



# **Selección de levaduras productoras de etanol y xilitol a partir de hidrolizado de eucalipto**

---

**Tesina de Grado, Licenciatura en Bioquímica**

**30/05/2018**

**Autor: Pedro Demichelis**

**Tutora: Dra. Claudia Lareo**

**Co-Tutora: M.Sc. Mairan Guigou**

## **Agradecimientos**

Son muchísimas a las personas a las que tengo que agradecerles por ser parte de este camino, pero principalmente y en primer lugar quiero agradecer a mis tutoras Claudia Lareo y Mairan Guigou por haberme orientado a lo largo de este trabajo de la mejor manera y por haber tenido la paciencia de hacerlo por tanto tiempo.

A mis padres, mi hermano y mis abuelos que sin dudas, sin su incondicional apoyo a lo largo de todos estos años, esto nunca hubiera sido posible.

A Marlene por bancarme y siempre estar a pesar de la distancia durante todo este camino.

A los amigos que también siempre estuvieron acompañando y dando para adelante.

A todos los integrantes del Departamento de Bioingeniería que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme en el laboratorio.

A todos mis compañeros, que hoy ya son amigos, de Microlab.

## Resumen

La bioconversión de biomasa lignocelulósica, a combustibles y otros productos de alto valor agregado, está ganando importancia a nivel mundial. Los materiales lignocelulósicos forestales son considerados una materia prima muy promisoría por su rápido crecimiento en suelos relativamente pobres y alto contenido en celulosa y hemicelulosa. El hidrolizado de hemicelulosa, contiene como azúcar mayoritario xilosa, que puede ser fermentada por levaduras para producir bioetanol y/o xilitol.

Los objetivos de este trabajo fueron seleccionar y evaluar levaduras fermentadoras de xilosa para la producción de xilanasas, etanol y xilitol a partir de materiales lignocelulósicos. Se evaluó la actividad xilanasa, el crecimiento en medios semi-sintéticos conteniendo xilosa como fuente principal de carbono y la capacidad de producir etanol y/o xilitol de 13 cepas de levaduras del cepario del Laboratorio de Micología y del Departamento de Bioingeniería. Las cepas estudiadas pertenecían a las especies *Sporobolomyces pararoseus*, *Trichosporon pullulans*, *Cryptococcus magnus*, *Cryptococcus laurentii* (2 cepas), *Cryptococcus podzolicus* (3 cepas), *Candida fermentati* (2 cepas), y *Candida guilliermondii*; dos de las cepas no tenían identificación. También se estudió la cepa *Scheffersomyce stipitis* NBRC 10063 como cepa de referencia. Todas las levaduras estudiadas crecieron en medios con xilosa como principal fuente de carbono. Además, la cepa *Trichosporon pullulans* mostró actividad xilanasa. Se seleccionaron cinco cepas (*Sporobolomyces pararoseus* L-6, *Trichosporon pullulans* 80-2, *Candida guilliermondii* L-784, *Candida fermentati* L-980, y *Cryptococcus podzolicus* L-279) en base a su velocidad específica de crecimiento y su capacidad de producción de etanol, para continuar con los ensayos de fermentación.

Posteriormente, se evaluó la capacidad de producción de etanol y/o xilitol de las cepas seleccionadas en un medio semi-sintético con xilosa y un hidrolizado de madera de eucalipto.

En la fermentación del medio sintético con xilosa, la cepa que mostró mejor desempeño con respecto a la producción de etanol fue *Sporobolomyces pararoseus* L-6 que produjo 16 g/L etanol, con un rendimiento ( $Y_{P/S}$ ) de 0,32 g

etanol/g xilosa correspondiente a una eficiencia del 63% del valor teórico, y un consumo del 99% de la xilosa en 144 horas. En la producción de xilitol, se destacó la cepa *Candida fermentati* L-784 con una concentración final de 26 g/L de xilitol con una eficiencia de producción de 58% y utilizando un 98% de la xilosa.

Durante la fermentación del medio de hidrolizado de eucalipto se detectó la presencia de ácido fórmico y acético lo que pudo inhibir a las cepas ensayadas, ya que no presentaron un alto consumo de xilosa y obtuvieron baja producción de etanol y/o xilitol. Los rendimientos resultaron menores que los alcanzados en la fermentación del medio semi-sintético. Las cepas *Trichosporon pullulans* 80-2 y *Candida fermentati* L-980 resultaron prometedoras para fermentar los hidrolizados hemicelulósicos y producir etanol y/o xilitol, debiéndose optimizar las condiciones experimentales para maximizar los rendimientos de fermentación de uno de estos productos. Además, la cepa *Trichosporon pullulans* 80-2 tiene la capacidad de degradar xilanos, y por lo tanto, presenta potencial para su uso en el proceso de hidrólisis de la hemicelulosa.

## Índice

1- Introducción.....	1
1.1 Biorrefinería.....	2
1.2 Materias primas lignocelulósicas.....	3
1.2.1 Eucalipto .....	3
1.3 Pretratamientos de las materias primas.....	4
1.3.1 Pretratamientos físicos.....	6
1.3.2 Pretratamientos químicos.....	6
1.3.3 Pretratamientos fisicoquímicos .....	7
1.3.4 Autohidrólisis .....	8
1.4 Bioetanol .....	9
1.4.1 Producción de bioetanol.....	9
1.5 Xilitol .....	12
1.5.1 Producción de xilitol .....	13
1.6 El proceso de fermentación .....	17
1.7 Enzima Xilanasa .....	19
2- Objetivos .....	21
2.1 Objetivo General .....	22
2.2 Objetivos específicos .....	22
3- Materiales y métodos .....	23
3.1 Levaduras .....	24
3.2 Actividad xilanasa .....	27
3.3 Curva de crecimiento en medio semi-sintético con xilosa .....	28

3.4 Ensayos de fermentación.....	28
3.4.1 Desarrollo de inóculo.....	28
3.4.2 Fermentación de medio semi-sintético.....	29
3.4.3 Fermentación del medio hidrolizado.....	29
<i>Preparación del medio de hidrolizado</i> .....	29
<i>Fermentación del medio hidrolizado</i> .....	30
3.5 Métodos analíticos .....	30
3.6 Cálculos .....	31
3.7 Análisis estadístico.....	31
4- Resultados y discusión.....	32
4.1 Actividad xilanasa .....	33
4.2 Curva de crecimiento en medio semi-sintético con xilosa.....	34
4.3 Ensayos de fermentación.....	39
4.3.1 Fermentación de medio semi-sintético.....	39
4.3.2 Fermentación de hidrolizado de eucalipto.....	45
5- Conclusiones.....	50
6- Bibliografía .....	52
7- Anexo .....	59

## Índice de figuras

Figura 1. Efecto del pretratamiento en la biomasa lignocelulósica.....	5
Figura 2: Proceso de producción de bioetanol a partir de diferentes tipos de materias primas.....	10
Figura 3. Azúcares fermentables a partir de las distintas materias primas utilizadas en la producción de bioetanol.....	12
Figura 4. Procesos de producción de xilitol. Adaptado de Rafiqul et al. (2013). .....	15
Figura 5. Producción de inhibidores. Principales rutas de formación de inhibidores a partir de biomasa lignocelulósica .....	16
Figura 6. Rutas metabólicas y de regeneración de cofactores del metabolismo de la D- Xilosa en levaduras.....	18
Figura 7. Placa de actividad xilanasa de la cepa, <i>Trichosporom pullulans</i> 80-2 a 24°C. ....	34
Figura 9. Perfiles de concentración de xilosa, xilitol y etanol durante la fermentación del medio semi-sintético de las cepas productoras de etanol.....	42
Figura 10. Perfil de concentración de xilosa, xilitol y etanol durante la fermentación del medio semi-sintético de las cepas productoras de xilitol. ....	44
Figura 11. Perfil de concentración de xilosa, xilitol y etanol durante la fermentación del medio hidrolizado de eucalipto.....	49
Figura 12. Curvas de crecimiento de las cepas que no se continuaron estudiando.....	60
Figura 13. Perfiles de de los recuentos llevados a cabo durante la fermentación del medio semi-sintético.....	61
Figura 14. Perfiles de los recuentos obtenidos en la fermentación del hidrolizado de eucaliptus.....	62

## Índice de tablas

Tabla 1. Cepas de levaduras usadas en este estudio con sus respectivos orígenes .....	25
Tabla 2. Parámetros obtenidos en medio YPX.....	35
Tabla 3. Parámetros de fermentación obtenidos en el medio semi-sintético con 50 g/L de xilosa iniciales.....	40
Tabla 4. Parámetros de fermentación obtenidos en el medio con hidrolizado de eucalipto con una concentración inicial de xilosa de 30 g/L. ....	46

---

# 1- Introducción

---

## 1.1 Biorrefinería

La principal fuente de energía usada para el transporte es el petróleo. Se prevé que su demanda aumente en un 38% para el 2030 siendo el sector del transporte el responsable del 60% de este aumento. Para reducir la dependencia del petróleo y mitigar los daños ambientales debidos su uso, se están buscando nuevas tecnologías para la producción y el desarrollo de fuentes de energía alternativas a los combustibles fósiles. La biomasa lignocelulósica representa una materia prima promisoría para la producción de biocombustibles líquidos como el etanol, así como también para la producción de otros materiales y químicos producidos actualmente a partir del petróleo (Cherubini, 2010).

Según la Agencia Internacional de Energía (IEA), biorrefinería se define como el procesamiento sostenible de biomasa (materia orgánica) para obtener un amplio espectro de productos comercializables y energía. Este concepto abarca un amplio rango de tecnologías que permitan separar la biomasa en sus componentes estructurales, como carbohidratos, proteínas, triglicéridos, entre otros, los cuales pueden ser convertidos a productos con valor agregado, como biocombustibles y otros productos químicos (Cherubini, 2010).

La producción sostenible de biomasa es un tema crucial, ya que está especialmente relacionada a una posible competencia por tierras fértiles usadas para la producción de alimentos. Las biorrefinerías de primera generación utilizan cultivos ricos en almidón o lípidos, como la caña de azúcar o el girasol, los cuales compiten con la industria de alimentos (Scoma et al., 2016). Las biorrefinerías de segunda generación utilizan materias primas que no compiten con productos alimenticios, ni por las tierras usadas para producirlos. Las materias primas lignocelulósicas, pueden provenir de variadas fuentes, por ejemplo, residuos agrícolas, residuos forestales, cultivos forrajeros perennes, cultivos energéticos leñosos, lo que asegura una fuente renovable, abundante y de precios reducidos (Carriquiry et al., 2011).

## 1.2 Materias primas lignocelulósicas

Las materias primas lignocelulósicas son muy apropiadas para su bioconversión a otros productos debido a su composición. El componente mayoritario es la celulosa (entre un 35 y 50%), un polisacárido compuesto exclusivamente por cadenas de glucosa unidas por un enlace glicosídico  $\beta$ -(1,4) unidas entre ellas mediante enlaces de hidrógeno para formar las fibras de celulosa. Esto lo hace una estructura difícil de degradar (Mood et al., 2013).

El segundo componente en abundancia de la biomasa lignocelulósica es la hemicelulosa (entre un 20 y 35%), la cual es un polímero ramificado y heterogéneo compuesto por: pentosas como xilosa y arabinosa, hexosas como manosa, glucosa y galactosa y/o ácidos urónicos como  $\alpha$ -D-glucurónico,  $\alpha$ -D-4-O-methylgalacturónico y ácidos  $\alpha$ -D-galacturónicos (Mood et al., 2013). Las hemicelulosas más abundantes son los xilanos, cuya composición varía dependiendo del tipo de planta, pero en la gran mayoría de los casos su componente más abundante es la xilosa (Saha, 2003).

El tercer elemento principal es la lignina (entre un 15 y 20 %), el cual se trata de un heteropolímero amorfo insoluble en agua, compuesto por unidades de fenilpropanos unidos por enlaces no hidrolizables que se entrelazan entre la celulosa y la hemicelulosa brindando a la planta soporte estructural y protección frente al ataque de los microorganismos y a la degradación enzimática (Sánchez, 2009).

A pesar de los beneficios anteriormente mencionados de las materias primas lignocelulósicas para su uso en las biorrefinerías, éstas aún no son totalmente rentables para la producción de biocombustibles de segunda generación a escala industrial y se están realizando muchas investigaciones para poder llevar esto a cabo.

### 1.2.1 Eucalipto

Las distintas especies de eucalipto (más de 700) son nativas de Australia. En la actualidad se encuentran distribuidas en diferentes regiones del mundo. Son cultivos forestales de corta rotación, siendo el cultivo de madera dura más

valioso y extensamente plantado en el mundo. Estos han tenido gran éxito a pesar de ser especies exóticas debido a su rápido crecimiento y a varios mecanismos de adaptación efectivos, como lo son: la capacidad de rebrote, resistencia a insectos y sequías, tolerancia a la acidez del suelo y a una baja fertilidad, entre otros. El 80% de los cultivos en todo el mundo, pertenecen a cuatro especies: *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus urophylla*, *Eucalyptus camaldulensis* y *Eucalyptus globulus* (Rockwood et al., 2008).

La madera de eucalipto tiene la siguiente composición (en base seca): glucanos 49,0%, xilanos 15,0%, arabinanos < 1%, lignina 28,0%, grupos acetilos 3,8%, extractivos (en acetona y agua) 2,36% y cenizas 0,37% (Guigou et al., 2017), pudiendo variar estos valores según la especie. Esta composición hace del eucalipto una materia prima promisoría para ser empleada en biorrefinerías de segunda generación.

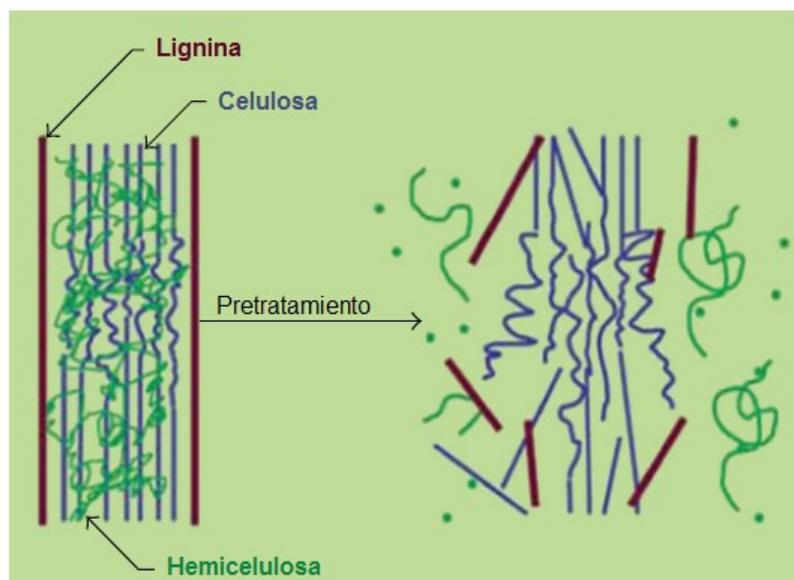
En Uruguay la actividad forestal ha tenido una gran expansión a partir de la aprobación de la Ley forestal N° 15.939, siendo el eucalipto la especie más plantada, con 726.323 hectáreas plantadas al 2012 según la Dirección General Forestal (<http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/direccion-general-forestal/informacion-tecnica/estadisticas-y-mercados/recurso-forestal>). Hoy en día la pasta de celulosa está dentro de los principales productos de exportación del Uruguay y se estima que lidere el ranking de exportaciones en los próximos años, lo que llevaría a una necesidad de aumentar el área de plantaciones de eucalipto. Por lo tanto, podría ser una interesante materia prima para producir bioproductos en nuestro país.

### 1.3 Pretratamientos de las materias primas

Debido a su estructura compleja, los materiales lignocelulósicos necesitan de tratamientos que permitan romper su estructura para liberar los diferentes componentes con mínima degradación y dejando los carbohidratos accesibles a los microorganismos encargados de llevar a cabo la bioconversión en productos de interés (Figura 1) (Brodeur et al., 2011; Galbe y Zacchi, 2012).

El pretratamiento utilizado tiene que lograr ciertos objetivos (Galbe y Zacchi, 2012):

- Alcanzar un alto nivel de recuperación de todos los carbohidratos.
- Lograr una alta digestibilidad de la celulosa en la hidrólisis enzimática, aumentando el área accesible y el tamaño de los poros, y disminuyendo la cristalinidad y el grado de polimerización de la celulosa.
- No tiene que producir, o producir en muy bajas cantidades, productos de degradación de azúcares y lignina.
- Tiene que resultar en una alta concentración de sólidos.
- Requerir baja demanda energética, o ser llevado a cabo de una manera que la energía pueda ser reutilizada en otras etapas.
- Requerir bajo capital y bajo costo operacional para que sea rentable.



**Figura 1. Efecto del pretratamiento en la biomasa lignocelulósica** (Mosier et al., 2005).

Existen distintos tipos de pretratamientos los cuales se clasifican en: pretratamientos físicos, químicos, fisicoquímicos, y biológicos (Brodeur et al., 2011).

### 1.3.1 Pretratamientos físicos

Entre estos se encuentran los pretratamientos mecánicos, como por ejemplo la molienda para reducir el tamaño de partícula. Se pueden utilizar molinos de bolas, molinos de rodillos, molinos de martillo, y molinos vibro-energéticos. Estos métodos suelen usarse como un paso previo al uso de otros pretratamientos.

También existen los pretratamientos térmicos, los cuales se emplean exitosamente tanto a nivel de laboratorio como a escala industrial. El principal efecto de estos es la desintegración de las membranas celulares de la biomasa lo que lleva a la solubilización de los compuestos orgánicos, principalmente de la hemicelulosa y la lignina. Se usan distintos mecanismos para aumentar la temperatura de la biomasa como vapor y microondas (Harmsen, et al., 2010; Taherzadeh y Karimi, 2008).

### 1.3.2 Pretratamientos químicos

Estos tienen como objetivo romper la estructura de las materias primas lignocelulósicas mediante reacciones químicas. Entre estos se destacan:

*Hidrólisis alcalina:* se basa en la aplicación de soluciones alcalinas como NaOH,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  o amoníaco para la remoción de la lignina y parte de la hemicelulosa e incrementar la accesibilidad de enzimas a la celulosa. La ventaja de este método es que no necesita de altas temperaturas, aunque si necesita tiempos de reacción largos. La desventaja es que los componentes químicos que se usan forman sales que pueden incorporarse a la biomasa y necesitan ser removidas (Harmsen et al., 2010; Taherzadeh et al., 2008).

*Hidrólisis ácida:* Este método puede operarse tanto a baja temperatura ( $40^\circ\text{C}$ ) y empleando ácidos concentrados (30-70%) o a alta temperatura ( $130-190^\circ\text{C}$ ) y baja concentración de ácido (0,1-1%). El tratamiento con ácido diluido es el pretratamiento más utilizado, ya que para la utilización de ácidos concentrados se necesitan equipos más costosos, recuperar el ácido, lo que es un proceso demandante de energía y se utilizan grandes cantidades de cal para la neutralización. El ácido más utilizado es el sulfúrico, pero también es posible

utilizar ácido clorhídrico o nítrico. La hidrólisis ácida es muy eficiente en la remoción de la hemicelulosa (llegando casi al 100%) y en la obtención de sus azúcares en solución, pero no es en nada eficiente en la remoción de la lignina. Las desventajas son la formación de inhibidores de la fermentación microbiana debido a la degradación de azúcares (Harmsen et al., 2010; Taherzadeh et al., 2008).

*Ozonólisis:* Este pretratamiento se lleva a cabo tratando la biomasa con ozono. Es muy efectivo en la degradación de la lignina y parte de la hemicelulosa. A pesar de ser un método caro ya que necesita muchas cantidades de ozono, podría ser bastante atractivo ya que es realizado a temperatura ambiente y no genera compuestos tóxicos (Harmsen et al., 2010; Taherzadeh et al., 2008).

*Oxidación húmeda:* En este proceso, los materiales son tratados con agua y aire u oxígeno a altas temperaturas (entre 120 y 200°C) y presión. Es un método efectivo separando la fracción celulósica de la lignina y la hemicelulosa. En este proceso se da un balance entre la degradación y la solubilización de la hemicelulosa, por lo que se generan subproductos. También suelen agregarse agentes oxidantes como peróxido de hidrógeno lo que lleva a un aumento en la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática (Harmsen et al., 2010; Taherzadeh et al., 2008).

### 1.3.3 Pretratamientos fisicoquímicos

Estos pretratamientos combinan los métodos físicos y químicos. A continuación se detallan algunos de ellos.

*Explosión por vapor:* Es otro de los pretratamientos más utilizados debido a su bajo uso de químicos, un consumo de energía moderado y satisface todos los requerimientos de un pretratamiento. Este se realiza inyectando vapor saturado a alta presión donde la temperatura puede alcanzar entre 160 y 260°C y luego de un breve lapso de tiempo que suele ser de entre 30 segundos y 30 minutos la presión es reducida rápidamente lo que lleva a una descompresión explosiva de los materiales. Este tratamiento genera una fase sólida y una fase líquida que pueden ser separadas (Harmsen et al., 2010; Taherzadeh et al., 2008).

*Explosión de fibra por amoníaco (AFEX):* Es uno de los tratamientos fisicoquímicos alcalinos, en el cual la biomasa es expuesta a amoníaco líquido (entre 1 y 2 kg por kilo de biomasa seca) a relativamente altas temperaturas (entre 90 y 100°C) durante un periodo de tiempo (alrededor de 30 minutos) seguido de una rápida disminución de la presión. Este lleva a una eficaz remoción de la lignina y una remoción parcial de la celulosa y la hemicelulosa. A diferencia de otros pretratamientos como la explosión por vapor, este produce un material sólido pretratado únicamente, que no puede ser separado en una fase líquida y una sólida. Otro punto a tener en cuenta en este pretratamiento es que debe recuperarse luego del tratamiento para hacer más rentable y menos contaminante al mismo (Harmsen et al., 2010; Taherzadeh et al., 2008).

*Explosión por CO<sub>2</sub>:* Es un método similar al de explosión por vapor o el de explosión por amoníaco, pero lo que se inyecta es CO<sub>2</sub> a alta presión, la cual se libera generando una descompresión explosiva. El CO<sub>2</sub> reacciona y se forma ácido carbónico el cual incrementa la tasa de hidrólisis, aunque este método no ha mostrado obtener mejores resultados que los otros métodos por explosión (por vapor y AFEX). Una alternativa al CO<sub>2</sub> es el CO<sub>2</sub> supercrítico, el cual es muy usado como un solvente de extracción y ha demostrado que mejora el rendimiento del pretratamiento, pero su alto costo no lo hace apto para el uso industrial.

### **1.3.4 Autohidrólisis**

El método de pretratamiento de autohidrólisis o también conocido como proceso de extracción con agua caliente, consiste en someter el material húmedo a alta presión y temperatura durante períodos de tiempo que van desde minutos a horas. Este método logra extraer parcialmente los oligómeros de hemicelulosa, principalmente oligómeros de xilosa, dejando los otros componentes de la biomasa intactos (celulosa y lignina). Estos azúcares de la hemicelulosa, principalmente xilosa, quedan disueltos en la fracción líquida y pueden ser fermentados por diferentes tipos de microorganismos. La fracción sólida que queda tras este pretratamiento puede ser quemado para producir vapor o electricidad o alternativamente puede ser usado como materia prima

para la producción de pulpa y papel, productos de madera o incluso producir etanol a partir de la celulosa.

Durante el proceso de extracción con agua caliente son producidos ácidos por la hidrólisis de la hemicelulosa. Estos ácidos causan que el pH del “licor” disminuya auto-catalizando eficazmente el proceso (Pu et al., 2011).

## 1.4 Bioetanol

El etanol es el biocombustible alcohólico más popular disponible actualmente en el mercado mundial. El 68% del etanol producido mundialmente es utilizado como combustible, ya sea como aditivo de la gasolina o como combustible por sí mismo; el 21% tiene uso industrial y el restante 11% se utiliza para consumo humano (Vohra et al., 2014).

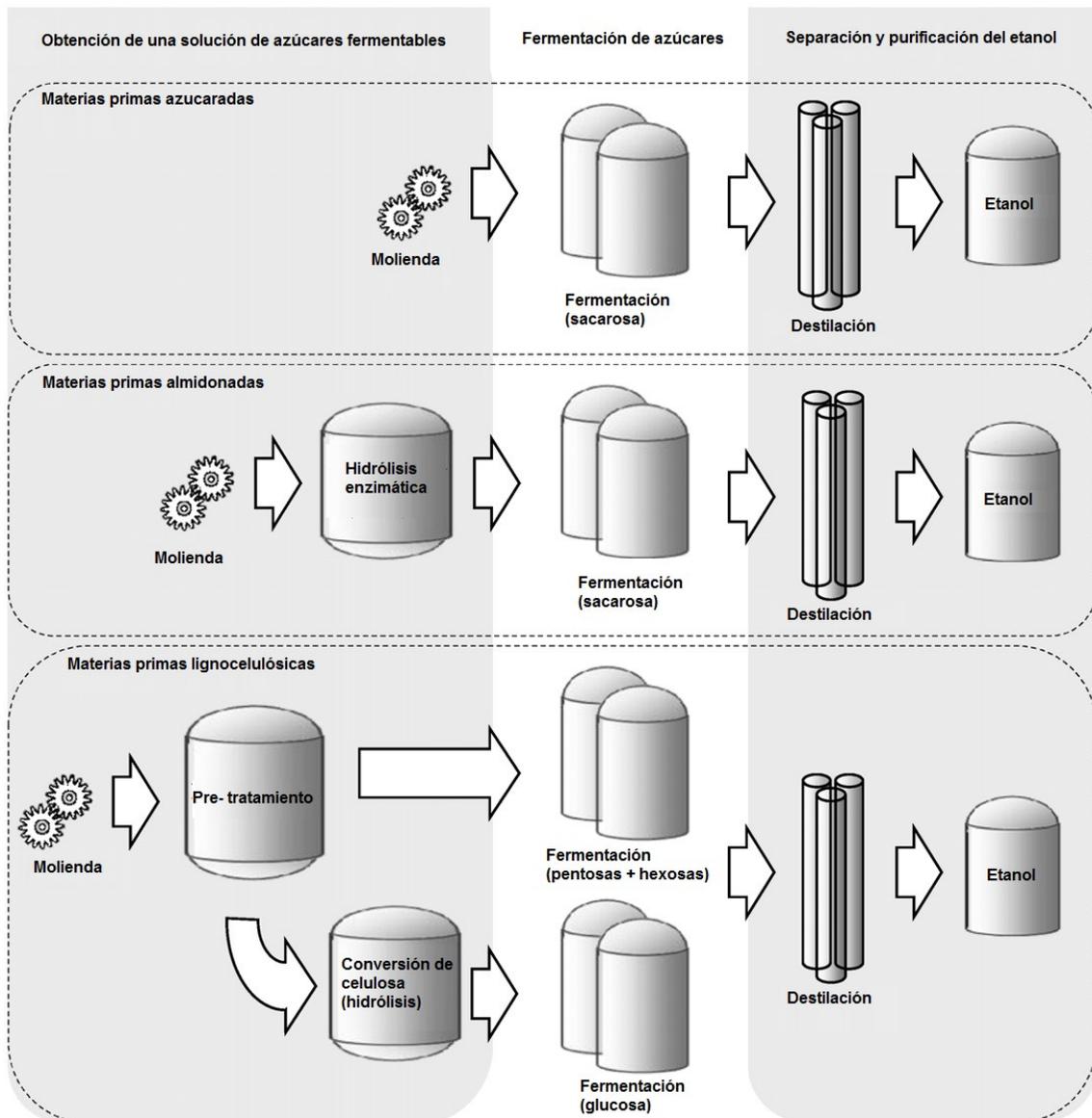
Existen varias razones para que sea utilizado como un combustible alternativo a los combustibles fósiles:

- Puede ser producido a partir de muchas fuentes renovables, hoy en día se utilizan cultivos dedicados especialmente para su producción, como maíz y caña de azúcar, pero se está investigando para poder producirlo a escala industrial a partir de materias primas lignocelulósicas.
- Es menos tóxico que cualquier otro combustible alcohólico.
- Los subproductos producidos por su oxidación incompleta resultan ser menos tóxicos que los de otros combustibles alcohólicos (Vohra et al., 2014).

### 1.4.1 Producción de bioetanol

Hay tres grandes grupos de materias primas que se usan para producir bioetanol: las materias primas azucaradas (caña de azúcar, remolacha azucarera y sorgo dulce son los más utilizados), las materias primas amiláceas (maíz, trigo y cebada son las más utilizadas) y por último las materias primas lignocelulósicas, las cuales ya se describieron anteriormente en este capítulo.

El proceso general de producción de bioetanol consta principalmente de 3 grandes pasos. El primero es obtener una solución que contenga azúcares fermentables disueltos, el segundo paso es la fermentación de estos azúcares para convertirlos en etanol y el último paso es la separación y la purificación del etanol, generalmente por rectificación, destilación o deshidratación (Figura 2). Pero a estos pasos se le pueden agregar otros procesos intermedios dependiendo de la materia prima de la cual se vaya a producir el bioetanol.



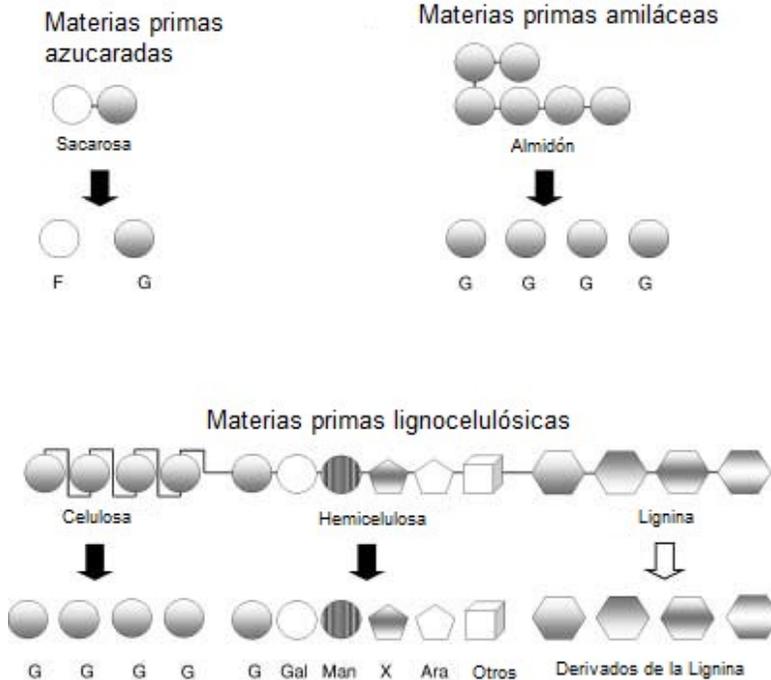
**Figura 2: Proceso de producción de bioetanol a partir de diferentes tipos de materias primas.** Imagen adaptada de Mussatto et al., 2010.

El procesamiento de las materias primas azucaradas es el más sencillo, ya que contienen una alta concentración de azúcar en forma de monosacáridos ya disponibles para fermentar. Por lo tanto, el único procesamiento que necesitan es la molienda para la extracción de dichos azúcares, generalmente en “jugos azucarados” fácilmente fermentables.

Para las materias primas amiláceas el proceso es más complejo, ya que la mayoría de sus azúcares se encuentran formando parte del almidón, que es un polímero de glucosa. Por lo tanto, luego de la molienda, se debe hidrolizar el almidón (en forma enzimática o química), y luego el proceso continúa con la fermentación.

Las materias primas lignocelulósicas usadas para la producción de bioetanol son mucho más complejas de procesar como se mencionó anteriormente, haciendo que sean difíciles de utilizar para aplicaciones comerciales en la actualidad (Vohra et al., 2014).

En la Figura 3 se pueden apreciar los monómeros de azúcares producidos a partir de estos tres tipos de materias primas.



**Figura 3. Azúcares fermentables a partir de las distintas materias primas utilizadas en la producción de bioetanol.** Las flechas representan hidrólisis (solo los monómeros generados por hidrólisis representados por flechas negras pueden ser fermentados). *G*: glucosa, *Gal*: Galactosa, *F*: fructosa, *Man*: Manosa, *X*: xilosa, *Ara*: Arabinosa, *Otros*: L-ramnosa, L-fucosa, ácidos urónicos (Adaptado de Zaldivar et al., 2001).

### 1.5 Xilitol

El xilitol ( $C_5H_{12}O_5$ ) es un polialcohol poco común (se produce en muy pequeñas cantidades en la naturaleza), y es el primero en llegar al mercado global. Actualmente la producción de xilitol tiene una gran demanda, de más de 125.000 toneladas al año a un costo relativamente alto (entre US\$ 5-7 por kilo en la industria y aproximadamente US\$ 20 en supermercados) moviendo más de 340 millones de dólares al año y aumentando año a año (de Albuquerque et al., 2014).

El xilitol es utilizado principalmente en la industria alimenticia, en la odontológica y en la farmacéutica (su uso está aprobado en más de 50 países) brindando grandes beneficios a cada una de ellas, pero limitando su uso a

causa de su alto costo. Las aplicaciones del xilitol en la industria se deben a sus principales características: tiene una dulzura relativa muy similar a la de la glucosa, pero conteniendo un 40% menos de calorías. Otra muy importante es que su metabolismo es independiente de insulina, haciéndolo un endulzante adecuado para pacientes con diabetes y también tiene como propiedad que es anticariogénico, ya que se ha visto que disminuye la formación de caries dentales en hasta un 100%. Además, este polialcohol es químicamente inerte ya que no es fermentable, no sufre las reacciones de Maillard y no reacciona con excipientes o compuestos activos de productos farmacéuticos.

Debido a esto el xilitol tiene un amplio uso, que va desde endulzante en la preparación de alimentos para diabéticos o personas con problemas de sobrepeso sin alterar el sabor en comparación con productos convencionales endulzados con sacarosa, es usado como componente de productos odontológicos como pastas de dientes y enjuagues bucales gracias a que no es metabolizable por las bacterias que causan las caries, y también tiene un amplio uso en la industria farmacéutica como endulzante o también debido a propiedades como la prevención de la otitis (de Albuquerque et al., 2014; Rafiqul y Sakinah, 2013; Ur- Rehman et al., 2015).

### **1.5.1 Producción de xilitol**

El xilitol puede producirse como un producto intermediario en el metabolismo de carbohidratos en humanos (entre 5 y 15 gramos producidos por día en adultos), y animales. También se encuentra en la naturaleza en pequeñas cantidades en algunas frutas y vegetales, como bananas, uvas, frutillas, ciruelas amarillas, frambuesas, lechuga, zanahoria, coliflor, cebolla. El xilitol podría extraerse de estas materias primas mediante una extracción sólido/líquido pero este proceso no es factible debido al alto costo de estos productos y de la baja concentración de xilitol en ellos (Rafiqul et al., 2013).

Debido a esto muchas investigaciones se han llevado a cabo en búsqueda de métodos alternativos de producción de xilitol. Hoy en día industrialmente el xilitol se produce mediante un proceso químico, que consiste en la hidrogenación de xilosa pura en una reacción catalizada por níquel.

El proceso químico consta de 4 etapas: hidrólisis de biomasa lignocelulósica mediante ácido inorgánico, purificación y separación del hidrolizado para obtener xilosa pura en solución o en forma cristalina, reducción catalítica de la xilosa para obtener xilitol y finalmente la cristalización y separación del xilitol (Rafiqul et al., 2013).

Este proceso es muy costoso y trae varios problemas ambientales en distintas etapas de su proceso como se puede apreciar en la Figura 4. El paso de purificación de la xilosa a partir del hidrolizado de la materia prima lignocelulósica es muy costoso ya que demanda varios pasos de purificación mediante cromatografía y tiene una demanda energética elevada. Una vez obtenida la xilosa pura es necesario reducirla para obtener xilitol, este proceso necesita de condiciones muy especiales, ya que se realiza a altas temperaturas, entre 80 y 140°C y a una presión de 50 atmósferas en presencia del catalizador níquel Raney. Este paso demanda altas cantidades de energía y equipamiento especializado y muy costoso. Por último, en la etapa final del proceso son nuevamente necesarios varios procesos de purificación mediante cromatografía. Además de los elevados costos de producción, es un proceso muy ineficiente ya que el rendimiento se encuentra entre el 50 y 60% de la fracción de xilano o representa un 8-15% de la materia prima inicial (Rafiqul et al., 2013).

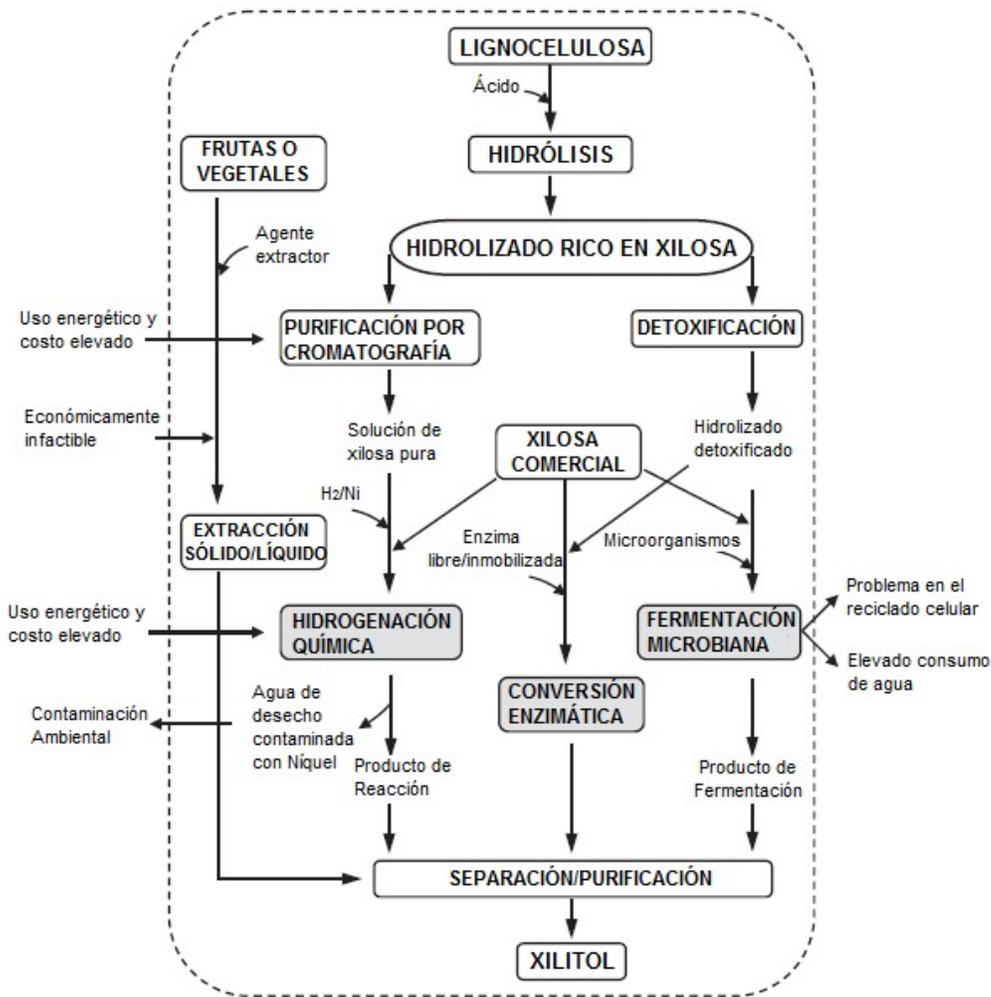
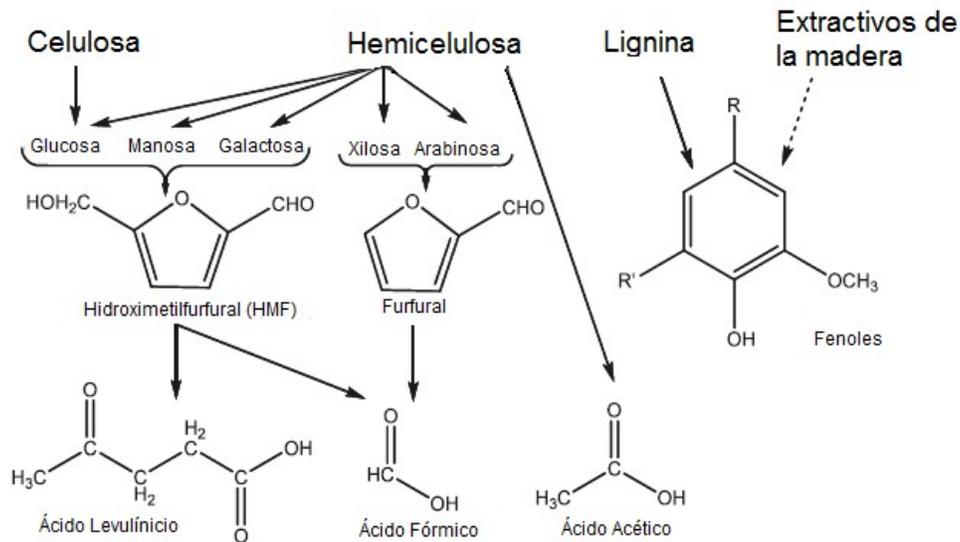


Figura 4. Procesos de producción de xilitol. Adaptado de Rafiqul et al. (2013).

Debido al alto costo del método de producción de xilitol actual, se buscan métodos de producción a escala industrial alternativos. Uno de los más investigados y prometedores es la biosíntesis de xilitol, mediante la fermentación de xilosa. Este método consiste de 4 etapas. La primera etapa es la misma que en el método químico ya que se debe obtener un hidrolizado rico en xilosa a partir de materias primas lignocelulósicas. Los pasos posteriores ya difieren del otro método y es donde se podrían obtener una reducción en los costos de producción del xilitol.

El hidrolizado obtenido debe detoxificar ya que puede contener compuestos tóxicos o inhibitorios de los procesos posteriores de fermentación(Figura 5),

como derivados de furanos, ácidos alifáticos y compuestos fenólicos producidos por la degradación de hexosas y pentosas (Mohamad et al., 2015). En este método no es necesario purificar la xilosa, evitando así los costos relacionados a la purificación por cromatografía.



**Figura 5. Producción de inhibidores.** Principales rutas de formación de inhibidores a partir de biomasa lignocelulósica. Adaptado de Jönsson et al., 2013.

La eficiencia del método de detoxificación depende de varios factores, como el tipo de biomasa utilizada (distinta composición produce diferentes inhibidores), el método de hidrólisis (las distintas condiciones favorecen la formación de diferentes compuestos tóxicos) y los microorganismos a utilizar (no todos los microorganismos son sensibles a los mismos inhibidores ni a las mismas concentraciones).

Los métodos de detoxificación utilizados pueden ser físicos o químicos. Entre los métodos físicos se encuentra la evaporación en vacío el cual reduce algunos compuestos volátiles como el ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural (HMF) y vainillina, que están presentes normalmente en los hidrolizados. Sin embargo, este método reduce el volumen total del mismo e incrementa la concentración de otros compuestos volátiles (Mohamad et al., 2015).

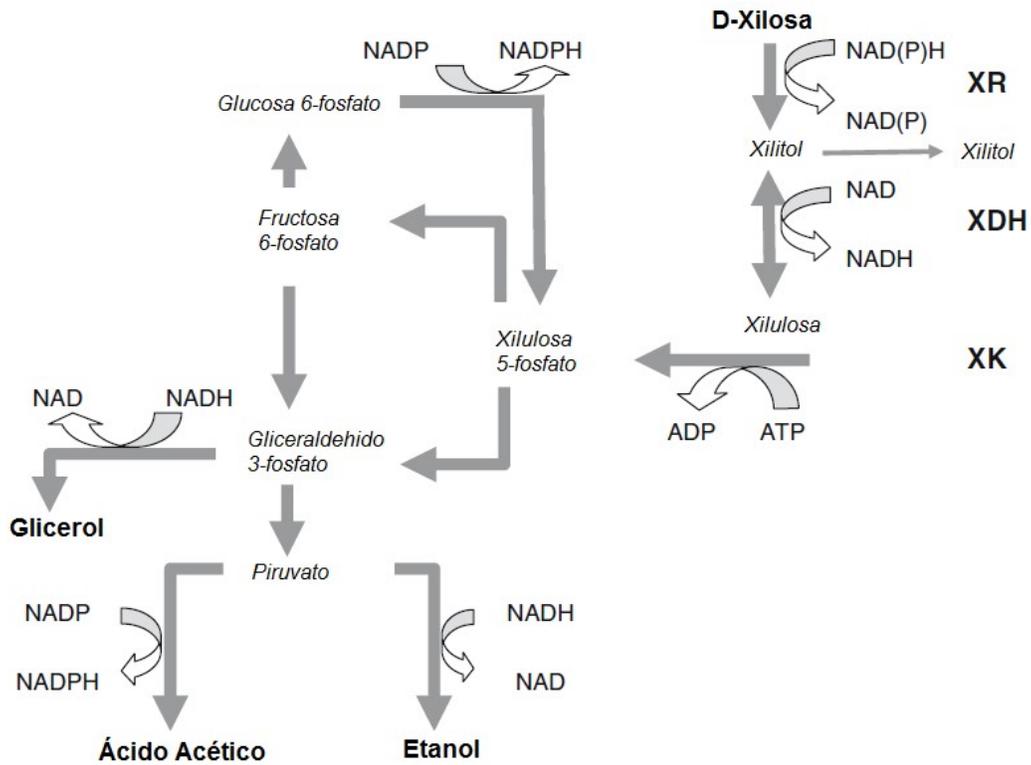
Por otro lado, están los métodos químicos como la extracción con solventes orgánicos, tratamiento con resinas de intercambio iónico, adsorción con carbón activado y detoxificación por ajuste de pH. Este último es muy efectivo en términos de costos y en eficiencia en la detoxificación en comparación con otros métodos y está comprobada la efectiva remoción de compuestos fenólicos, cetonas, furfurales e hidroximetilfurfurales de los hidrolizados. Se lleva a cabo aumentando el pH de la solución con una base fuerte, que generalmente suele ser hidróxido de calcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) o hidróxido de sodio, hasta pH 10-11 y luego se ajusta el pH al óptimo para la fermentación. El mecanismo de este método no está completamente elucidado. Se asume que parte del efecto de detoxificación se da por la precipitación de las sustancias tóxicas (principalmente cuando se usa hidróxido de calcio ya que cuando se usa hidróxido de sodio no hay precipitado) y por modificaciones químicas de dichos elementos (Jönsson et al., 2013; Mohamad et al., 2015).

Se debe tener en cuenta, que los métodos de detoxificación pueden remover parte de los azúcares fermentables.

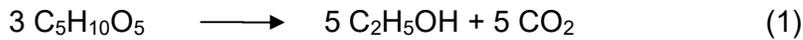
## 1.6 El proceso de fermentación

El proceso de fermentación de xilosa puede ser llevado a cabo por una gran variedad de microorganismos, como hongos, bacterias y levaduras. En este trabajo el enfoque principal se da en la fermentación de xilosa a etanol y xilitol, utilizando levaduras como microorganismo fermentador.

La fermentación de xilosa en las levaduras se lleva a cabo siguiendo las rutas metabólicas que se describen en la Figura 6. El xilitol es un producto intermediario en la producción de etanol. A partir de las ecuaciones (1) y (2) se puede obtener el rendimiento teórico de producción de etanol y xilitol respectivamente, a partir de xilosa, siendo 0,51 g de etanol producido por gramo de xilosa inicial; y 0,91 gramos de xilitol producido por gramo de xilosa inicial (Hamelinck et al., 2005; Vajzovic, 2013;).



**Figura 6. Rutas metabólicas y de regeneración de cofactores del metabolismo de la D-Xilosa en levaduras.** La producción de etanol y glicerol regeneran el NAD para la oxidación del xilitol por la XDH, en cuanto que la producción de acetato regenera NADPH para la reducción de xilosa por la XR. XR: xilosa reductasa, XDH: xilitol deshidrogenasa, XK: xiluloquinasa. Imagen adaptada de Granström et al. (2007).



Dentro de las levaduras más utilizadas para la producción de etanol a partir de xilosa se encuentra *Scheffersomyces stipitis* con baja formación de sub-productos, la cual requiere condiciones microaerobias para la producción de etanol (Agbogbo y Coward-Kelly, 2008). La disponibilidad de oxígeno juega un rol crucial en el metabolismo (Jeffries y Jin, 2000). Se ha reportado que

concentraciones de etanol mayores de 30 g/L inhiben la fermentación (1989). Sin embargo, se han alcanzado concentraciones de etanol de 41 g/L con rendimientos de 0,48 g de etanol por g de xilosa, y consumos de sustrato cercanos al 100% con tiempos de fermentación cercanos a 100 h con materiales lignocelulósicos (Agbogbo y Coward-Kelly, 2008).

Por otro lado, dentro de las levaduras más estudiadas para la producción de xilitol se destaca *Candida guilliermondii*. Se reporta como una de las más eficientes llegando a obtener valores de 66 g/L de concentración final de xilitol y un rendimiento de 0,84 g de xilitol / gramos de azúcar utilizando paja de arroz como materia prima en biorreactores. Utilizando bagazo de caña de azúcar y fermentando en matraces se llegó a obtener 50,5 g/L de xilitol final y un rendimiento de 0,81 g de xilitol / gramo de azúcar (Albuquerque et al., 2014). Sin embargo, los rendimientos dependen del tipo de microorganismo empleado y condiciones de fermentación (nutrientes, oxígeno, pH y temperatura) utilizados durante la conversión de azúcares a xilitol (Vajzovic, 2013).

En los últimos años se ha intensificado la búsqueda de microorganismos naturales o modificados genéticamente, para trabajar a escala comercial, capaces de producir altas concentraciones y con alto rendimiento del producto deseado, ser tolerante a los inhibidores presentes en los hidrolizados de materias primas lignocelulósicas, tolerar altas concentraciones del producto deseado (por ejemplo etanol), ser tolerantes al estrés osmótico producido por las altas concentraciones de azúcares en el hidrolizado, y no tener demasiados requerimientos nutricionales (Dien et al., 2003; Ghindea et al., 2010).

## 1.7 Enzima Xilanasa

Como ya se mencionó, la descomposición de la biomasa lignocelulósica en los azúcares que la componen (pretratamiento) es el primer paso en todos los procesos llevados a cabo en las biorrefinerías y es el que consume la mayor parte de la energía utilizada en el proceso. Durante este pretratamiento se pueden producir inhibidores de procesos posteriores de hidrólisis enzimática y fermentación.

Una posibilidad para mejorar la obtención de monosacáridos fermentables en solución es la hidrólisis enzimática de la hemicelulosa. Las enzimas capaces de hidrolizar los xilanos (componente principal) son las xilanasas. Las xilanasas son glucosidasas, que catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 del xilano. Estas son producidas por diversos microorganismos como bacterias hongos filamentosos y levaduras que incluyen una amplia variedad de enzimas que normalmente actúan en conjunto. Este sistema de enzimas xilanolíticas incluye a la  $\beta$ -1,4-endoxilanasas, la cual cliva los enlaces glicosídicos internos de la cadena principal del xilano; la  $\alpha$ -arabinofurosidasa, que hidroliza cadenas laterales de arabinosa; la  $\alpha$ -glucuronidasa, que remueve el ácido glucurónico de las cadenas laterales de las unidades del xilano; la xilano esterasa la cual libera grupos acetatos y por último la  $\beta$ -xilosidasa la cual hidroliza xilobiosa a xilosa. Estas actúan en sinergia, ya que muchas xilanasas no pueden romper enlaces glicosídicos entre las unidades del xilano si estas están sustituidas, por lo tanto, deben ser clivadas antes que la cadena principal pueda ser hidrolizada (Collins et al., 2005; Motta et al., 2013; Sharma y Kumar, 2013).

---

## **2- Objetivos**

---

## 2.1 Objetivo General

El objetivo de este trabajo fue seleccionar y evaluar diferentes levaduras fermentadoras de xilosa para la producción de xilanasas, etanol y xilitol a partir de materiales lignocelulósicos.

## 2.2 Objetivos específicos

- Determinar si las cepas estudiadas presentan la capacidad de producir enzimas extracelulares capaces de degradar polímeros de xilosa (actividad xilanasa).
- Seleccionar por lo menos 3 cepas que crezcan utilizando xilosa como fuente de carbono.
- Evaluar la capacidad de producir bioetanol y/o xilitol a partir de un medio sintético con xilosa como fuente de carbono, de por lo menos 3 cepas preseleccionadas.
- Evaluar la capacidad de obtención de bioetanol y/o xilitol a partir de un hidrolizado hemicelulósico de eucalipto con una cepa seleccionada.

---

## **3- Materiales y métodos**

---

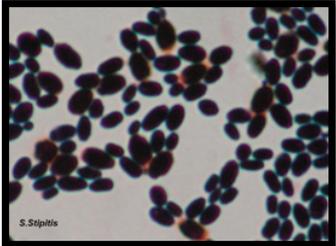
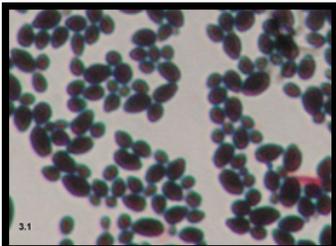
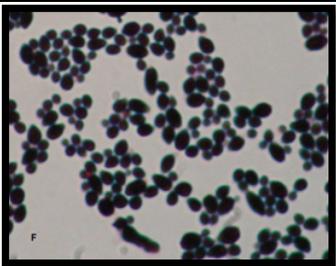
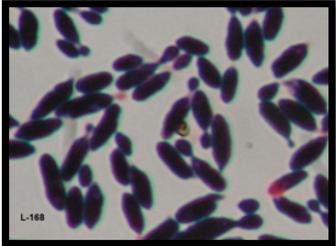
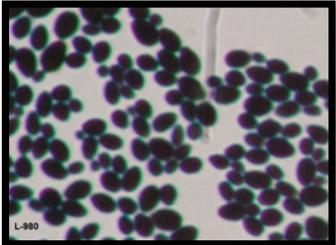
### 3.1 Levaduras

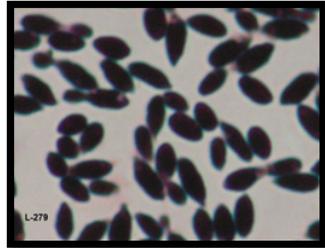
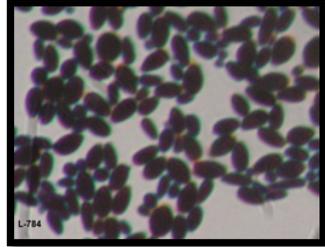
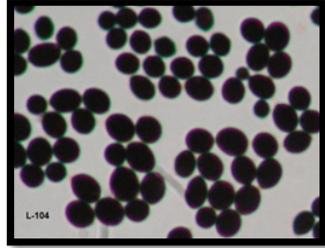
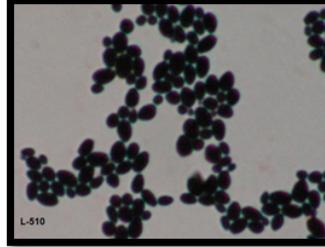
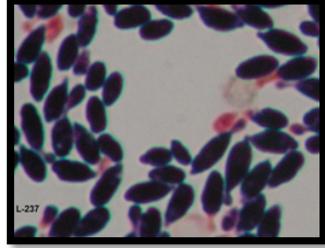
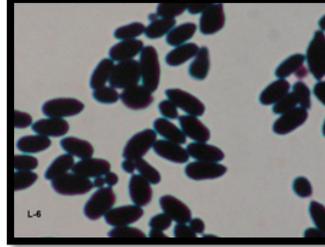
Las levaduras que se utilizaron en este trabajo son parte de la colección del cepario del Laboratorio de Micología, Facultad de Ciencias y del Departamento de Bioingeniería, Facultad de Ingeniería, UdelaR. Se eligieron estas cepas ya que estudios previos indicaron que podían tener actividad xilanasa y por su origen (se aislaron de muestras de vinaza de una planta de producción de etanol a partir de sorgo dulce).

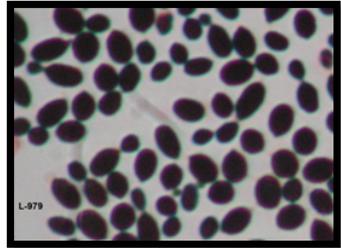
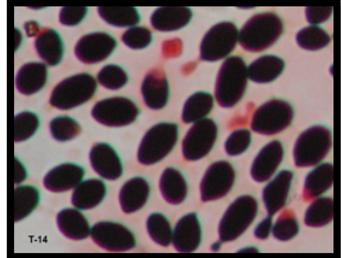
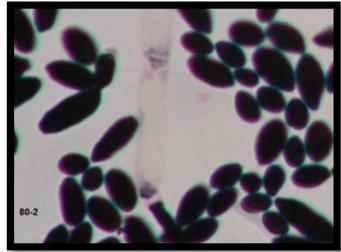
La Tabla 1 muestra las cepas utilizadas y su lugar de recolección. Dos cepas no han sido identificadas a nivel de género ni especie todavía; once cepas fueron identificadas como: *Sporobolomyces pararoseus*, *Trichosporon pullulans*, *Cryptococcus magnus*, *Cryptococcus laurentii* (2 cepas), *Cryptococcus podzolicus* (3 cepas), *Candida fermentati* (2 cepas), y *Candida guilliermondii*. También se estudió la cepa *S. stipitis* NBRC 10063 del cepario Japonés Biological Resource Center, NITE (NBRC).

Se les realizó tinción de Gram y se observó morfología de las colonias. Las cepas se conservaron por repiques en placas con medio YPD en heladera. También se conservaron en freezer a -20°C y -80°C.

**Tabla 1.** Cepas de levaduras usadas en este estudio con sus respectivos orígenes

Código	Levadura	Origen	Vista al microscopio (aumento 100x)
---	<i>Scheffersomyces stipitis</i> NBRC 10063	Cepario del Departamento de Bioingeniería	
3.1	<i>Desconocida</i>	Levadura que creció en medio rico en xilosa del cepario del Departamento Bioingeniería	
F	<i>Desconocida</i>	Levadura que creció en una placa de medio rico en xilano	
L-168	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	Suelos regados con vinaza de una planta de producción de etanol local	
L-980	<i>Candida fermentati</i>	Suelos regados con vinaza de una planta de producción de etanol local	

L-279	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	Suelos regados con vinaza de una planta de producción de etanol local	
L-784	<i>Candida guilliermondii</i>	Suelos regados con vinaza de una planta de producción de etanol local	
L-104	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Suelos regados con vinaza de una planta de producción de etanol local	
L-510	<i>Candida fermentati</i>	Suelos regados con vinaza de una planta de producción de etanol local	
L-237	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	Suelos regados con vinaza de una planta de producción de etanol local	
L-6	<i>Sporobolomyces pararoseus</i>	Suelos regados con vinaza de una planta de producción de etanol local	

L-979	<i>Cryptococcus laurentii</i>	Suelos regados con vinaza de una planta de producción de etanol local	
T-14	<i>Cryptococcus magnus</i>	Agua de mar, Antártida	
80-2	<i>Trichosporon pullulans</i>	Agua de cañada, Antártida	

### 3.2 Actividad xilanasa

La actividad xilanasa se determinó utilizando una tinción con rojo congo de las placas de crecimiento (Teather y Wood, 1982). Los ensayos de actividad xilanasa se llevaron a cabo a tres temperaturas 15, 20 y 24 °C. Se realizaron en placas Petri con medio compuesto por: xilano 10 g/L, extracto de levadura 1 g/L, extracto de malta 1 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,2 g/L, agar 10 g/L. Las placas se inocularon por triplicado y se revelaron utilizando una solución de rojo congo 0,25% en buffer tris 0,1 N pH 8 durante 30 minutos y luego se lavaron con solución de NaCl 0,5 N en buffer tris 0,1 N pH 8 para develar la presencia de halos de actividad.

### 3.3 Curva de crecimiento en medio semi-sintético con xilosa

La curva de crecimiento de cada cepa se estudió en tubos de 50 mL conteniendo 10 mL de medio YPX (10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona, 10 g/L de extracto de malta y 20 g/L de xilosa) a 30°C y 150 rpm en agitador orbital los cuales se inocularon con dos ansadas de cada cepa previamente cultivadas en placas con medio YPX. A distintos tiempos se tomaron muestras para la determinación de biomasa por medidas de densidad óptica a 600 nm. Se determinó el peso seco de cada muestra, a tiempo final, centrifugando 1,5 mL de muestra en tubos Eppendorf a 13000 g durante 8 minutos. En el sobrenadante se determinó la concentración de etanol, ácido acético, xilosa y xilitol y el Eppendorf se secó en estufa a 105°C hasta peso constante para determinar concentración de biomasa.

### 3.4 Ensayos de fermentación

Se determinaron los parámetros de fermentación utilizando dos medios de cultivo distintos, uno semi-sintético y uno producido a partir de un hidrolizado de chips de madera de eucalipto.

Para estos ensayos se seleccionaron las cepas con mejor actividad xilanasa y mayor crecimiento en medio YPX. En ambos ensayos de fermentación se tomó como microorganismo de referencia a la levadura *Scheffersomyces stipitis* NBRC 10063 para la producción de etanol.

#### 3.4.1 Desarrollo de inóculo

Para la preparación del inóculo se sembraron dos placas de Petri con medio YPX y se incubaron a 24°C durante 48 horas, con cada una de las cepas seleccionadas. Una vez que se realizó la tinción de Gram para corroborar que en las placas las levaduras estuvieran puras, y que no hubiera ninguna contaminación, toda la biomasa de estas placas se pasó a matraces Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 200 mL de medio YPX líquido. Para esto se agregaron 10 mL de agua estéril a las placas para suspender el contenido de éstas y luego la suspensión se vertió en los matraces. Estos matraces se

incubaron en un agitador orbital a 30°C y 150 rpm durante 48 horas. Este cultivo se utilizó para inocular los matraces de fermentación. Se centrifugó el volumen de este cultivo necesario para obtener una concentración de  $1 \times 10^8$  células/mL en los matraces de fermentación, a 4000 rpm y 4°C durante 10 minutos, en tubos de 50 mL. Se descartó el sobrenadante y el pellet se re-suspendió en 10 mL de agua destilada estéril. Se centrifugó en las mismas condiciones, y se realizó un segundo lavado re-suspendiendo el pellet con 10 mL de agua destilada estéril. Finalmente, se descartó el agua de lavado y se inocularon los matraces de fermentación re-suspendiendo la biomasa con el propio medio de fermentación.

### **3.4.2 Fermentación de medio semi-sintético**

La fermentación del medio semi-sintético se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio compuesto por: xilosa 50 g/L, extracto de malta 3 g/L, extracto de levadura 3 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,2 g/L y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,4 g/L. Se ajustó el pH en 6. Los matraces se taparon con tapones de polifón y el medio se autoclavó a 121°C durante 15 minutos. Se inocularon y se incubaron en un agitador orbital a 30°C y 100 rpm. A distintos tiempos se retiraron 5 mL de muestra para la determinación de biomasa por recuento en cámara de Neubauer y de etanol, xilitol, ácidos orgánicos y azúcares mediante HPLC.

### **3.4.3 Fermentación del medio hidrolizado**

#### ***Preparación del medio de hidrolizado***

Para la preparación del medio de hidrolizado se utilizaron chips de madera de eucalipto los cuales fueron provistos por la empresa UPM, Fray Bentos, Uruguay. El pretratamiento utilizado en la preparación del hidrolizado de chips de eucalipto fue autohidrólisis. Se usó una relación sólido:líquido de 1:6, que en este caso correspondió a 45 gramos de aserrín en 245 mL de agua. Los sólidos fueron tratados en un reactor con 6 cápsulas de 300 mL que rotaban en un baño de aceite a 160°C durante 2,5 horas. El material pretratado se centrifugó

en bolsas de tela, durante 10 min, para separar el líquido, que se utilizó como medio de cultivo.

Para llegar a la concentración deseada de xilosa en el medio, el hidrolizado se concentró usando un rotavapor a vacío (Buchi). Para la preparación final del medio, el hidrolizado se detoxificó llevándolo a pH 10 con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y se centrifugó a 3600 rpm durante 10 minutos. Se ajustó el pH a 6 con NaOH, y se suplementó con 3 g/L de extracto de levadura, 3 g/L de extracto de malta,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,2 g/L y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,4 g/L. El medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

### ***Fermentación del medio hidrolizado***

La fermentación del medio hidrolizado se llevó a cabo en un agitador orbital en matraces de 250 mL tapados con tapones de polifón, conteniendo 100 mL del medio hidrolizado, a 30 °C y 100 rpm. En cada toma se sacaron 5 mL de muestra para la determinación de etanol, xilitol, ácidos orgánicos, furfural e hidroximetilfurfural (HMF) y azúcares mediante HPLC y se siguió la fermentación por recuento en cámara de Neubauer.

### **3.5 Métodos analíticos**

La determinación de la concentración de azúcares (xilosa, glucosa, celobiosa), etanol, xilitol, ácidos orgánicos (ácido acético y fórmico), furfural e hidroximetilfurfural (HMF) se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) utilizando un equipo Shimadzu CLASS-VP 5.04 (Kyoto, Japan) con un detector RI (Índice de refracción). Se utilizaron las siguientes columnas: (i) Aminex HPX-87H a 45°C para determinar glucosa, arabinosa, etanol, xilitol, ácido acético, glicerol, ácido fórmico HMF y furfural, y (ii) Shodex Sugar SP0810 a 80°C para determinar xilosa, galactosa, manosa y celobiosa, eluidos con ácido sulfúrico 0.005 M con un flujo de 0,3-0,6 mL/min y agua desionizada con un flujo de 0,6 mL/min, respectivamente.

Se hizo seguimiento de células viables y totales mediante la técnica de recuento en cámara de Neubauer utilizando una tinción selectiva con azul de Metileno y observación al microscopio óptico 1000x.

### 3.6 Cálculos

$Y_{P/S}$ : Rendimiento de producto expresado en gramos de producto producido/gramos de xilosa consumida (sustrato).

$$Y_{P/S} \text{ (g}_{\text{producto}} / \text{g}_{\text{sustrato}}) = (P_f - P_0) / (S_0 - S_f)$$

donde  $P_0$  y  $S_0$  son las concentraciones de producto y de xilosa iniciales, y  $P_f$  y  $S_f$  son las concentraciones de producto y xilosa finales, respectivamente.

**Eficiencia de fermentación:** gramos de producto producido por gramos de producto que se debieron producir teóricamente según el consumo de azúcares.

$$\text{Eficiencia} = (Y_{P/S} / Y_P) \times 100$$

$Y_P$  es 0,511 g<sub>etanol</sub>/g<sub>xilosa</sub> para etanol y 0,917 g<sub>xilitol</sub>/g<sub>xilosa</sub> para xilitol.

**Productividad ( $Q_P$ ):** concentración de producto producido (g/L) por hora.

$$Q_P \text{ (g/Lh)} = (P_f - P_0) / (\text{tiempo final de fermentación (h)}).$$

**Conversión de sustrato ( $x_S$ ):** cantidad de sustrato convertido en producto.

$$x_S = (S_0 - S_f) / S_0$$

### 3.7 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza ANOVA de los datos experimentales para comprobar si las diferencias encontradas entre ellos eran estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ) utilizando el programa InfoStat/Estudiantil versión 2018 (Di Rienzo et al., 2010).

---

## 4- Resultados y discusión

---

## 4.1 Actividad xilanasa

Se realizó el ensayo de actividad xilanasa a las 14 cepas de levaduras detalladas en la Tabla 1, en un medio de cultivo con xilano como principal fuente de carbono a 15, 20 y 24°C. Se ensayaron estas temperaturas ya que algunas de las cepas eran de origen antártico y la mayoría de las levaduras crecían mejor a 24°C (estudios previos del Departamento de Bioingeniería).

La única cepa que presentó halos de actividad xilanasa fue la cepa *Trichosporom pullulans* 80-2 (como se muestra en la Figura 7), en todas las temperaturas ensayadas. Stevens et al. (1977) también observaron actividad xilanasa en una cepa de *Trichosporom pullulans*. Por otro lado, se ha reportado que *Trichosporom pullulans* ha presentado actividad celulasa, lignolítica, y la secreción de enzimas peroxidasas,  $\alpha$ -amilasas y glucoamilasas (Stevens et al., 1977; Mot et al., 1986; Sláviková et al., 2002). Las otras cepas generaron halos menores a 1 mm en todas las placas cultivadas.

En cuanto a los resultados de las otras cepas en comparación con datos bibliográficos, se encuentran varios reportes de actividad xilanasa de la levadura *Scheffersomyces stipitis*. Sin embargo, para la cepa utilizada en este trabajo (NBRC 10063) se ha reportado baja actividad, teniendo la mayor actividad a 30°C, temperatura no ensayada en este trabajo (Lee et al., 1986; Özcan, et al., 1991).



**Figura 7.** Placa de actividad xilanasa de la cepa, *Trichosporom pullulans* 80-2 a 24°C.

#### **4.2 Curva de crecimiento en medio semi-sintético con xilosa**

Se estudió el crecimiento de las cepas detalladas en la Tabla 1 en un medio YPX que tiene xilosa como principal fuente de carbono. La concentración inicial de xilosa fue 23 g/L. La Tabla 2 muestra los valores obtenidos de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ), concentración de biomasa, conversión de xilosa ( $x_s$ ) y concentración final de etanol obtenidos para las distintas cepas estudiadas.

**Tabla 2.** Parámetros obtenidos en medio YPX.

Cepa	Levadura	Biomasa (g/L) *	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	Etanol (g/L)	x <sub>s</sub> (%)
3.1	<i>Desconocida</i>	3,1 ± 0,5	0,08 ± 0,05	0,5 ± 0,5	47 ± 20
F	<i>Desconocida</i>	6,5 ± 0,4	0,11 ± 0,04	0,2 ± 0,1	48 ± 20
L-6	<i>Sporobolomyces pararoseus</i>	5,3 ± 1,8	0,10 ± 0,04	1,2 ± 0,4	46 ± 13
80-2	<i>Trichosporon pullulans</i>	5,5 ± 1,5	0,07 ± 0,01	1,4 ± 0,1	31 ± 10
T-14	<i>Cryptococcus magnus</i>	6,1 ± 2,1	0,06 ± 0,01	1,0 ± 0,1	53 ± 2
L-979	<i>Cryptococcus laurentii</i>	6,9 ± 0,5	0,06 ± 0,01	0,9 ± 0,3	72 ± 1
L-104	<i>Cryptococcus laurentii</i>	5,7 ± 0,5	0,04 ± 0,01	1,0 ± 0,6	56 ± 5
L-168	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	5,4 ± 1,4	0,04 ± 0,01	0,9 ± 0,5	42 ± 1
L-237	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	5,1 ± 2,8	0,08 ± 0,04	0,5 ± 0,5	57 ± 19
L-279	<i>Cryptococcus podzolicus</i>	5,2 ± 0,8	0,11 ± 0,01	1,3 ± 0,1	47 ± 6
L-510	<i>Candida fermentati</i>	6,5 ± 1,8	0,12 ± 0,02	0,7 ± 0,7	76 ± 9
L-980	<i>Candida fermentati</i>	9,4 ± 1,5	0,14 ± 0,03	1,0 ± 0,8	83 ± 18
L-784	<i>Candida guilliermondii</i>	6,2 ± 1,3	0,13 ± 0,02	2,1 ± 0,1	55 ± 1
NBRC 10063	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	4,3 ± 2,0	0,12 ± 0,01	1,7 ± 0,1	56 ± 3

\* Biomasa expresada como peso seco, calculada a tiempo final. Los tiempos finales variaron entre 60 y 68 horas.

En el análisis de ANAVA se encontraron diferencias significativas entre las cepas estudiadas respecto a la velocidad específica de crecimiento considerando un  $p < 0.05$  (Anexo 4).

Los resultados de velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) variaron entre 0.04 y 0,14 h<sup>-1</sup>. Las cepas de *Candida fermentati* (L-510 y L-980) y *Candida guilliermondii* (L-784) alcanzaron valores iguales o superiores a los de la cepa

de referencia, *Scheffersomyces stipitis* NBRC 10063, que tuvo un  $\mu_{\max}$  de  $0,12 \text{ h}^{-1}$ .

En cuanto a la conversión de xilosa del medio, los valores obtenidos estuvieron entre un 31 y 83% de la xilosa inicial donde se encontraron diferencias significativas al realizar el test de ANAVA considerando un  $p < 0,05$ . Las cepas de *Candida fermentati* (L-510 y L-980) y *Cryptococcus laurentii* L-979 presentaron los mayores valores, siendo superiores a los de la cepa de referencia.

No se observó una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en el valor de biomasa para las distintas cepas estudiadas, con valores en el rango  $3,1 - 9,4 \text{ g/L}$ . El mayor valor se obtuvo para *Candida fermentati* L-980.

Con respecto a la producción de etanol si se encontraron diferencias significativas ya que se obtuvo un  $p$ -valor de  $0,019$  en el estudio de ANAVA y excepto *Candida guilliermondii* L-784 que fue la que obtuvo la mayor concentración y las cepas 3.1 y F que obtuvieron concentraciones muy bajas, todas las cepas tuvieron un comportamiento similar y produjeron una concentración de etanol cercana a  $1 \text{ g/L}$ , similar a la de la cepa de referencia. Se debe tener en cuenta que los ensayos no se llevaron a cabo en las condiciones óptimas para la producción de etanol.

Analizando los resultados obtenidos se seleccionó las cepas *Sporobolomyces pararoseus* L-6, *Trichosporon pullulans* 80-2, *Candida guilliermondii* L-784, de las *Candida fermentati* se seleccionó la cepa L-980, y de las *Cryptococcus podzolicus* se seleccionó la cepa L-279. La Figura 8 muestra las curvas de crecimiento de cada una de las cepas seleccionadas. Se puede observar que las cepas de *Candida fermentati* L-980 y de *Candida guilliermondii* L-784 llegaron a la fase estacionaria de crecimiento en tiempos similares al de la cepa de referencia *S. stipitis* NBRC 10063 (a las 40-44 h y 40 h, respectivamente).

Se seleccionó la cepa de *Candida fermentati* L-980, ya que presentó la más alta velocidad de crecimiento ( $\mu_{\max} = 0,14 \text{ h}^{-1}$ ), además de haber tenido la mayor conversión de xilosa ( $x_s = 83\%$ ).

La segunda cepa elegida fue la levadura *Candida guilliermondii* L-784 que también presentó un valor de velocidad específica de crecimiento alto ( $\mu_{\max} = 0,13 \text{ h}^{-1}$ ) y obtuvo la concentración final de etanol más elevada (2,1 g/L).

La levadura *Cryptococcus podzolicus* L-279 se seleccionó por tener una de las velocidades de crecimiento altas ( $\mu_{\max} = 0,11 \text{ h}^{-1}$ ) y una producción de etanol de 1,3 g/L y su conversión de xilosa fue de 47%.

Otra de las cepas seleccionadas fue *Sporobolomyces pararoseus* L-6, la cual produjo una concentración de etanol de 1.2 g/L y una velocidad de crecimiento de  $0,10 \text{ h}^{-1}$ , a pesar de que su consumo de xilosa no fue de los más altos.

Por último, se seleccionó la cepa *Trichosporon pullulans* 80-2, que si bien presentó un bajo valor de  $\mu_{\max}$  y de consumo de xilosa, produjo una alta concentración de etanol (1,4 g/L) y fue la única cepa que presentó actividad xilanasa.

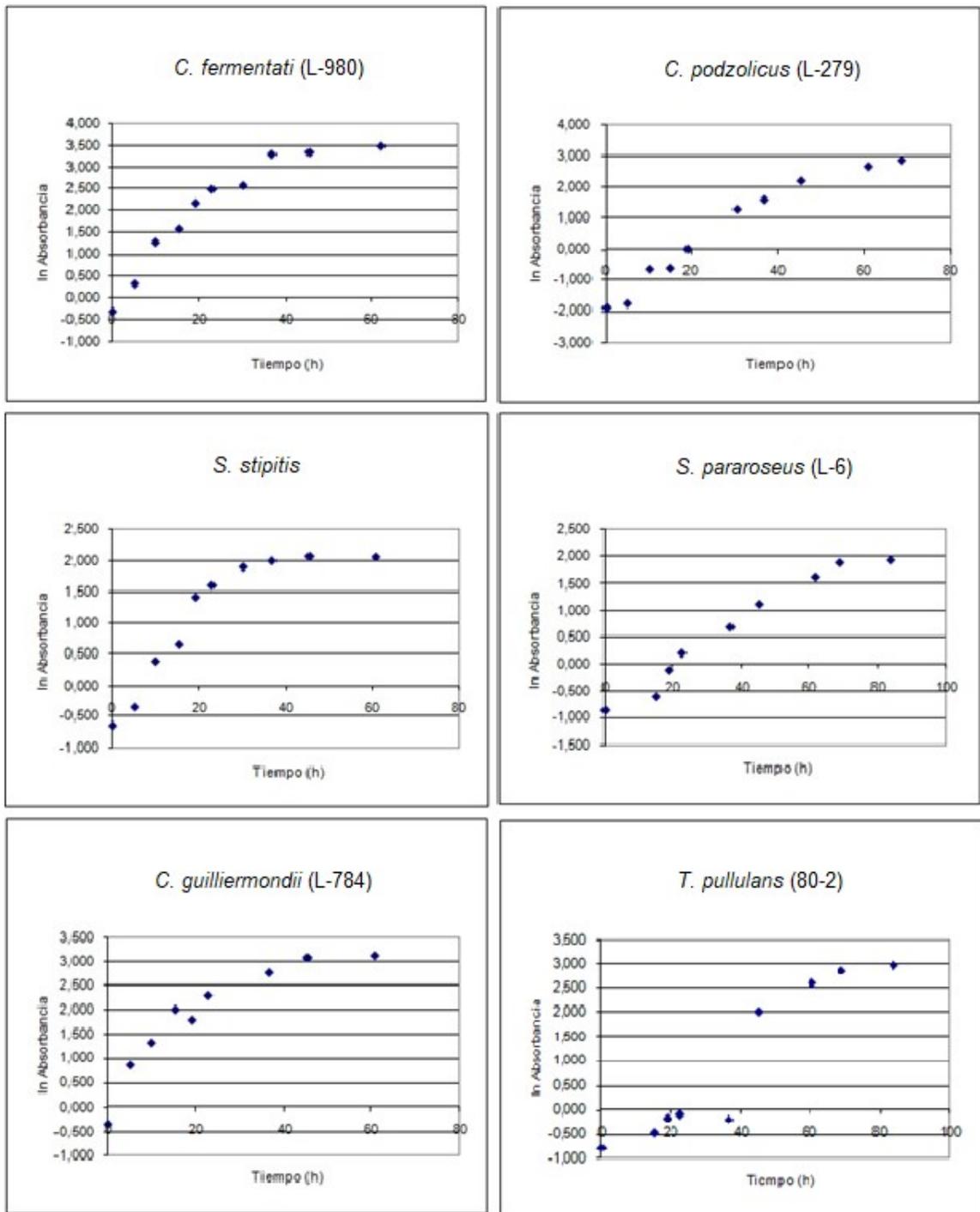


Figura 8. Curva de crecimiento de las cepas seleccionadas para continuar con los ensayos de fermentación.

## 4.3 Ensayos de fermentación

### 4.3.1 Fermentación de medio semi-sintético

Se evaluó la fermentación de las 5 cepas seleccionadas, *Sporobolomyces pararoseus* L-6, *Trichosporon pullulans* 80-2, *Candida guilliermondii* L-784, *Candida fermentati* L-980 y *Cryptococcus podzolicus* L-279, y de la cepa de referencia *S. stipitis* NBRC 10063, en un medio semi-sintético con xilosa como principal fuente de carbono. Las cepas *Sporobolomyces pararoseus* L-6, *Trichosporon pullulans* 80-2 y *S. stipitis* NBRC 10063 produjeron etanol y las cepas *Candida guilliermondii* L-784, *Candida fermentati* L-980 y *Cryptococcus podzolicus* L-279 produjeron xilitol, como se aprecia en las Tabla 3 y en las Figuras 9 y 10.

El seguimiento de la biomasa durante la fermentación se puede ver en la Figura 13 del Anexo 2.

**Tabla 3.** Parámetros de fermentación obtenidos en el medio semi-sintético con 50 g/L de xilosa iniciales.

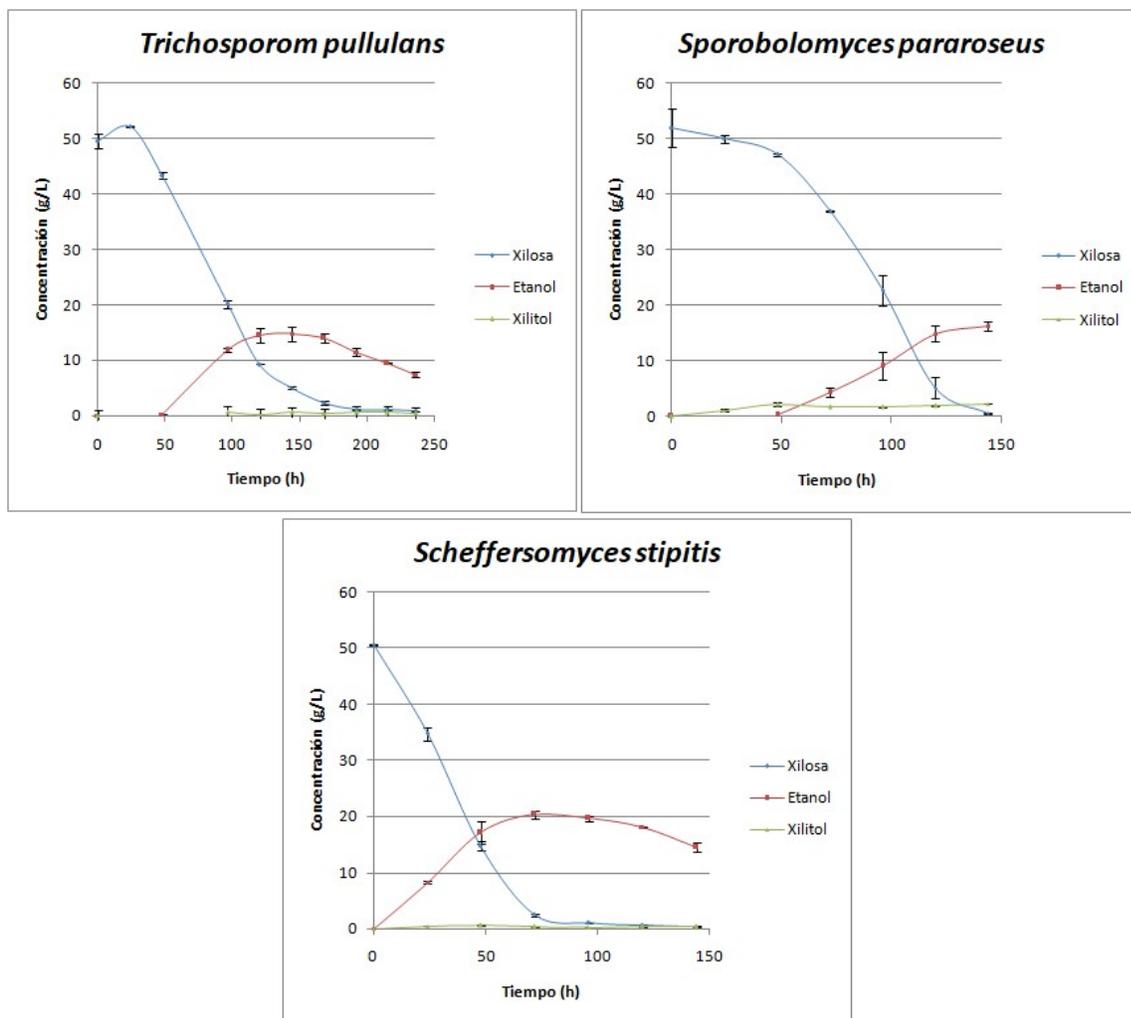
Levadura	Y <sub>P/S</sub> etanol (g etanol/g xilosa)	Eficiencia de etanol (%)	Q <sub>P</sub> (g etanol /Lh)	Etanol * (g/L)	Y <sub>P/S</sub> xilitol (g xilitol/g xilosa)	Eficiencia de xilitol (%)	Q <sub>P</sub> (g xilitol /Lh)	Xilitol * (g/L)	Conversión de xilosa (%)	Tiempo final (h)
<i>Sporobolomyces pararoseus</i> L-6	0,32 ± 0,04	63 ± 7	0,11 ± 0,01	16 ± 1	0,046 ± 0,001	8,9 ± 0,3	0,016 ± 0,001	2,3 ± 0,1	99 ± 1	144
<i>Trichosporon pullulans</i> 80-2	0,31 ± 0,02	61 ± 5	0,11 ± 0,01	15 ± 1	0,012 ± 0,001	2,3±0,1	0,004 ± 0,001	0,6 ± 0,1	91 ± 1	132
<i>Candida fermentati</i> L-980	0,057 ± 0,014	6,2 ± 1,5	0,016 ± 0,005	2,8 ± 0,6	0,53 ± 0,03	58 ± 3	0,15 ± 0,02	26 ± 1	98 ± 1	181
<i>Candida guilliermondii</i> L-784	0,039 ± 0,003	4,2 ± 0,3	0,010 ± 0,001	1,8 ± 0,1	0,52 ± 0,08	56 ± 9	0,13 ± 0,02	23 ± 2	89 ± 4	180
<i>Cryptococcus podzolicus</i> L-279	0,032 ± 0,008	3,5 ± 0,9	0,007 ± 0,001	1,5±0,2	0,43 ± 0,04	46 ± 4	0,09 ± 0,01	20 ± 1	92 ± 8	239
<i>S. stipitis</i> NBRC 10063	0,42 ± 0,02	82 ± 4	0,25 ± 0,06	20 ± 1	0,005 ± 0,01	1,1 ± 0,1	0,003 ± 0,001	0,3 ± 0,1	96 ± 2	84

\* Calculado a tiempo final.

Con respecto a la producción de etanol, las levaduras *Trichosporom pullulans* 80-2, *Sporobolomyces pararoseus* L-6 y *Scheffersomyces stipitis* NBRC 10063 fueron las que produjeron mayores concentraciones de etanol en las condiciones estudiadas. No se observó una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en los valores de  $Y_{P/S}$  y eficiencia. *Trichosporom pullulans* 80-2 y *Sporobolomyces pararoseus* L-6 alcanzaron concentraciones finales de etanol de 15 y 16 g/L, eficiencia del 61 y 63% del valor teórico ( $Y_{P/S}$  de 0,31 y 0,32 g etanol/g xilosa) y un consumo del 91 y 99% de xilosa en 144 y 132 horas de fermentación respectivamente. Estos resultados estuvieron por debajo de los alcanzados por la levadura de referencia *Scheffersomyces stipitis* NBRC 10063 (20 g/L finales de etanol y consumo de la xilosa de 96% en 84 h). La productividad alcanzada fue mayor con *S. stipitis* NBRC 10063 ya que se produjo más etanol en menos tiempo. Los parámetros de fermentación obtenidos para *S. stipitis* NBRC 10063 concuerdan con los de datos obtenidos por du Perez et al. (1986), quienes observaron que la mayor eficiencia de etanol se obtuvo a una concentración de xilosa inicial de 50 g/L con un  $Y_{P/S}$  de 0,43 g etanol/g xilosa.

No se encontraron datos bibliográficos de producción de etanol a partir de la fermentación de xilosa para cepas de *Trichosporom pullulans* y *Sporobolomyces pararoseus*.

En la Figura 9 se muestran los perfiles de consumo de azúcares y producción de etanol y xilitol para las cepas *S. stipitis* NBRC 10063, *T. pullulans* 80-2 y *S. pararoseus* L-6.



**Figura 9.** Perfiles de concentración de xilosa, xilitol y etanol durante la fermentación del medio semi-sintético de las cepas productoras de etanol.

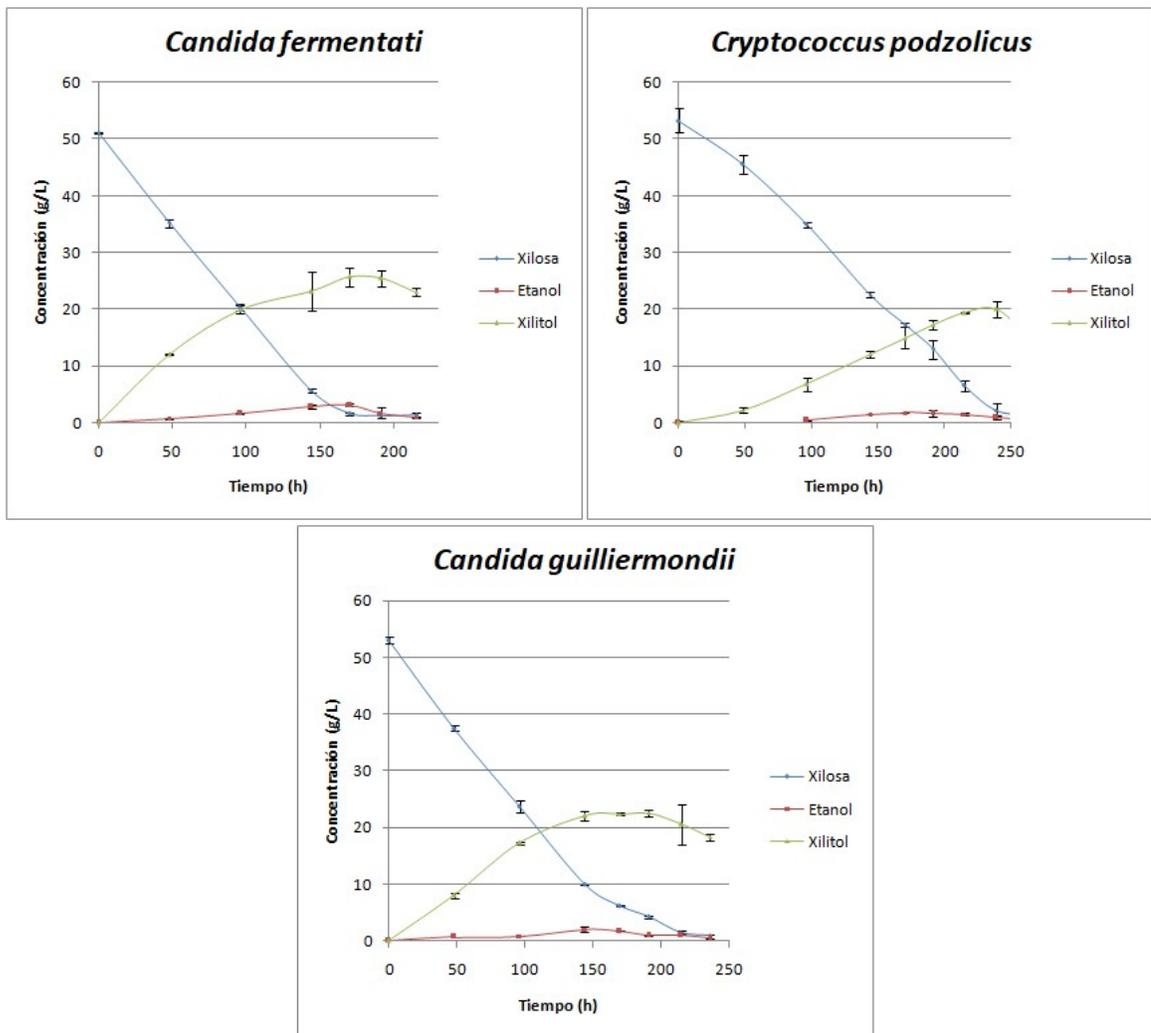
Por otro lado, las otras cepas seleccionadas, *Candida fermentati* L-980, *Candida guilliermondii* L-784 y *Cryptococcus podzolicus* L-279, produjeron mayoritariamente xilitol, cuyos parámetros de fermentación se encuentran en la Tabla 3.

Las cepas presentaron valores similares en algunos parámetros de fermentación, donde no se encontraron diferencias significativas al hacer un estudio estadístico de ANAVA considerando un  $p < 0.05$ , con rendimientos que variaron entre 0,43 y 0,53 g xilitol/g xilosa, eficiencias de fermentación de 46 y

58%, productividades entre 0,09 y 0,15 g xilitol /Lh y consumo de xilosa entre 89 y 98%

En las concentraciones finales de xilitol fue donde se encontraron diferencias significativas al realizar un ANAVA considerando un  $p < 0.05$ , donde la cepa *Candida fermentati* L-980 fue la que obtuvo la mayor concentración final (26 g/L) en 181 horas seguido por *Candida guilliermondii* L-784 que produjo 23 g/L en 180 horas y *Cryptococcus podzolicus* L-279 que fue la que mostró menor producción con 20 g/L en mayor tiempo de fermentación (236 horas)

Estos resultados concuerdan con los datos reportados en bibliografía donde se informa que dentro del género *Candida* están las especies más eficientes en la producción natural de xilitol en especial *Candida guilliermondii* (Prakasham et al., 2009). También se reportaron valores de  $Y_{P/S}$  de 0,82 g xilitol/g xilosa con una eficiencia del 89.8% (Felipe et al, 1995) para dicha levadura con una concentración inicial de xilosa de 60 g/L. En cuanto a *Cryptococcus podzolicus*, no hay reportes para la producción de xilitol a partir de xilosa por lo que no se sabe si las condiciones ensayadas son las más propicias para este microorganismo.



**Figura 10.** Perfil de concentración de xilosa, xilitol y etanol durante la fermentación del medio semi-sintético de las cepas productoras de xilitol.

A partir de estos resultados, se seleccionaron las cepas *Trichosporom pullulans* 80-2 y *Candida fermentati* L-980 para realizar los ensayos de fermentación de un medio hidrolizado de eucalipto. Las cepas *Trichosporom pullulans* 80-2 y *Sporobolomyces pararoseus* L-6 presentaron resultados muy similares en la fermentación. Se seleccionó la primera porque además presentó actividad xilanasas lo que podría ser beneficioso a la hora de fermentar un medio obtenido a partir de un hidrolizado de una materia prima lignocelulósica.

### 4.3.2 Fermentación de hidrolizado de eucalipto

Se evaluó la fermentación de un medio compuesto por un hidrolizado de eucalipto con una concentración inicial de xilosa de 30 g/L con las cepas *Trichosporom pullulans* 80-2 y *Candida fermentati* L-980, y la cepa de referencia *Scheffersomyces stipitis* NBRC 10063. Se observó que las cepas analizadas produjeron tanto etanol como xilitol en las condiciones ensayadas. La Tabla 4 presenta los valores de los parámetros de fermentación obtenidos. Los perfiles de fermentación se muestran en la Figura 11.

Para todos los parámetros de esta fermentación excepto para la concentración final de etanol no se encontraron diferencias significativas al realizar un estudio estadístico de ANAVA considerando un  $p < 0,05$ . Con respecto a la producción de etanol se encontró una diferencia significativa siendo *Trichosporom pullulans* 80-2 la que obtuvo la mayor producción (6 g/L)

En las condiciones ensayadas, la cepa *Scheffersomyces stipitis* NBRC 10063 presentó un rendimiento de etanol y concentración final de etanol similares a los de la cepa *Candida fermentati* L-980, pero el tiempo de fermentación fue mayor (144 horas y 120 horas respectivamente) y el consumo de xilosa fue menor (70 y 81% respectivamente).

**Tabla 4.** Parámetros de fermentación obtenidos en el medio con hidrolizado de eucalipto con una concentración inicial de xilosa de 30 g/L.

Levadura	Y <sub>P/S</sub> etanol (g etanol/g xilosa)	Eficiencia de etanol (%)	Q <sub>P</sub> (g etanol /Lh)	Etanol (g/L) *	Y <sub>P/S</sub> xilitol (g xilitol/g xilosa)	Eficiencia de xilitol (%)	Q <sub>P</sub> (g xilitol /Lh)	Xilitol (g/L) *	Conversión de xilosa (%)	Tiempo final (h)
<i>S. stipitis</i> NBRC 10063	0,23 ± 0,03	44 ± 5	0,04 ± 0,01	5,2 ± 0,1	0,28 ± 0,08	31 ± 9	0,04 ± 0,01	6 ± 1	70 ± 1	144
<i>Trichosporon pullulans</i> 80-2	0,24 ± 0,01	48 ± 2	0,05 ± 0,01	6,2 ± 0,2	0,21 ± 0,04	23 ± 4	0,04 ± 0,01	5 ± 1	81 ± 1	120
<i>Candida fermentati</i> L-980	0,22 ± 0,05	44 ± 9	0,05 ± 0,01	5,3 ± 0,3	0,20 ± 0,02	24 ± 1	0,04 ± 0,01	5 ± 1	81 ± 6	120
<i>Candida fermentati</i> L-980 **	0,21 ± 0,03	41 ± 5	0,04 ± 0,01	4,2 ± 0,2	0,22 ± 0,05	24 ± 5	0,04 ± 0,01	5,0 ± 0,3	80 ± 8	96

\* Calculado a tiempo final.

\*\* Resultados de ensayos en matraces de 500 mL.

La cepa *Candida fermentati* L-980 se fermentó en dos condiciones diferentes, con el fin de evaluar el efecto de la aireación sobre la fermentación. Se aumentó el volumen del matraz, manteniendo fijo el volumen de medio. De esta forma se aumenta la velocidad de intercambio de oxígeno. Se ha reportado que la aireación es importante en algunas cepas de *Candida* para obtener buenas velocidades de producción y rendimientos de etanol (Jeffries, 1985). Sin embargo, al fermentar esta cepa en condiciones de mayor aireación, el valor de los parámetros de fermentación de xilitol fue menor, con una concentración de etanol final de 4,2 g/L de etanol y una eficiencia del 41%. El consumo de xilosa fue similar en las dos condiciones (Tabla 4).

Al comparar estos datos con los obtenidos por las cepas productoras de etanol al fermentar el medio sintético, se observó que los resultados obtenidos fueron inferiores con el hidrolizado de eucalipto. Por otro lado, el microorganismo de referencia (*S. stipitis* NBRC 10063) empleado no fue el que obtuvo mejores parámetros de fermentación ya que solo el 70% de la xilosa fue convertida. Las demás cepas presentaron una conversión de xilosa del 81%.

Los resultados obtenidos con el hidrolizado de eucalipto en este trabajo fueron menores que los reportados por Ferrari et al. (1992), quienes encontraron 12 g/L de etanol con un rendimiento de 0,35 g etanol/g xilosa al fermentar un hidrolizado de *Eucalyptus globulus* con la levadura *Scheffersomyces stipitis* en condiciones similares a las empleadas en este trabajo (32°C, 150 rpm, concentración inicial de xilosa de 30 g/L). Sin embargo, el hidrolizado de eucalipto se obtuvo en distintas condiciones experimentales, y por lo tanto, la cantidad de compuestos inhibidores de la fermentación pudo ser diferente al del hidrolizado usado en este trabajo.

En la Tabla 4 se presentan los parámetros de fermentación de la producción de xilitol de las cepas seleccionadas *Trichosporom pullulans* 80-2 y *Candida fermentati* L-980, y de la cepa de referencia *Scheffersomyces stipitis* NBRC 10063. Las cepas, en la producción de xilitol también se vieron inhibidas por el medio hidrolizado de eucalipto ya que en la fermentación del medio semi-sintético se consiguieron valores superiores de concentración de xilitol final.

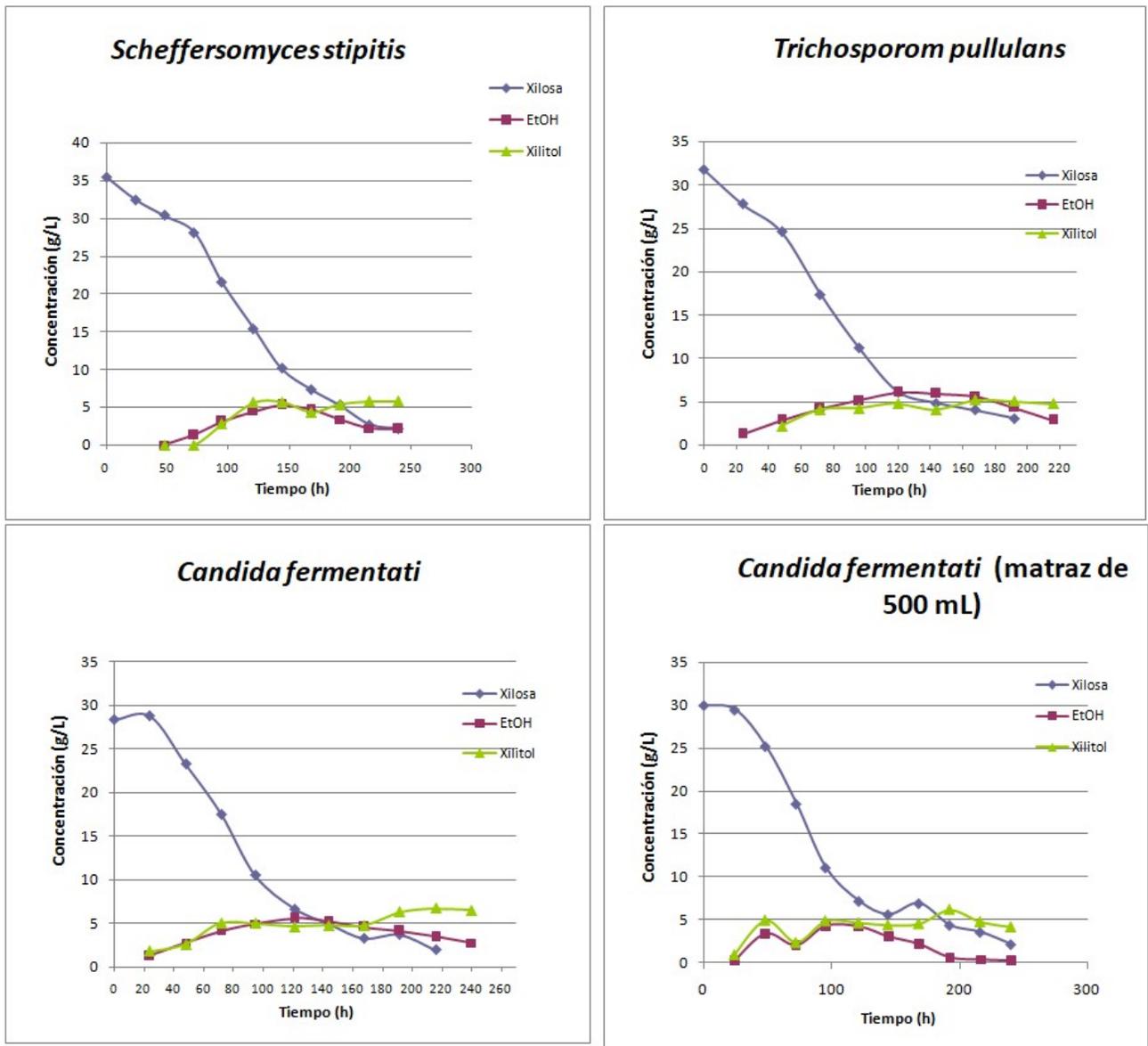
*Candida fermentati* L-980 produjo 5 g/L de xilitol con el hidrolizado y 26 g/L en el medio semi-sintético.

La cepa *Scheffersomyces stipitis* NBRC 10063 produjo 6 g/L de xilitol con un rendimiento de 0,28 g xilitol/g xilosa y una eficiencia de 31%, y tuvo un menor consumo de xilosa que las otras cepas estudiadas.

Se ha reportado que algunas cepas de *Candida* producen xilitol en condiciones microaerófilas (Tamburini et al., 2015). El aumento en la aireación de la cepa *Candida fermentati* L-980 no mejoró los resultados de producción de xilitol como puede verse en la Tabla 4. En las dos condiciones de aireación ensayadas tuvo resultados muy similares, con un rendimiento de 0,22 g xilitol/g xilosa y una concentración final de xilitol de 5,3 g/L y 5,0 g/L en la fermentación de matraces de 250 y 500 mL, respectivamente y una productividad del 24% en ambos casos.

La levadura *Trichosporon pullulans* 80-2 también tuvo resultados similares a los de la *Candida fermentati* L-980, con un rendimiento de 0,21 g xilitol/g xilosa para producir 5 g/L finales de xilitol con una eficiencia del 23% y consumiendo un 80,7% de la xilosa.

A pesar de que el hidrolizado fue detoxificado con hidróxido de calcio, se encontró la presencia de ácido acético y fórmico en altas concentraciones (8 y 7 g/L respectivamente) en el medio fermentado. A estos componentes pueden atribuirse los bajos rendimientos obtenidos. A pesar de que el ácido acético puede mejorar los parámetros de fermentación a una concentración de 1 g/L (Felipe et al., 1995) estos ácidos orgánicos están reportados como inhibidores de la fermentación de la xilosa cuando se encuentran en concentraciones mayores. La inhibición se ve reflejada en una disminución del consumo de xilosa y de la producción de etanol y xilitol, ambos efectos observados en la fermentación del medio hidrolizado. Los reportes también indican que la susceptibilidad a estos inhibidores varía en las distintas levaduras aunque a altas concentraciones siempre produce los efectos mencionados (Zhang et al., 2012; Hasunuma et al., 2011; Delgenes et al., 1996; Felipe et al., 1995).



**Figura 11.** Perfil de concentración de xilosa, xilitol y etanol durante la fermentación del medio hidrolizado de eucalipto.

---

## **5- Conclusiones**

---

De las 13 cepas estudiadas, la única que demostró tener la capacidad de degradar el xilano fue *Trichosporon pullulans* 80-2

Se seleccionaron cinco cepas que crecieron en medio con xilosa como principal fuente de carbono: *Sporobolomyces pararoseus* L-6, *Trichosporon pullulans* 80-2, *Candida guilliermondii* L-784, *Candida fermentati* L-980 y *Cryptococcus podzolicus* L-279.

En la fermentación del medio semi-sintético con xilosa, 3 levaduras produjeron xilitol (*C. fermentati* L-980, *C. guilliermondii* L-784, *C. podzolicus* L-279) y dos de ellas etanol (*S. pararoseus* L-6, *T. pullulans* 80-2). La más eficiente en las productoras de etanol fue la cepa *Sporobolomyces pararoseus* L-6 que produjo 16 g/L de etanol y un consumo del 98% de la xilosa. La cepa más eficiente produciendo xilitol fue *Candida fermentati* L-980 que produjo 26 g/L con un consumo del 98% de la xilosa en un medio semi-sintético con xilosa como fuente de carbono.

Las cepas *Trichosporon pullulans* 80-2 y *Candida fermentati* L-980, así como también la cepa *S. stipitis* NBRC 10063 fueron capaces de crecer y fermentar el hidrolizado hemicelulósico de eucalipto, y producir tanto etanol como xilitol en las condiciones ensayadas. No se encontraron diferencias significativas en los parámetros de fermentación excepto en la concentración de etanol.

Las cepas *Trichosporon pullulans* 80-2 y *Candida fermentati* L-980 resultaron prometedoras para fermentar los hidrolizados hemicelulósicos y producir etanol y/o xilitol, debiéndose optimizar las condiciones experimentales para maximizar los rendimientos de fermentación de uno de estos productos. Además, la cepa *Trichosporon pullulans* 80-2 tiene la capacidad de degradar xilanos, y por lo tanto, presenta potencial para su uso en el proceso de hidrólisis de la hemicelulosa.

---

## 6- Referencias

---

Agbogbo, F.K.; Coward-Kelly, G. (2008) Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipites*. *Biotechnology Letters*, 30,1515–1524

Albuquerque, T.L.D.; da Silva, I.J.; de Macedo; G.R.; Rocha, M.V.P. (2014). Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: a review. *Process Biochemistry*, 49 (11), 1779-1789.

Brodeur, G., Yau, E., Badal, K., Collier, J., Ramachandran, K. B., & Ramakrishnan, S. (2011). Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme Research*, 2011, doi:10.4061/2011/787532

Carriquiry, M.A.; Du, X.; Timilsina, G.R. (2011). Second generation biofuels: Economics and policies. *Energy Policy*, 39 (7), 4222-4234.

Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, 51 (7), 1412-1421.

Collins, T.; Gerday, C.; Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29 (1), 3-23.

Delgenes, J. P.; Moletta, R.; Navarro, J. M. (1996). Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(3), 220-225.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Dien, B.S.; Cotta, M.A.; Jeffries, T.W. (2003). Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63 (3), 258-266.

du Preez, J.C.; Bosch, M.; Prior, B. A. (1986). Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: Effects of pH, temperature and substrate concentration. *Enzyme and Microbial Technology*, 8(6), 360-364.

Felipe, M.G.; Vieira, D.C.; Vitolo, M.; Silva, S.S.; Roberto, I.C.; Manchilha, I.M. (1995). Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. *Journal of Basic Microbiology*, 35(3), 171-177.

Ferrari, M.D.; Neirotti, E.; Albornoz, C.; Saucedo, E. (1992). Ethanol production from eucalyptus wood hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 40(7), 753-759.

Galbe, M.; Zacchi, G. (2012). Pretreatment: the key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy*, 46, 70-78.

Ghindea, R.; Csutak, O.; Stoica, I.; Tanase, A.M.; Vassu, T. (2010). Production of xylitol by yeasts. *Romanian Biotechnological Letters*, 15 (3), 5217-5222.

Granström, T.B.; Izumori, K.; Leisola, M. (2007). A rare sugar xylitol. Part I: the biochemistry and biosynthesis of xylitol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74 (2), 277-281.

Guigou, M.D.; Cebreiros, F.; Cabrera, M.N.; Ferrari M.D.; Lareo, C. (2017) Bioethanol production from *Eucalyptus grandis* hemicellulose recovered before kraft pulping using an integrated biorefinery concept. *Biomass Conversion Biorefinery*, 7, 191–19.

Hamelinck, C.N.; Van Hooijdonk, G.; Faaij, A.P. (2005). Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term. *Biomass and Bioenergy*, 28 (4), 384-410.

Harmsen, P.F.H.; Huijgen, W.; Bermudez, L.; Bakker, R. (2010). *Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass* (No. 1184). Energy Research Centre of the Netherlands, Food & Biobased Research, Wageningen UR. Disponible on line: <https://www.ecn.nl/docs/library/report/2010/e10013.pdf>

Hasunuma, T.; Sanda, T.; Yamada, R.; Yoshimura, K.; Ishii, J.; Kondo, A. (2011). Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 2.

Jeffries, T.W. (1985) Effects of culture conditions on the fermentation of xylose to ethanol by *Candida shehatae*. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, 15, 149-166, John Wiley & Sons, Inc. Disponible on line: <https://www.fs.usda.gov/treesearch/pubs/25679>

Jeffries, T.W.; Jin, Y.S. (2000). Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. *Advances in Applied Microbiology*, 47, 221–268.

Jönsson, L.J.; Alriksson, B.; Nilvebrant, N.O. (2013). Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 16.

Lee, H., Biely, P., Latta, R. K., Barbosa, M. F.; Schneider, H. (1986). Utilization of xylan by yeasts and its conversion to ethanol by *Pichia stipitis* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(2), 320-324.

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

Mood, S.H.; Golfeshan, A.H.; Tabatabaei, M.; Jouzani, G.S.; Najafi, GH.; Gholami, M y Ardjmand, M. (2013). Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 77-93.

Mosier, N.; Wyman, C.; Dale B.; Elander, R.; Lee, Y.Y.; Holtzapple, M.; Ladisch, M. (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), 673–686.

Mot, R.D.; Verachert, H. (1986). Secretion of  $\alpha$ -amylase and multiple forms of glucoamylase by the yeast *Trichosporon pullulans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 32(1), 47-51

Motta, F.L.; Andrade, C.C.P.; Santana, M.H.A. (2013). A review of xylanase production by the fermentation of xylan: Classification, characterization and applications. En: Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization, Chapter 10, INTECH, pp. 251. <http://dx.doi.org/10.5772/53544>

Mussatto, S.I.; Dragone, G.; Guimarães, P.M.; Silva, J.P. A.; Carneiro, L.M.; Roberto, I.C. ...y Teixeira, J. A. (2010). Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances*, 28(6), 817-830.

Özcan, S.; Kötter, P.; Ciciary, M. (1991). Xylan-hydrolysing enzymes of the yeast *Pichia stipitis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36(2), 190-195.

Prakasham, R.S., Rao, R.S.; Hobbs, P.J. (2009). Current trends in biotechnological production of xylitol and future prospects. *Current Trends in Biotechnology Pharmacy*, 3(1), 8-36.

Prior, B.A.; Kilian, S.G.; du Preez, J.C. (1989) Fermentation of D-xylose by the yeast *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: prospects and problems. *Process Biochemistry*, 24, 21–32.

Pu, Y.; Treasure, T.; Gonzalez, R.W.; Venditti, R.; Jameel, H. (2011). Autohydrolysis pretreatment of mixed hardwoods to extract value prior to combustion. *BioResources*, 6(4), 4856-4870.

Rafiqul, I.S.M.; Sakinah, A.M. (2013). Processes for the production of xylitol-A review. *Food Reviews International*, 29(2), 127-156.

Rockwood, D.L.; Rudie, A.W.; Ralph S.A.; Zhu, J.Y.; Winandy, J.E. (2008). Energy product options for Eucalyptus species grown as short rotation woody crops. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(8), 1361-1378.

Saha, B.C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 279-291.

Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27(2), 185-194.

- Scoma, A.; Rebecchi, S.; Bertin, L.; Fava, F. (2016). High impact biowastes from South European agro-industries as feedstock for second-generation biorefineries. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(1), 175-189.
- Sharma, M.; Kumar, A. (2013). Xylanases: An overview. *British Biotechnology Journal*, 3(1), 1.
- Sláviková, E.; Košíková, B.; Mikulášová, M. (2002). Biotransformation of waste lignin products by the soil-inhabiting yeast *Trichosporon pullulans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(3), 200-203.
- Stevens, B.J.H.; Payne, J. (1977). Cellulase and xylanase production by yeasts of the genus *Trichosporon*. *Microbiology*, 100(2), 381-393.
- Taherzadeh, M.J.; Karimi, K. (2008). Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(9), 1621-1651.
- Tamburini, E.; Costa, S.; Marchetti, M.G.; Pedrini, P. (2015) Optimized production of xylitol from xylose using a hyper-acidophilic *Candida tropicalis*. *Biomolecules*, 5, 1979-1989; doi:10.3390/biom5031979
- Teather, R.M.; Wood, P.J. (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(4), 777-780.
- Ur-Rehman, S.; Mushtaq, Z.; Zahoor, T.; Jamil, A.; Murtaza, M.A. (2015). Xylitol: A review on bioproduction, application, health benefits, and related safety issues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(11), 1514-1528.
- Vajzovic, A. (2013). *Production of xylitol and ethanol from lignocellulosics* (Doctoral dissertation).  
[https://digital.lib.washington.edu/researchworks/bitstream/handle/1773/22660/Vajzovic\\_washington\\_0250E\\_11147.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://digital.lib.washington.edu/researchworks/bitstream/handle/1773/22660/Vajzovic_washington_0250E_11147.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Vohra, M.; Manwar, J.; Manmode, R.; Padgilwar, S.; y Patil, S. (2014). Bioethanol production: Feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2 (1), 573-584.

Zaldivar, J.; Nielsen, J.; Olsson, L. (2001). Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1), 17-34.

Zhang, W.; Wei, G. (2012). The effects of lignocellulose acid-hydrolysis By-products on ethanol fermentation of xylose. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 34(13), 1178-1186.

---

## 7- Anexo

---

## Anexo 1

En la Figura 13 se muestran las curvas de crecimiento de las cepas que no se seleccionaron para continuar con los ensayos de fermentación.

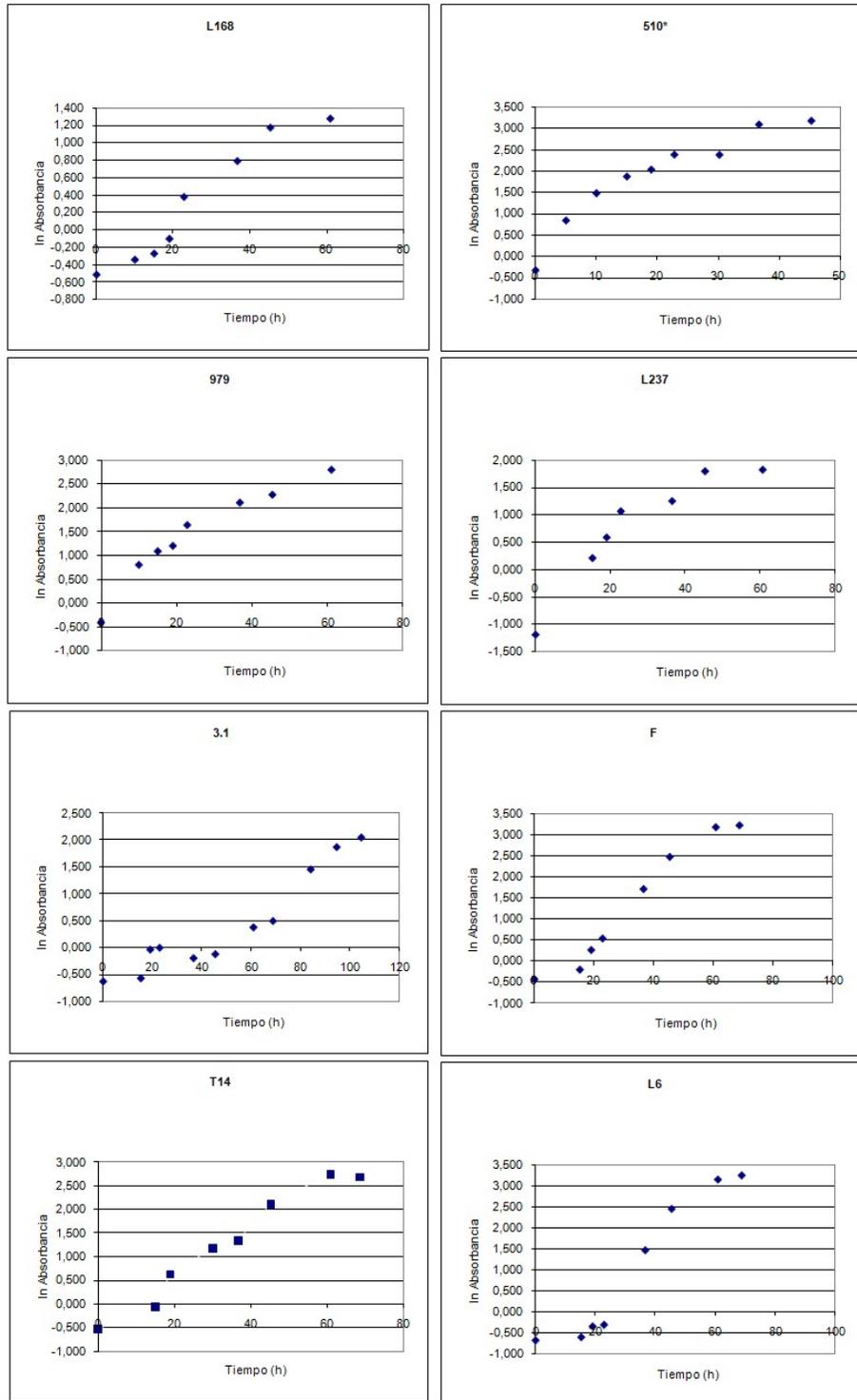


Figura 12. Curvas de crecimiento de las cepas que no se continuaron estudiando.

## Anexo 2

La Figura 13 muestra los perfiles de recuento de las levaduras viables y totales obtenidos para las fermentaciones del medio semi-sintético.

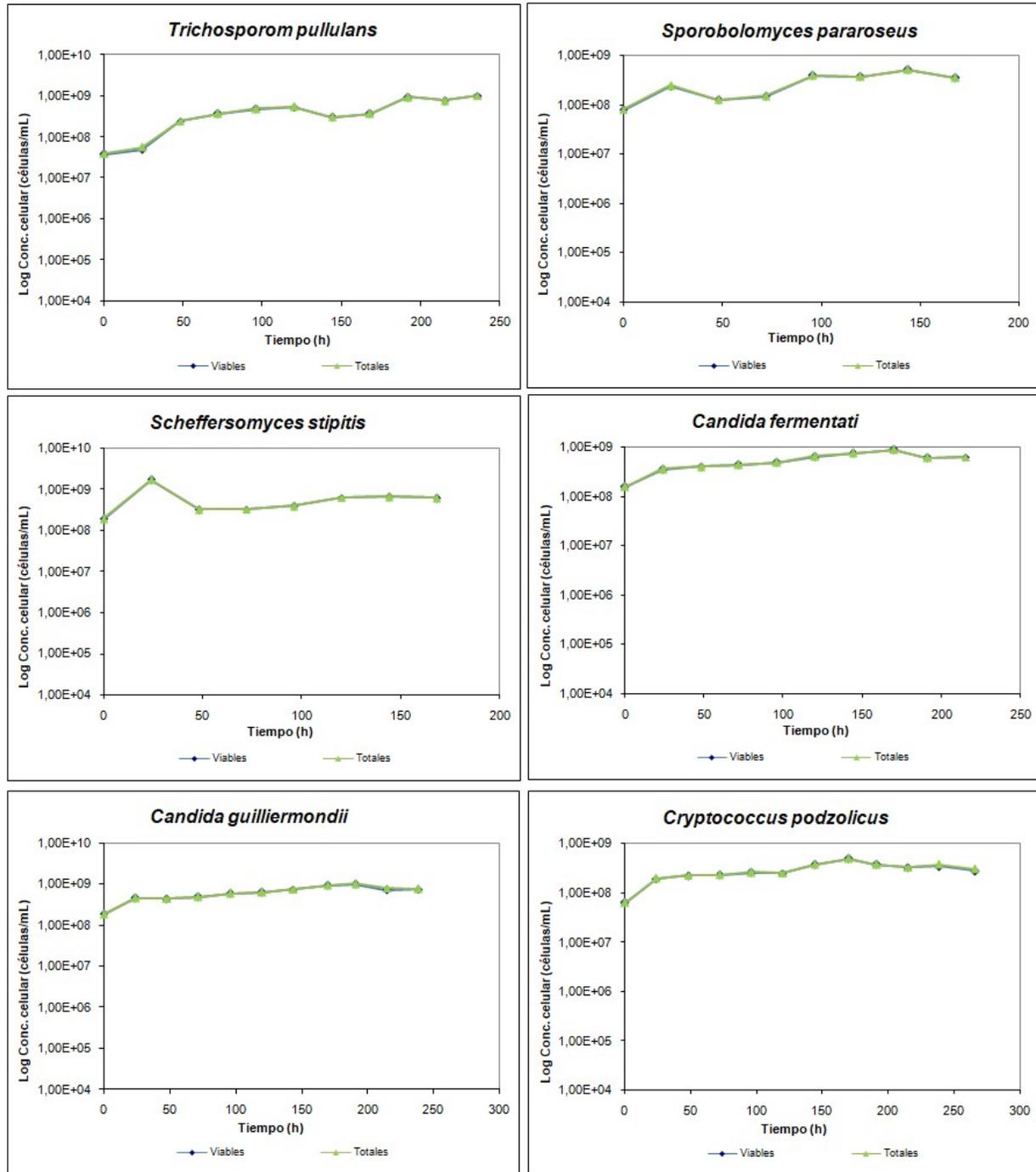


Figura 13. Perfiles de de los recuentos llevados a cabo durante la fermentación del medio semi-sintético.

### Anexo 3

La Figura 14 muestra los perfiles de recuento de las levaduras viables y totales obtenidos en las fermentaciones de hidrolizado de eucalipto.

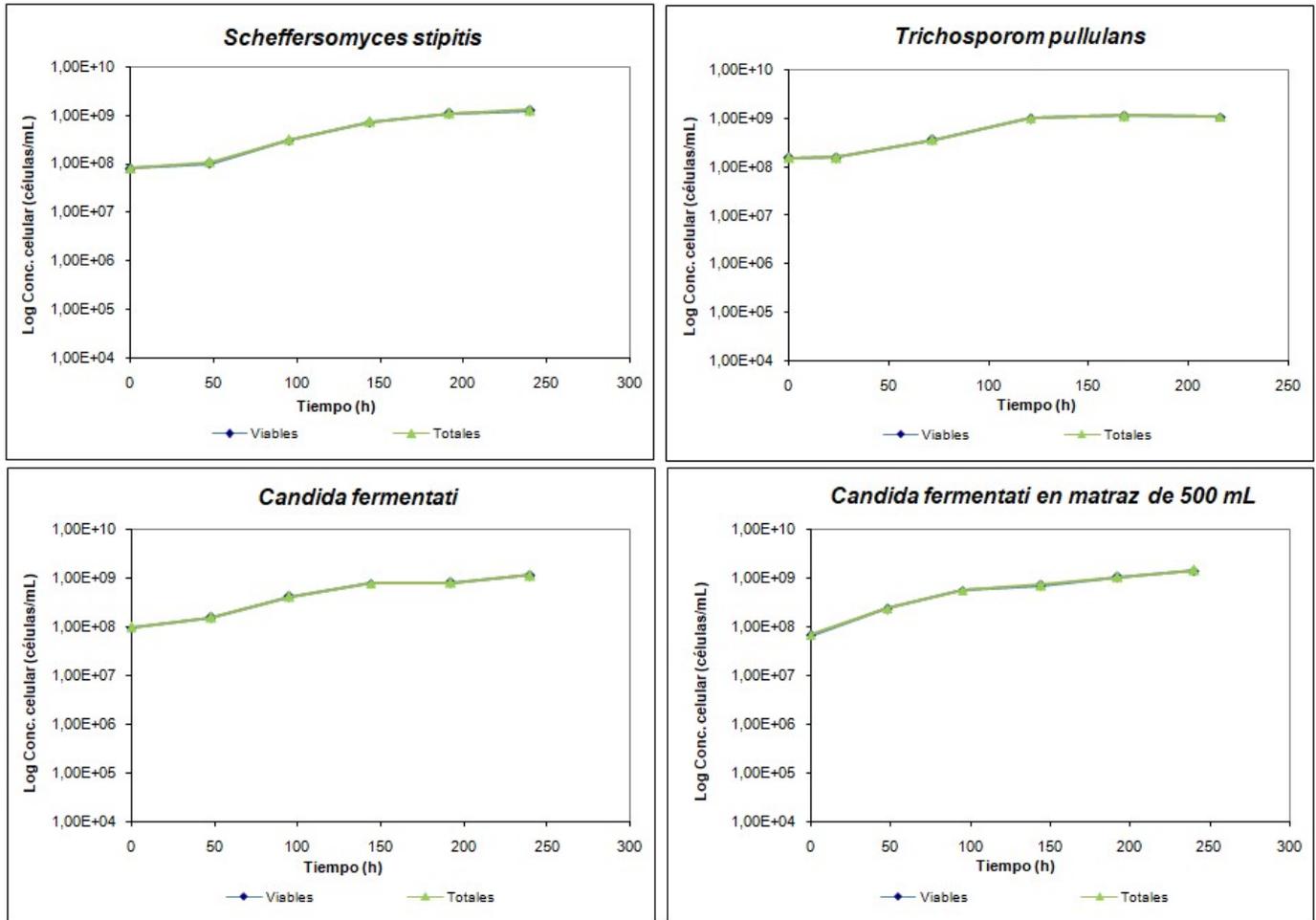


Figura 14. Perfiles de los recuentos obtenidos en la fermentación del hidrolizado de eucalipto.

## Anexo 4

Análisis de resultados de varianza para diferentes parámetros en la evaluación de las cepas creciendo en un medio con xilosa como principal fuente de carbono.

### FACTOR BIOMASA

14 GRUPOS

3.1, F, L-6, 80-2, T14, L-979, L-104, L-168, L-237, L-279, L-510, L-980, L-784,

S. stipitis

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	51,29	13	3,95	2,26	0,0717
Cepa	51,29	13	3,95	2,26	0,0717
Error	24,46	14	1,75		
Total	75,75	27			

### FACTOR VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO

14 GRUPOS

3.1, F, L-6, 80-2, T14, L-979, L-104, L-168, L-237, L-279, L-510, L-980, L-784,

S. Stipitis

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,03	13	2,1E-03	3,07	0,0231
Cepa	0,03	13	2,1E-03	3,07	0,0231
Error	0,01	14	6,9E-04		
Total	0,04	27			

## FACTOR CONCENTRACIÓN FINAL DE ETANOL

14 GRUPOS

3.1, F, L-6, 80-2, T14, L-979, L-104, L-168, L-237, L-279, L-510, L-980, L-784,

S. Stipitis

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6,47	13	0,50	5,33	0,0019
Cepa	6,47	13	0,50	5,33	0,0019
Error	1,31	14	0,09		
Total	7,78	27			

## FACTOR CONVERSIÓN DE SUSTRATO

14 GRUPOS

3.1, F, L-6, 80-2, T14, L-979, L-104, L-168, L-237, L-279, L-510, L-980, L-784,

S. Stipitis

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5046,86	13	388,22	2,94	0,0274
Cepa	5046,86	13	388,22	2,94	0,0274
Error	1847,00	14	131,93		
Total	6893,86	27			

## Anexo 5

Análisis de resultados de varianza para diferentes parámetros en la evaluación de las cepas al fermentar un medio semi-sintético.

### Cepas productoras de etanol:

#### FACTOR $Y_{p/s}$

3 GRUPOS

80-2, L-6, S.stipitis

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,01	2	0,01	6,61	0,0796
Cepa	0,01	2	0,01	6,61	0,0796
Error	3,1E-03	3	1,0E-03		
Total	0,02	5			

#### FACTOR EFICIENCIA

3 GRUPOS

80-2, L-6, S.stipitis

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	537,33	2	268,67	9,37	0,0512
Cepa	537,33	2	268,67	9,37	0,0512
Error	86,00	3	28,67		
Total	623,33	5			

#### FACTOR PRODUCTIVIDAD

3 GRUPOS

80-2, L-6, S.stipitis

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,02	2	0,01	11,05	0,0413
Cepa	0,02	2	0,01	11,05	0,0413
Error	3,3E-03	3	1,1E-03		
Total	0,03	5			

## FACTOR CONVERSIÓN DE SUSTRATO

3 GRUPOS

80-2, L-6, S.stipitis

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	76,33	2	38,17	22,90	0,0152
Cepa	76,33	2	38,17	22,90	0,0152
Error	5,00	3	1,67		
Total	81,33	5			

## FACTOR CONCENTRACIÓN FINAL ETANOL

3 GRUPOS

80-2, L-6, S.stipitis

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	32,33	2	16,17	16,17	0,0247
Cepa	32,33	2	16,17	16,17	0,0247
Error	3,00	3	1,00		
Total	35,33	5			

**Cepas productoras de xilitol:**

## FACTOR $Y_{p/s}$

3 GRUPOS

L-980, L-784, L-279

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,01	2	0,01	2,02	0,2785
Cepa	0,01	2	0,01	2,02	0,2785
Error	0,01	3	2,9E-03		
Total	0,02	5			

## FACTOR EFICIENCIA

3 GRUPOS

L-980, L-784, L-279

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	148,00	2	74,00	1,96	0,2859
Cepa	148,00	2	74,00	1,96	0,2859
Error	113,50	3	37,83		
Total	261,50	5			

## FACTOR PRODUCTIVIDAD

3 GRUPOS

L-980, L-784, L-279

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,4E-03	2	1,7E-03	5,72	0,0947
Cepa	3,4E-03	2	1,7E-03	5,72	0,0947
Error	9,0E-04	3	3,0E-04		
Total	4,3E-03	5			

## FACTOR CONVERSIÓN DE SUSTRATO

3 GRUPOS

L-980, L-784, L-279

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	76,33	2	38,17	1,45	0,3627
Cepa	76,33	2	38,17	1,45	0,3627
Error	79,00	3	26,33		
Total	155,33	5			

## FACTOR CONCENTRACIÓN FINAL XILITOL

3 GRUPOS

80-2, L-6, S.stipitis

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	42,33	2	21,17	12,70	0,0343
Cepa	42,33	2	21,17	12,70	0,0343
Error	5,00	3	1,67		
Total	47,33	5			

## Anexo 6

Análisis de resultados de varianza para diferentes parámetros en la evaluación de las cepas al fermentar un medio hidrolizado de eucalipto.

### Producción de etanol:

#### FACTOR $Y_{p/s}$

4 GRUPOS

S.stipitis, 80-2, 980

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,3E-03	3	4,3E-04	0,39	0,7704
Cepa	1,3E-03	3	4,3E-04	0,39	0,7704
Error	4,5E-03	4	1,1E-03		
Total	0,01	7			

#### FACTOR EFICIENCIA

4 GRUPOS

S.stipitis, 80-2, 980

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	21,33	2	10,67	0,29	0,7699
Cepa	21,33	2	10,67	0,29	0,7699
Error	112,00	3	37,33		
Total	133,33	5			

#### FACTOR PRODUCTIVIDAD

4 GRUPOS

S.stipitis, 80-2, 980

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,6E-04	2	1,8E-04	4,69	0,1192
Cepa	3,6E-04	2	1,8E-04	4,69	0,1192
Error	1,1E-04	3	3,8E-05		
Total	4,7E-04	5			

## FACTOR CONVERSIÓN DE SUSTRATO

4 GRUPOS

S.stipitis, 80-2, 980

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	141,50	3	47,17	1,78	0,2900
Cepa	141,50	3	47,17	1,78	0,2900
Error	106,00	4	26,50		
Total	247,50	7			

## FACTOR CONCENTRACIÓN FINAL ETANOL

4 GRUPOS

S.stipitis, 80-2, 980

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4,38	3	1,46	11,67	0,0190
Cepa	4,38	3	1,46	11,67	0,0190
Error	0,50	4	0,13		
Total	4,88	7			

## Producción de xilitol:

### FACTOR $Y_{p/s}$

4 GRUPOS

S.stipitis, 80-2, 980

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,01	2	3,6E-03	1,25	0,4019
Cepa	0,01	2	3,6E-03	1,25	0,4019
Error	0,01	3	2,9E-03		
Total	0,02	5			

## FACTOR EFICIENCIA

4 GRUPOS

S.stipitis, 80-2, 980

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	66,33	2	33,17	0,95	0,4784
Cepa	66,33	2	33,17	0,95	0,4784
Error	104,50	3	34,83		
Total	170,83	5			

## FACTOR PRODUCTIVIDAD

4 GRUPOS

S.stipitis, 80-2, 980

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7,2E-05	2	3,6E-05	1,08	0,4434
Cepa	7,2E-05	2	3,6E-05	1,08	0,4434
Error	1,0E-04	3	3,4E-05		
Total	1,7E-04	5			

## FACTOR CONCENTRACIÓN FINAL XILITOL

4 GRUPOS

S.stipitis, 80-2, 980

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,33	2	1,17	3,50	0,1643
Cepa	2,33	2	1,17	3,50	0,1643
Error	1,00	3	0,33		
Total	3,33	5			