0.0009$
<b>Sc 6</b>	$0.21 \pm 0.03$	$0.08 \pm 0.06$	$1.29E09 \pm 1.03E09$	$0.0005 \pm 0.0004$
<b>Dh 4</b>	$0.22 \pm 0.07$	$0.07 \pm 0.04$	$1.37E09 \pm 1.24E09$	$0.0007 \pm 0.0001$
<b>Dh 6</b>	$0.15 \pm 0.04$	$0.06 \pm 0.05$	$1.15E09 \pm 9.73E08$	$0.0006 \pm 0.0006$
<b>Km 4</b>	$0.36 \pm 0.15$	$0.22 \pm 0.11$	$4.37E09 \pm 3.42E09$	$0.0009 \pm 0.0001$
<b>Km 6</b>	$0.28 \pm 0.16$	$0.19 \pm 0.05$	$3.78E09 \pm 8.36E08$	$0.001 \pm 0.0004$
<b>Zb 4</b>	$0.27 \pm 0.07$	$0.18 \pm 0.14$	$3.50E09 \pm 2.30E09$	$0.0010 \pm 0.0001$
<b>Zb 6</b>	$0.27 \pm 0.14$	$0.13 \pm 0.07$	$3.73E09 \pm 2.30E09$	$0.0013 \pm 0.0003$
<b>Cl 4</b>	$0.43 \pm 0.05$	$0.19 \pm 0.04$	$4.21E09 \pm 4.03E08$	$0.0008 \pm 0.0004$
<b>Cl 6</b>	$0.32 \pm 0.12$	$0.23 \pm 0.00$	$4.57E09 \pm 2.51E09$	$0.0011 \pm 0.0015$

n=3

## 11.2 Modelado del simportador protón-xilosa *Xylhp* de *D. hansenii* CBS 767

A partir de la secuencia de aminoácidos del transportador *Xylhp* de *D. hansenii* CBS 767 existente en la base de datos del National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) se analizó la estructura secundaria en cinco servidores distintos:

- [www.predictprotein.org](http://www.predictprotein.org)
- [www.bioinfs.cs.ucl.ac.uk/psipred/](http://www.bioinfs.cs.ucl.ac.uk/psipred/)
- [www.biogem.org/tool/chou-fasman/](http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/)
- [http://npsapbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSAnpsa\\_hnn.htm](http://npsapbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSAnpsa_hnn.htm)
- <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/sections/secstruct>

Se obtuvo una secuencia consenso.

Se analizó la hidrofobicidad con nueve servidores:

- <http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/tmdas.cgi>
- [http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/TMPRED\\_form\\_parser](http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/TMPRED_form_parser)
- <http://www.enzim.hu/hmmtop/server/hmmtop.cgi>
- [http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/cgi-bin/adv\\_sosui.cgi](http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/cgi-bin/adv_sosui.cgi)
- <http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/webface2.fcgi?jobid=565657CC00004AF32BC51D52&wait=20>
- [http://toolkit.tuebingen.mpg.de/quick2\\_d/results/4331103](http://toolkit.tuebingen.mpg.de/quick2_d/results/4331103)
- <http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#jobs::toppred.Y26345916421890>
- <http://blanco.biomol.uci.edu/mpex/>
- [http://cctop.enzim.ttk.mta.hu/?\\_=/jobs/result/f9f1bcfff3a98339d3bb24b117959033](http://cctop.enzim.ttk.mta.hu/?_=/jobs/result/f9f1bcfff3a98339d3bb24b117959033)

Se obtuvo una estructura secundaria definitiva.

Se determinó la topología de la proteína con respecto a la membrana con la ayuda de cuatro servidores:

- <http://octopus.cbr.su.se/>
- <http://phobius.sbc.su.se/cgi-bin/predict.pl>

- [http://topcons.net/pred/result/rst\\_71dBpk/](http://topcons.net/pred/result/rst_71dBpk/)
- [http://cctop.enzim.ttk.mta.hu/?\\_=/jobs/result/f9f1bcfff3a98339d3bb24b117959033](http://cctop.enzim.ttk.mta.hu/?_=/jobs/result/f9f1bcfff3a98339d3bb24b117959033).

Se analizó la presencia de zippers de glicina con motivos GXXXG en los cruces transmembranales para determinar las posibles interacciones y/o empaquetamientos entre éstos; los residuos aromáticos (Y y W) en las hélices para verificar la existencia de un cinturón aromático, indicando cuáles hélices interactúan directamente con las cabezas de fosfolípidos de la membrana; la presencia de hélices reentrantes (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/result/f271dcca-940a-11e5-bb43-00163e110593>) y prolinas conservadas en cinco proteínas de diferentes microorganismos con un alineamiento en T-Coffee (<http://tcoffee.crg.cat/>). Con el servidor HTMSRAP (<http://pbiotechnology.tbzmed.ac.ir/results.aspx>) se obtuvo la orientación de las hélices en la membrana. De igual manera se determinó el momento hidrofóbico de las alfa-hélices.

Finalmente, con la estructura consenso y tomando como base el transportador de xilosa XylE en *E.coli* se realizó el modelado 3D de la proteína utilizando el Swiss-Model, CCTOP y RAPTOR.

El modelado del transportador de xilosa en la levadura marina *D. hansenii* localizado en la membrana plasmática dio como resultado una proteína de 557 aminoácidos y tamaño estimado de 61 kDa, con  $\alpha$ -hélices como estructura secundaria. Posee 12 cruces transmembranales como cualquier transportador de azúcares presentes en levaduras. El carboxilo y amino terminal fueron ubicados en el espacio intracelular. Por medio de un zipper de glicina se encontró la interacción entre dos cruces transmembranales y presentó un cinturón aromático en la zona que interactúa con las cabezas de fosfolípidos en la parte superior de la bicapa lipídica (parte extracelular). El modelo en tercera dimensión no mostró quiebres en las hélices transmembranales a pesar de que existen prolinas conservadas en varios transportadores, incluido el ya cristalizado simportador protón-xilosa en la bacteria *E. coli*.

Esta proteína no ha sido cristalizada ni modelada por lo que éste es el primer modelo del transportador en *D. hansenii*, a pesar de tener similitud con la secuencia del transportador de *D. fabryi*, el modelo existente para el último no coincide con el modelo obtenido para *D.*

*hansenii*. Esto puede ser debido a la falta de herramientas computacionales existentes en el año que fue sometida a análisis esta estructura (2004).

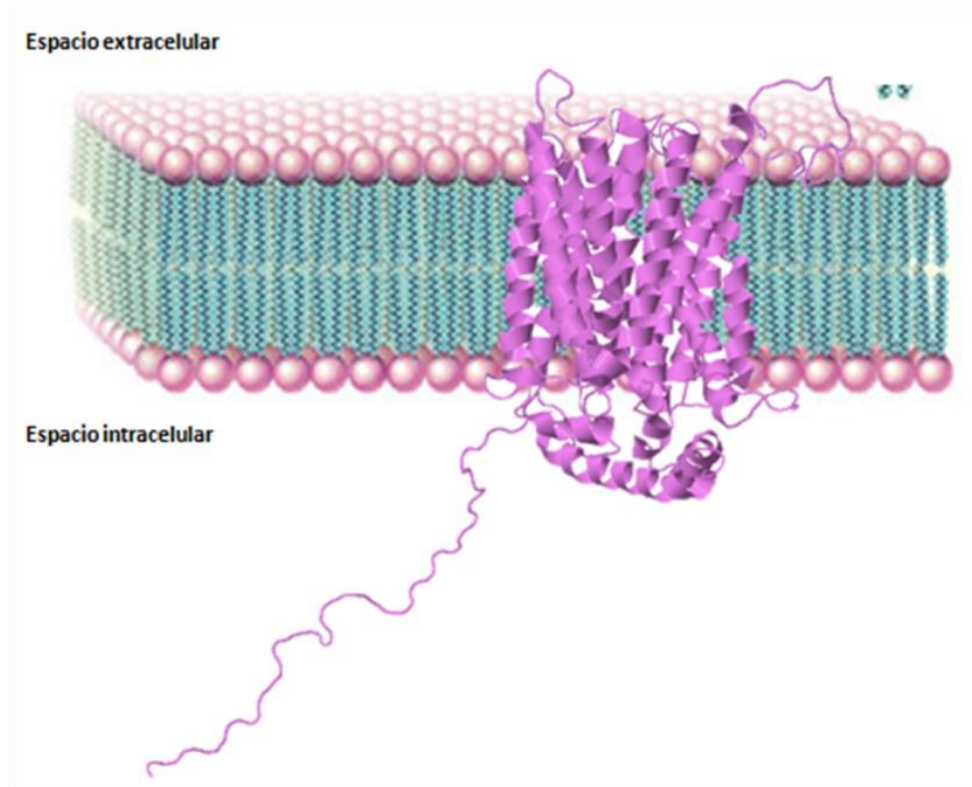


Figura 43. Simportador protón-xilosa *Xylhp* en *D. hansenii* CBS 767.

### 11.3 Resistencia a Geneticina (G418)

Una parte importante del proyecto fue purificar las cepas de cada género a utilizar. Se usaron antibióticos, tales como: ampicilina, tetraciclina, amoxicilina, cloranfenicol y geneticina.

Se logró purificar con éxito las colonias únicamente con geneticina a diferentes concentraciones en medio líquido dependiendo del género. Para lograr esto se realizaron curvas de viabilidad frente al antibiótico en medio YPD y se eligió la concentración máxima que permitiera el crecimiento para cada género.

Se utilizó el Bioscreen C con lecturas cada 30 min de absorbancia a 600 nm, durante 48 horas. El control fue medio YPD sin ningún antibiótico. Se iniciaron las cinéticas de crecimiento con un valor de absorbancia de 0.03 a 600 nm. Las curvas se realizaron en el software GraphPadPrism 6.

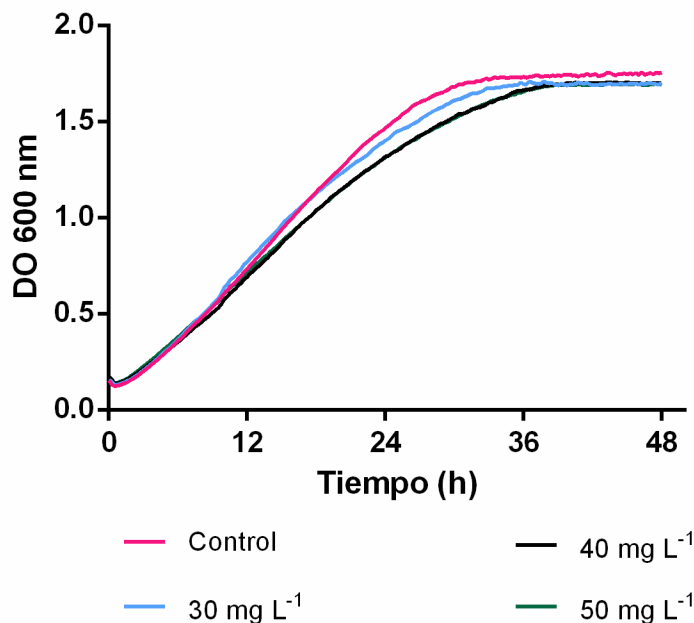


Figura 44. Resistencia a G418 *C. guilliermondii* NRRL Y-2075 USDA.

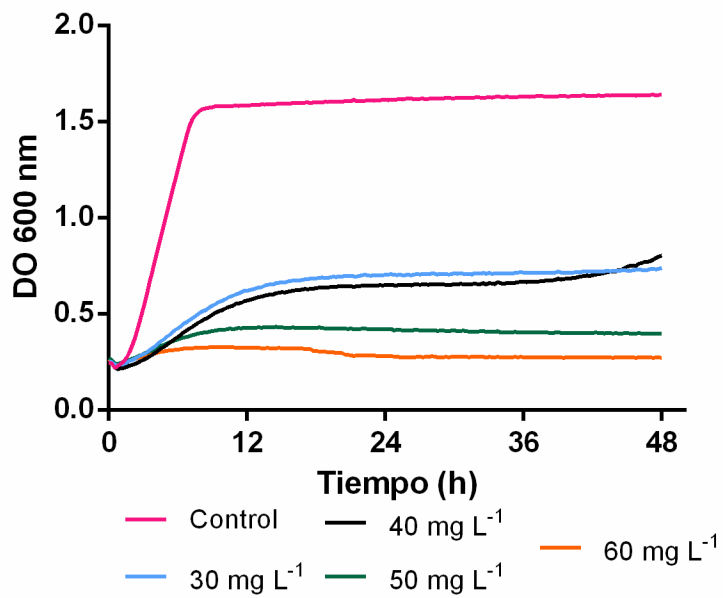


Figura 45. Resistencia a G418 en *S. cerevisiae* ITM 2014.

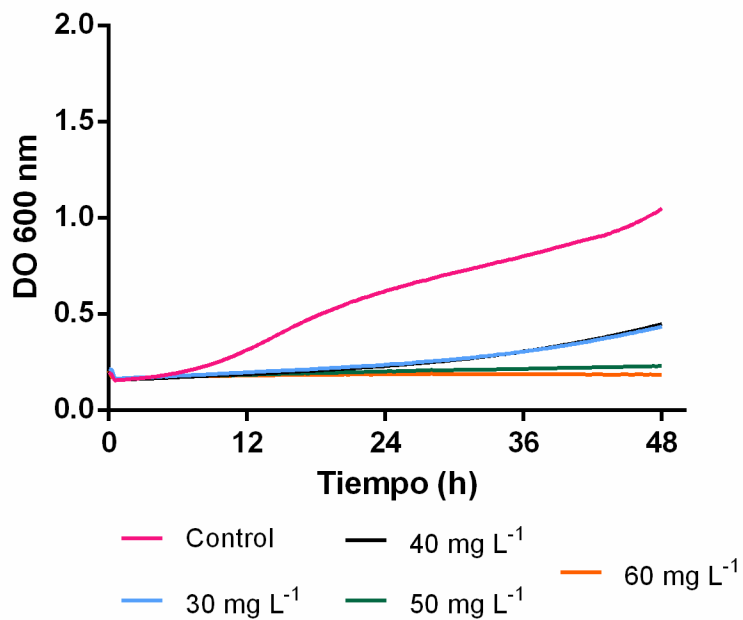


Figura 46. Resistencia a G148 en *D. hansenii* Y-726 (CBS767).

En *C. guilliermondii* (Fig. 43) no hubo efecto en el crecimiento a concentraciones de hasta 50 mg L<sup>-1</sup>. Para purificar esta cepa se utilizó una concentración de 60 mg L<sup>-1</sup>. *S. cerevisiae* disminuyó su velocidad de crecimiento a partir de 30 mg L<sup>-1</sup>, siendo la concentración de 60 mg L<sup>-1</sup> letal en su totalidad (Fig. 44). En *D. hansenii* el crecimiento se retrasó hasta las 24 h en las concentraciones de 30 y 40 mg L<sup>-1</sup>. La concentración de 50 mg L<sup>-1</sup> fue letal para esta cepa (Fig. 45). *K. marxianus* presentó resistencia a concentraciones de hasta 50 mg L<sup>-1</sup> de antibiótico y se utilizó 60 mg L<sup>-1</sup> para purificarla (Fig. 46). En *Z. bailii*, el crecimiento fue disminuyendo en función de la concentración de antibiótico y aún así a 60 mg L<sup>-1</sup> de G418 se retrasó hasta la hora 36 la fase estacionaria (Fig. 47). Ninguna concentración utilizada fue letal para esta levadura pero para purificarla se utilizó 60 mg L<sup>-1</sup> al igual que para *C. lusitaniae* en la cual no fue afectado el crecimiento con ninguna concentración de antibiótico de 30 a 50 mg L<sup>-1</sup> (Fig. 48).

Por lo tanto, se puede resumir que solamente para las cepas de *S. cerevisiae*, *D. hansenii* y *Z. bailii* existe una concentración mínima inhibitoria (CMI) de G418 de 30 mg L<sup>-1</sup>, 30 mg L<sup>-1</sup> y 60 mg L<sup>-1</sup> respectivamente.

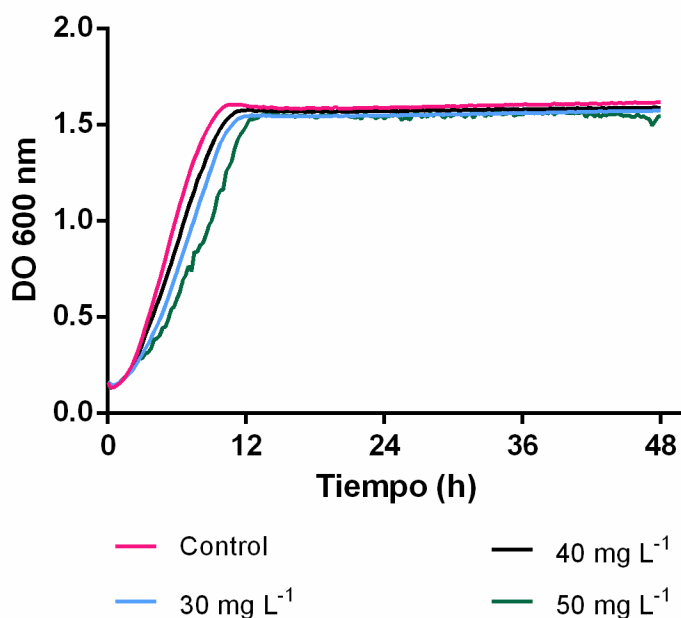


Figura 47. Resistencia a G418 en *K. marxianus*.

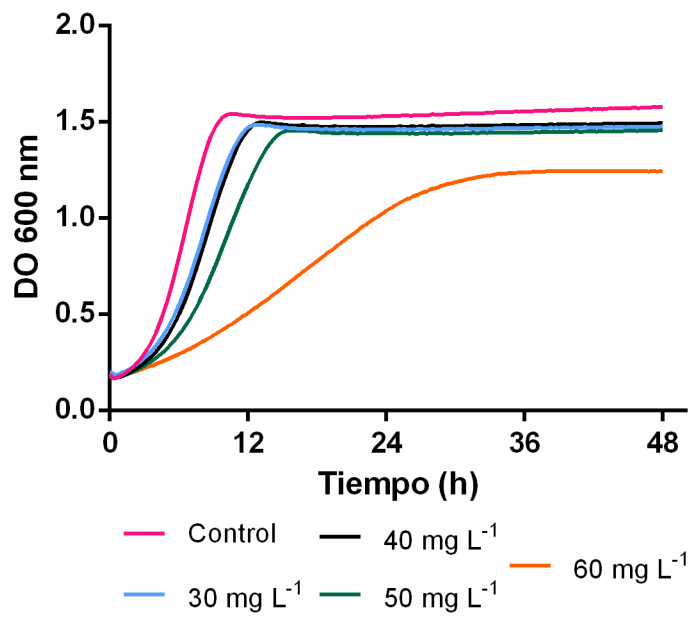


Figura 48. Resistencia a G418 en *Z. bailii*.

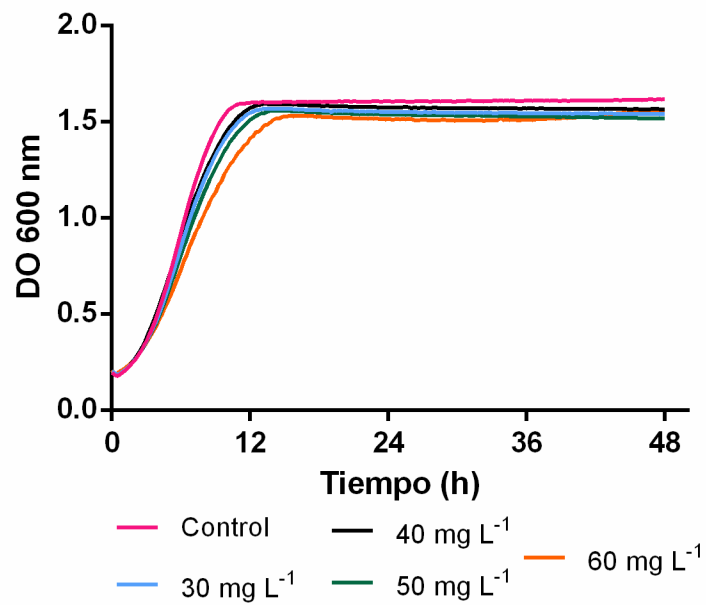


Figura 49. Resistencia a G418 en *C. lusitaniae*.



## 11.4 Presentaciones en Congresos





COLEGIO MEXICANO DE INGENIEROS  
BIOQUÍMICOS, A.C.

CERTIFICATE OF PARTICIPATION

It is certified, that:


**JUAN CARLOS GONZÁLEZ-ERNÁNDEZ; ALEJANDRA KARINA ESTRADA AVILA; ANTONIO PEÑA**

Authors of the work:

***CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DEL TRANSPORTE DE XILOSA EN LEVADURAS NO-CONVENCIONALES***

Keyword: **FER24JCG20151212**

Participated in the *oral* session of the IX International Congress, XX National Congress on Biochemical Engineering and the XIV Biomedicine and Molecular Biotechnology Scientific Meetings, held at World Trade Center, Boca del Río, Veracruz, Mexico, March 16-18 2016.

  
IBQ. Miguel Rosales Domínguez  
President of the CMIBQ

  
Dra. Deifilia Ahuatzi Chacón  
Chair Scientific Committee



El Gobierno del Estado de Michoacán a través de la Secretaría de Innovación, Ciencia y Desarrollo Tecnológico, otorga la presente:

## CONSTANCIA

**A:** **Alejandra Karina Estrada Ávila, Antonio Peña Díaz, Alicia González Manjarrez y Juan Carlos González-Hernández**

Por su Ponencia en la Mesa 3-A "Ciencias Agrícolas y Biotecnología", titulada: *ESTUDIO COMPARATIVO DEL TRANSPORTE DE XILOSA EN LEVADURAS CONVENCIONALES NO-CONVENCIONALES*

En el marco de las actividades académicas del **11º Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación y el Quinto Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán**, celebrado los días 13 y 14 de octubre del 2016.

Morelia, Michoacán, 14 octubre 2016.

**Dr. José Luis Montañez Espinosa**

Secretario de Innovación, Ciencia y Desarrollo Tecnológico.



*Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.*  
FUNDADA EN 1957

AVE. DIPRESES S/N COL. SAN ANDRÉS TOTOLTEPEC  
C.P. 14400 MÉXICO, D.F.  
APARTADO POSTAL 70-406, CIUDAD UNIVERSITARIA  
TEL. Y FAX. (55)5621-5742  
http://www.smb-arg.mx  
Correo Electrónico: smbq@to.unam.mx

MESA DIRECTIVA 2015 - 2017

PRESIDENTE  
DR. MIGUEL LARA FLORES

VICE-PRESIDENTE  
DRA. IRENE BEATRIZ CASTAÑO NAVARRO

SECRETARIA TESORERA  
DRA. ELDA GUADALUPE ESPIN OCAMPO

SUB-SECRETARIO TESORERO  
DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL

SOCIOS FUNDADORES

Dr. Barbañ Arreguín Lozano  
Dr. Edmundo Calva Cuadrilla  
Dr. Guillermo Carvajal Sandoval (†)  
Dr. Joaquín Cravioto (†)  
Dr. Carlos del Río Estrada (†)  
Dr. Silvestre Frenk Freund  
Dr. Mario García Hernández (†)  
Dr. Jesús Guzmán García (†)  
Dr. Jesús Kumate Rodríguez  
Dr. José Laguna García (†)  
Dr. Guillermo Massieu Helguera (†)  
Dr. Raúl Ondarza Vidaurrata  
Dr. Efraín G. Pardo Codina  
Dr. Guillermo Soberón Acevedo

Otorga la presente

**CONSTANCIA** a:

**Alejandra Karina Estrada Ávila**

Quien asistió y presentó el trabajo:

**Comparative study of transport and assimilation of xylose in  
conventional and non-conventional yeasts**

Por:

**Alejandra Karina Estrada Ávila, Antonio Peña Díaz,  
Juan Carlos González Hernández, Alicia González Manjarrez**

En la modalidad de presentación oral durante el XXXI Congreso Nacional  
de Bioquímica del 6 al 11 de noviembre de 2016 en Aguascalientes, Ags.

Atentamente  
Por el Comité Organizador

**Dr. Miguel Lara Flores  
Presidente**