

Influencia de la concentración de oxígeno en la producción de etanol a partir de la fermentación de mezclas D-glucosa/D-xilosa e hidrolizados de aserrín de Curupaú por *Pichia stipitis* CBS 5773

Influence of oxygen concentration in ethanol production by *Pichia stipitis* CBS 5773 through fermentation of D-glucose/D-xylose mixtures and Curupaú hydrolyzed

Peña Maribel¹, Cristhian Carrasco², Carla Crespo¹, Terrazas S. L. Enrique¹

¹Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Cs Farmacéuticas y Bioquímicas Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Av. Saavedra 2224 La Paz Bolivia

² Lund University, Chemical Engineering, Getingevägen 60, Lund, Sweden

e-mail: enrique.terrazas@yahoo.com

RESUMEN

El aserrín de *Curupaú*, un residuo de la industria maderera en Bolivia, es un sustrato potencial para la producción de etanol de segunda generación. Un requisito principal para la producción de etanol a partir de madera, es la eficiente conversión de xilosa a etanol, la cual depende de la actividad microbiana. En la presente investigación se estudió *Pichia stipitis*, por su capacidad de convertir xilosa a etanol con alto rendimiento a velocidades relativamente altas.

Se estudió el efecto de la proporción de xilosa, la influencia de la concentración de oxígeno y la inhibición por sustrato complejo (hidrolizado de aserrín de *Curupaú*) en el crecimiento y formación de productos de *P. stipitis*.

P. stipitis fue cultivada en condiciones aerobias en un sustrato mixto con diferentes proporciones de glucosa y xilosa: 10:10, 5:15 y 1:19 (g: g). Se demostró que a mayor proporción de xilosa (1g glucosa: 19g xilosa) se favorece el incremento de biomasa (1g/L, respecto a las otras proporciones). La concentración de oxígeno favorece la producción de biomasa alcanzando 8.8g/L. Sin

embargo, en condiciones microaerobias la producción de biomasa fue de 7.6g/L.

La fermentación en condiciones microaerobias de un sustrato complejo, produjo 52% de rendimiento en la producción de etanol, no obstante, el rendimiento en la producción de etanol fue de 79% en medio definido. Esta diferencia demostró que hubo inhibición de la fermentación cuando el hidrolizado de aserrín de *Curupaú* fue utilizado, esto pudo ser explicado por la formación de inhibidores durante su pretratamiento fisicoquímico.

Palabras Clave: lignocelulósico, pretratamiento, etanol, xilosa, aerobio, microaerobio, levadura.

Influence of oxygen concentration in ethanol production by *Pichia stipitis* CBS 5773 through fermentation of D-glucose/D-xylose mixtures and *Curupaú* hydrolyzed

ABSTRACT

The *Curupaú* residues from the Bolivian wood industry are a potential substrate for ethanol production of second generation. The main goal from ethanol production from hard wood is the efficient conversion of xylose to ethanol. It is dependent of the microbial activity. The current research studied the capability of *Pichia stipitis* to convert xylose to ethanol with high yield and relatively high velocity.

The effect of the proportion of xylose, the influence of oxygen and the inhibition due to a complex substrate (hydrolysate of *Curupaú* residues) respect to the growth and products formation of *Pichia stipitis* were studied.

Pichia stipitis was cultivated under aerobic conditions using a mixed substrate with different proportions of glucose and xylose, 10:10, 5:15 y 1:19 (g: g), respectively. It was demonstrated that higher proportion of xylose (1g glucose: 19g xylose) favors the increasing of biomass (1g/L respect to the other proportions).

The oxygen supply favors the biomass production reaching 8.8g/L. Moreover, under microaerobic conditions the biomass production was 7.6g/L.

Under microaerobic conditions the fermentation of a complex substrate yielded 52% on ethanol production. However, the yield of ethanol production was 79% in a defined medium. This remarkable difference on yields demonstrates the inhibition on fermentation when the hydrolysate of *Curupaú* residue was used. This can be explained due to the production of inhibitors during its physicochemical pretreatment.

Key Words: lignocellulosic, pretreatment, etanol, xylose, aerobic, microaerobic, yeast.

INTRODUCCIÓN

Con la inevitable depleción del abastecimiento de energía mundial, es creciente el interés por la búsqueda de nuevas fuentes alternativas de energía¹. El etanol, es un importante químico industrial con un emergente potencial como bio-combustible de reemplazo a los combustibles fósiles. La principal ventaja del uso y la producción del mismo, es la de contribuir a la disminución de la red acumulativa de gases de efecto invernadero en la atmósfera¹.

El material lignocelulósico es estudiado como una fuente potencial para la producción fermentativa de etanol². En Bolivia, una alternativa atrayente, es el sector maderero. Entre las especies más explotadas se encuentra el *Curupaú*, el cual está compuesto principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, polímeros naturales característicos en composición de maderas duras. Los polímeros mencionados constituidos por monosacáridos, representan fuentes energéticas aprovechables, renovables y a su vez alternativas a los combustibles fósiles.

La celulosa es un polímero lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos (β 1 \rightarrow 4) y constituye el 35 – 50 % en peso seco del material lignocelulósico³. Las hemicelulosas, a diferencia de la celulosa, son polímeros heterogéneos de pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (manosa, glucosa, galactosa) y ácidos derivados de azúcares. Las hemicelulosas constituyen el 20 – 35 % en peso seco del material lignocelulósico, siendo D-xilosa su principal componente⁴. En este sentido, D-xilosa es el monosacárido más abundante en el material lignocelulósico, después de la glucosa⁵. En la práctica, los hidrolizados de material lignocelulósico, pueden tener diferentes proporciones glucosa/xilosa debido a los diferentes métodos de hidrólisis que se aplican y los diferentes substratos que se utilizan.

La capacidad de los microorganismos de fermentar glucosa y xilosa es de gran importancia para un proceso económicamente factible. La producción de etanol es dependiente de la actividad fermentativa microbiana, particularmente de las levaduras. Las levaduras naturales que pueden fermentar xilosa a etanol

10

son *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* y *Pachysolen tannophilus*^{6,7,8}, la tradicional *Saccharomyces cerevisiae* carece de este comportamiento diáuxico. *P. stipitis* puede convertir xilosa a etanol con alto rendimiento y a velocidades relativamente altas⁶.

Muchos autores han demostrado que la conversión de xilosa por *P. stipitis* es altamente influenciada por la presencia de oxígeno^{9,10,11}. En condiciones aerobias se produce biomasa, sin embargo, cuando el oxígeno es limitado se forman otros productos.

Para un mejor entendimiento y una posible predicción del proceso, fue necesario realizar un modelo que describa la influencia del oxígeno en la conversión de substratos mixtos y su uso secuencial (hexosas y pentosas, respectivamente). En el presente artículo se estudió la influencia de la concentración de oxígeno en la conversión de varias mezclas D-glucosa/D-xilosa e hidrolizados de aserrín de *Curupaú* por *P. stipitis* CBS 5773 y su efecto en la producción de etanol, biomasa y el período de fermentación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismo y medio de cultivo. *Pichia stipitis* CBS 5773, obtenida del cepario del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Lund – Suecia, fue utilizada en todos los experimentos.

Las células fueron mantenidas en medio sólido constituido por: 20g/L peptona de soya, 10g/L extracto de levadura y 20g/L agar agar con 20g/L glucosa como fuente adicional de carbono.

El inóculo fue desarrollado aeróbicamente en matraces erlenmeyer de 250mL de capacidad, en un incubador agitado a una velocidad de 250rpm y 30 °C de temperatura durante 48 horas. El volumen de cultivo fue de 50mL y el medio definido¹² fue utilizado, con algunas modificaciones. El medio basal contenía por litro de solución: 7.5 g (NH₄)₂SO₄, 3.5 g KH₂PO₄, 0.75 g MgSO₄•7H₂O, 30 mg EDTA, 9 mg CaCl₂•2H₂O, 9 mg ZnSO₄•7H₂O, 6 mg FeSO₄•7H₂O, 2 mg H₃BO₃, 1.55 mg MnCl₂•2H₂O, 0.8 mg Na₂MoO₄•2H₂O, 0.6 mg CoCl₂•2H₂O, 0.6 mg CuSO₄•5H₂O, 0.2 mg KI, 50 mg d-biotina, 0.2 mg ácido p-aminobenzoico,

1.0 mg ácido nicotínico, 1.0 mg pantotenato de calcio, 1.0 mg piridoxina HCl, 1.0 mg tiamina HCl, 25 mg m-inositol. El pH final del medio de cultivo fue de 5.5, mismo que fue esterilizado por autoclave a 121 °C durante 20 minutos. La solución de vitaminas fue esterilizada por filtración (20um) y adicionada al medio después de ser autoclavado y enfriado.

Pretratamiento del aserrín de *Curupaú*. El aserrín de *Curupaú* fue colectado en el aserradero MARSA S.R.L., cuya materia prima es el *Curupaú*. Los puntos de muestreo en el lote fueron cuatro, ubicados a distintos niveles de altura. Se recolectó un 10% del total, para tener una muestra representativa. El aserrín fue trasladado en bolsas plásticas y almacenadas a 4 °C. Posteriormente se efectuó repetidos lavados del aserrín de *Curupaú* con agua destilada a 50 °C hasta lograr un aspecto transparente en el último lavado.

El pretratamiento de aserrín de *Curupaú* por hidrólisis ácida fue llevado a cabo en un hidrolizador o generador de vapor. Las condiciones de pretratamiento fueron de 1.5 % de concentración de H₂SO₄, 10 minutos de residencia, 200 °C de temperatura y 60% de humedad.

Fermentaciones. Las fermentaciones en cultivo Batch se realizaron en matraces erlenmeyer de 250mL en un incubador agitado a una velocidad de agitación de 250rpm y 30 °C de temperatura. Cada matraz erlenmeyer contenía 50mL de medio y 5mL de inóculo. El tiempo de incubación dependió de la velocidad de crecimiento del microorganismo en cada una de las condiciones. El medio de cultivo sintético¹² estuvo suplementado con soluciones de glucosa (100g/L) y xilosa (100g/L), las cuales fueron preparadas separadamente. Las proporciones de glucosa y xilosa en el medio de cultivo (20g/L de azúcares totales) fueron 10:10, 5:15 y 1:19 (g: g), respectivamente.

El medio de cultivo complejo¹² estuvo suplementado con la fracción líquida del hidrolizado de aserrín de *Curupaú* (900mL/L) obtenido bajo las condiciones descritas anteriormente.

Influencia de la concentración de oxígeno. Condiciones aerobias y microaerobias se

establecieron para determinar la influencia de la concentración de oxígeno en la fermentación de mezclas de glucosa/xilosa e hidrolizado de aserrín de *Curupaú*, esto se llevó a cabo mediante la aplicación de dos diferentes sistemas. El sistema aerobio estuvo constituido por matraces con tapa rosca, los cuales fueron acoplados a capilares conectados a bombas de aire, permitiendo de esta manera saturación constante de oxígeno a un flujo determinado. El sistema microaerobio estuvo constituido por matraces con tapa acoplados a un capilar cerrado conectado a una jeringa para muestreo, de esta manera se limitó la entrada de oxígeno en cada uno de los matraces.

Determinaciones analíticas. Cada fermentación fue monitoreada durante 48 horas y se analizó 1mL de muestra a las 0, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 18, 26, 30, 40, 44 y 48 horas. La concentración de glucosa, xilosa y etanol fue determinada usando un sistema de HPLC Agilent equipado con un detector de índice de refracción y una columna analítica de Biorad (Aminex HPX-87H) a 55 °C. Ácido sulfúrico (5mM) fue utilizado como fase móvil. Las muestras fueron acidificadas (10uL de H₂SO₄ al 20% por 1mL de muestra) y filtradas antes del análisis.

La concentración celular fue determinada a través de la medición de su densidad óptica por espectrofotometría a 620 nm. La concentración celular fue determinada también, a través de la

medición de su peso seco, para ello, las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos y el pellet celular fue recolectado y secado a 105 °C durante 18 horas para posteriormente ser pesado en una balanza de precisión.

RESULTADOS

Adaptación de *Pichia stipitis* CBS 5773 a las condiciones de cultivo. Antes de realizar los experimentos de fermentación de mezclas de glucosa y xilosa en condiciones aerobias y microaerobias, *P. stipitis* CBS 5773 fue adaptada a las condiciones de cultivo: Medio de cultivo¹², 250 rpm, 30°C de temperatura de incubación y pH inicial de 5.5 durante 48 horas, utilizando como fuente de carbono y energía una mezcla de 10g/L de glucosa y 10g/L de xilosa.

Pretratamiento del aserrín de *Curupaú*. Como resultado del pretratamiento de aserrín de *Curupaú* por hidrólisis ácida se obtuvieron dos fracciones, una fracción sólida con alto contenido de fibras insolubles, y una fracción líquida o hidrolizado con alto contenido de monosacáridos y oligosacáridos solubles, la cual fue utilizada en el experimento de fermentación. En la Tabla 1 se observan los resultados obtenidos después de la hidrólisis ácida de aserrín de *Curupaú*.

Tabla 1. Contenido de azúcares del hidrolizado de aserrín de *Curupaú*

Sólidos Totales (%)	Masa Filtrada (g)	Volumen Filtrado (L)	pH	Glucosa		Xilosa		Arabinosa		Total de Azúcares (g/100g MS)	Rendimiento (%)	Extracción (%)
				(g/L)	(g/100g MS)	(g/L)	(g/100g MS)	(g/L)	(g/100g MS)			
16.30	10.66	0.27	2.67	0.54	1.07	5.14	10.16	1.00	2.00	13.20	24.72	75.28

MS: Materia seca

Las condiciones de pretratamiento para el aserrín de *Curupaú* fueron las ideales, debido a que fueron optimizadas previamente¹³, por lo cual la presencia de inhibidores de la fermentación

producidos durante el pretratamiento fisicoquímico fue despreciable, estos resultados son mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2. Contenido de subproductos del hidrolizado de aserrín de *Curupaú*.

Furfural (g/ 100 g MS)	5-HMF (g/ 100 g MS)	Ácido Acético (g/ 100 g MS)
0.00	0.02	0.06

5-HMF: 5 Hidroxi metil furfural

Conversión de mezclas D-glucosa/D-xilosa por *P. stipitis* CBS 5773. El propósito fundamental de este experimento fue demostrar la capacidad fermentativa de *P. stipitis* en condiciones aerobias, cuando diferentes proporciones de D-glucosa y D-xilosa se hallan presentes en el medio de cultivo, debido a que ambos monosacáridos son predominantes después de realizar el pretratamiento fisicoquímico del aserrín de *Curupaú* (Tabla 1).

En el Experimento 1, se sometió a *P. stipitis* a un cultivo diáxico en el cual el sustrato limitante fue xilosa (comparado a los experimentos 2 y 3).

En la Figura 1 se observa la cinética de crecimiento de *P. stipitis* CBS 5773, cuando es cultivada en un medio con 10g/L de glucosa y 10g/L de xilosa. Se demostró que a las 10 horas ésta alcanza su velocidad máxima de crecimiento (0.25 h^{-1}). La concentración celular producida cuando son consumidos ambos sustratos fue de 7,40g/L. Es probable que al alcanzar esta velocidad máxima la glucosa, como sustrato de preferencia, sea consumida y la disminución en la velocidad de crecimiento se deba al consumo de xilosa.

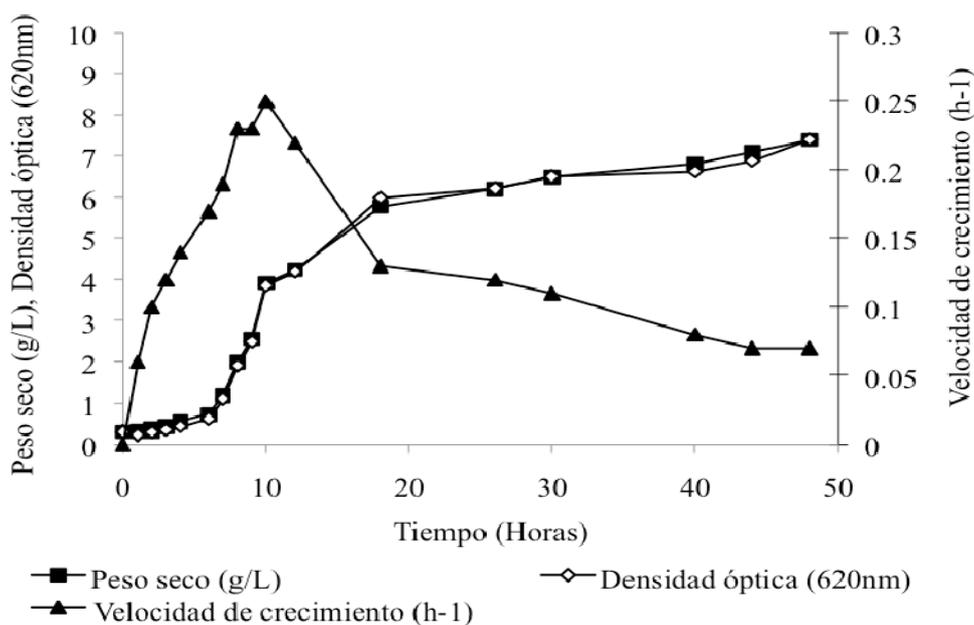


Figura 1. Cinética de crecimiento de la cepa *Pichia stipitis* CBS 5773 basada en el incremento de su peso seco (g/L), densidad óptica (620 nm de longitud de onda) y velocidad de crecimiento (h^{-1}) bajo las condiciones del Experimento 1.

En el Experimento 2 con una proporción de azúcares, 5g glucosa: 15g xilosa, se obtuvo 7,58g/L de concentración celular de *P. stipitis* en

48 horas de fermentación y la velocidad máxima de crecimiento fue de $0,22\text{h}^{-1}$, alcanzada a las 9 horas de incubación (Figura 2).

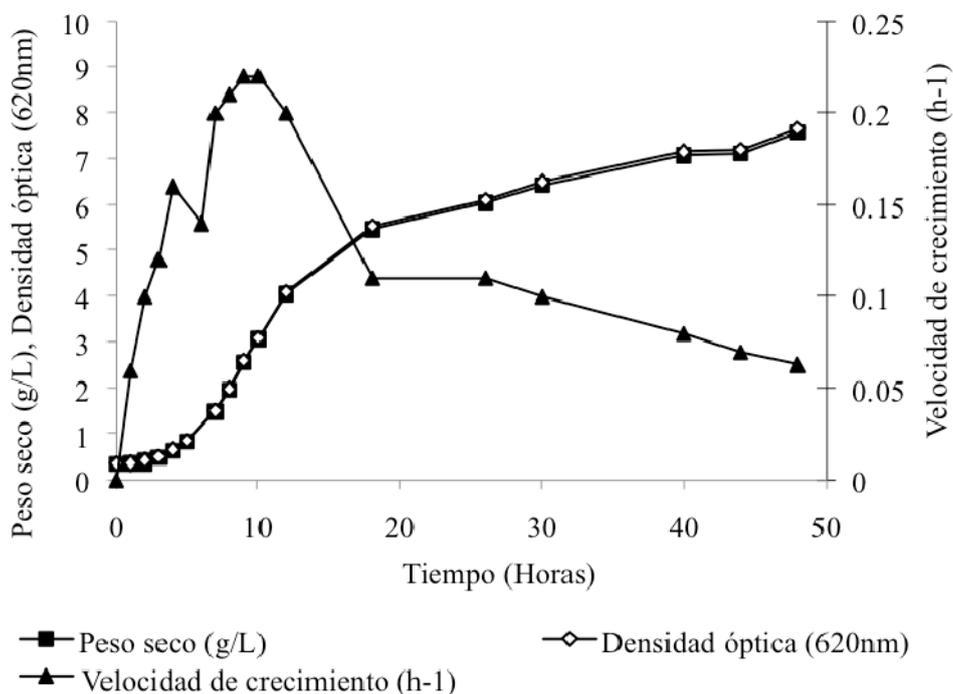


Figura 2. Cinética de crecimiento de la cepa *Pichia stipitis* CBS 5773 basada en el incremento de su peso seco (g/L), densidad óptica (620 nm de longitud de onda) y velocidad de crecimiento (h⁻¹) bajo las condiciones del Experimento 2.

La evaluación del experimento 2 demostró la existencia un ligero incremento de la producción de biomasa en comparación al experimento 1, esto sugiere que existe una mejor adaptación de *P. stipitis* CBS 5773 en el medio de cultivo rico en xilosa.

En el Experimento 3 (proporción de azúcares, 1g glucosa: 19g xilosa), se demostró que a mayor

concentración de xilosa en el medio existe un incremento poco significativo en la producción de biomasa. La producción de biomasa por *P. stipitis* CBS 5773 fue de 7,92 (g/L). La velocidad máxima de crecimiento de *P.stipitis* CBS 5773 fue de 0,26h⁻¹, a las 10 horas de incubación (Figura 3).

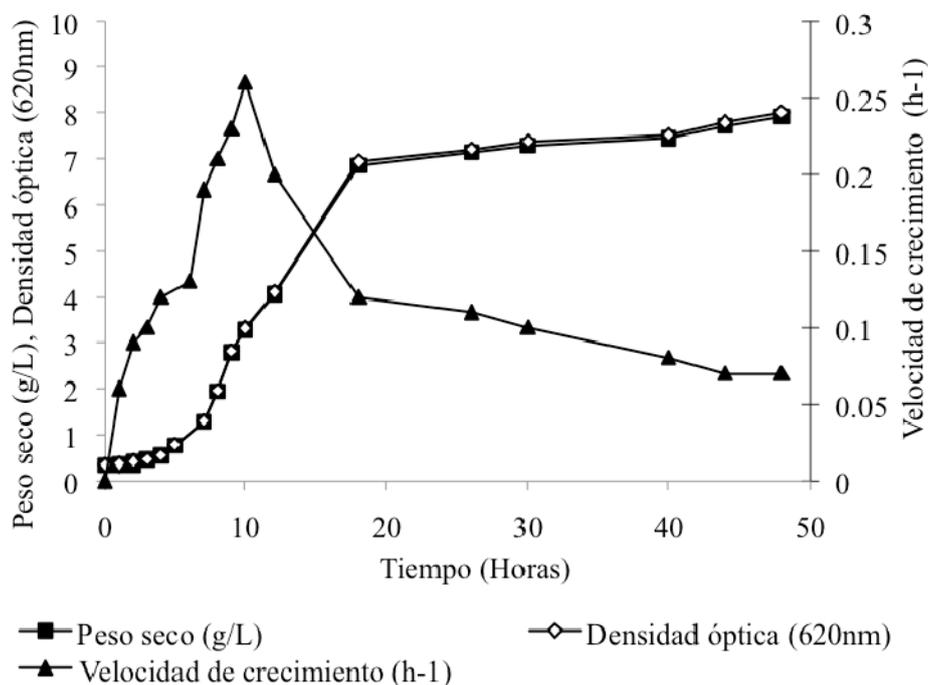


Figura 3. Cinética de crecimiento de la cepa *Pichia stipitis* CBS 5773 basada en el incremento de su peso seco (g/L), densidad óptica (620 nm de longitud de onda) y velocidad de crecimiento (h^{-1}) bajo las condiciones del Experimento 3.

Es importante mencionar que la única diferencia en los experimentos 1, 2 y 3 fue la proporción de sustratos (proporciones glucosa y xilosa en el medio), sin embargo, la concentración de azúcares totales en cada experimento fue la misma (20g/L de azúcares totales).

El propósito fundamental de este experimento fue determinar el efecto de la proporción de xilosa como sustrato en la producción de biomasa en condiciones aerobias. Se observó que el incremento de la proporción de xilosa en el medio, favorece la producción de biomasa (experimento 3, 2 y 1: 7,92, 7,58 y 7,40 g/L de biomasa en peso seco, respectivamente).

Influencia de la concentración de oxígeno. La producción de biomasa de *P. stipitis* CBS 5773

fue estudiada bajo la influencia de la concentración de oxígeno. En la Figura 4 se puede observar que la máxima concentración de biomasa fue producida en condiciones aerobias durante un periodo de 48 horas en un sustrato compuesto por glucosa y xilosa con una proporción (1:19) g/L. En condiciones aerobias la producción de biomasa celular fue de 8.81 g/L y la máxima velocidad de crecimiento en estas condiciones fue de 0.27 h^{-1} a las 10 horas de fermentación. En condiciones microaerobias la biomasa celular después de 48 horas fue de 7.65 g/L y la máxima velocidad de crecimiento en estas condiciones fue de 0.23 h^{-1} a las 10 horas de fermentación (Figura 4).

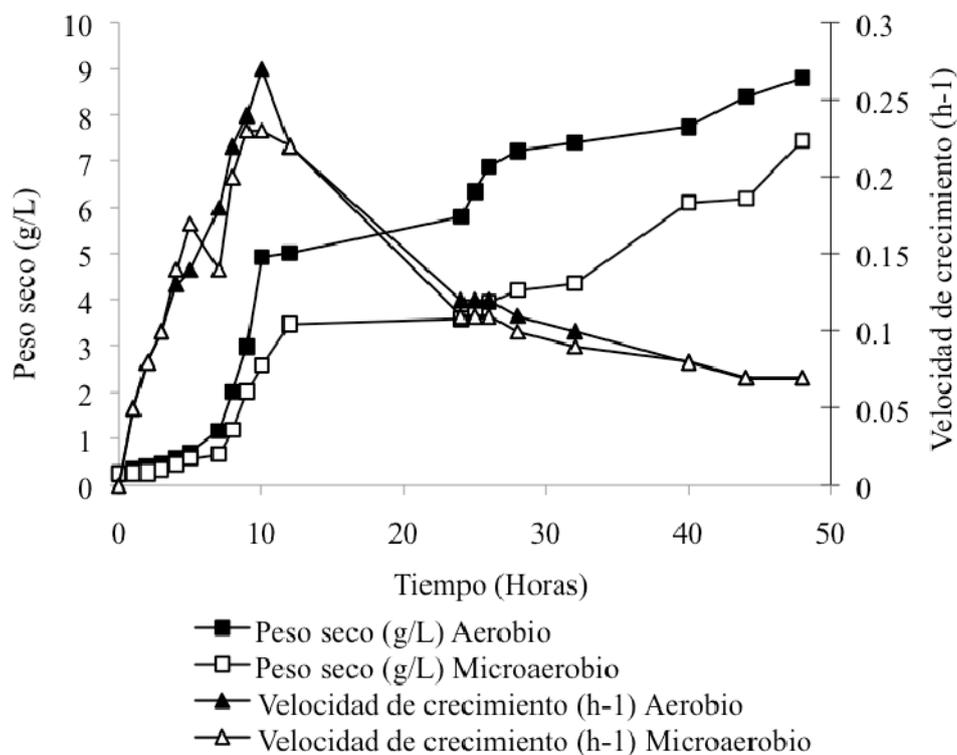


Figura 4. Cinética de crecimiento de la cepa *Pichia stipitis* CBS 5773 basada en el incremento de su peso seco (g/L) y velocidad de crecimiento (h⁻¹) bajo condiciones aerobias y microaerobias.

Fermentación en medio definido (mezcla de D-glucosa/D-xilosa) y en medio complejo (hidrolizado de aserrín de *Curupaú*) en condiciones aerobias y microaerobias. La fermentación de la fracción líquida o hidrolizado del pretratamiento del aserrín de *Curupaú* (medio

complejo) fue llevada a cabo, utilizando como control una mezcla de D-glucosa/D-xilosa (medio definido), cuyas concentraciones fueron similares a las obtenidas en la fracción líquida del hidrolizado de aserrín de *Curupaú* (Tabla 3).

Tabla 3. Contenido de azúcares en los medios de cultivo definido y complejo bajo condiciones microaerobias y aerobias.

Condiciones	Medio definido			Medio complejo		
	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Azúcares totales (g/L)	Glucosa (g/L)	Xilosa (g/L)	Azúcares totales (g/L)
Microaerobio	0,69	4,56	5,25	0,67	4,86	5,53
Aerobio	0,63	4,72	5,35	0,69	4,94	5,63

En la Figura 5 se puede observar la diferencia en cuanto a la producción de biomasa, cuando se llevó a cabo la fermentación en condiciones aerobias y microaerobias a las 24 horas de

experimentación. Se observa también la influencia negativa en la producción de biomasa cuando se utilizó un sustrato complejo, comparado a un sustrato definido.

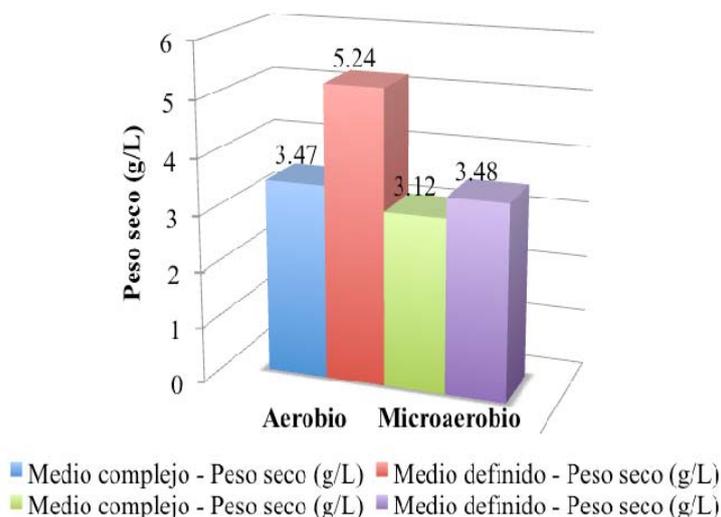


Figura 5. Producción de biomasa a las 24 horas de fermentación cuando sustratos complejos y definidos son utilizados en condiciones aerobias y microaerobias

Respecto a la producción de etanol con los mismos sustratos en las mismas condiciones, en la Figura 6 se puede observar que en condiciones

microaerobias se produjo mayor concentración de etanol. La inhibición en la producción de etanol por el sustrato no fue evidente.

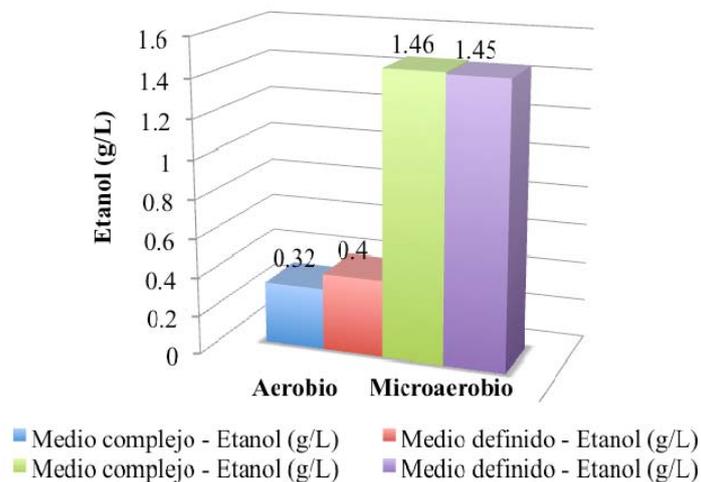


Figura 6. Producción de etanol a las 24 horas de fermentación cuando sustratos complejos y definidos son utilizados en condiciones aerobias y microaerobias

La producción máxima de etanol fue de 1.46g/L y 1,45g/L, ambas obtenidas a las 24 horas de fermentación en condiciones microaerobias utilizando medio complejo constituido (hidrolizado de aserrín de *Curupaú*) y medio definido (mezclas D-glucosa/D-xilosa), respectivamente. Sin embargo, el rendimiento fue de 0.26g y 0,40 g de etanol producido por cada gramo de sustrato consumido, respectivamente.

En la actualidad un indicador importante de rendimiento de la producción de etanol, es aquel referido al rendimiento teórico (0,51 g etanol/g xilosa consumida) el cual fue del 52 % y 79%, en medio complejo y definido, respectivamente. En condiciones aerobias existió mayor producción de biomasa en ambos medios, en consecuencia se registró menor producción de etanol, estos resultados son resumidos en la Tabla 4.

Tabla 4. Consumo de sustratos, producción de etanol y biomasa y rendimientos respecto a la producción de etanol en condiciones aerobias y microaerobias, cuando un medio complejo y definido es fermentado por *Pichia stipitis* CBS 5773

Condiciones	Sustratos consumidos		Productos		Rendimiento		
	Glucosa (%)	Xilosa (%)	Biomasa (g/L)	Etanol (g/L)	Yp/s (g/g)	Yp/s (%)	
Medio definido	Microaerobio	100	99,78	3,48	1,45	0,40	79,21
	Aerobio	100	97,67	5,24	0,40	0,08	14,78
Medio complejo	Microaerobio	100	99,79	3,12	1,46	0,26	51,77
	Aerobio	100	98,38	3,47	0,32	0,06	11,49

DISCUSIÓN

Pretratamiento para la hidrólisis de aserrín de *Curupaú*. El presente trabajo contribuye al aprovechamiento de residuos lignocelulósicos de las industrias madereras para la producción de bioetanol en nuestro país. En este sentido, se caracterizó el aserrín de *Curupaú* como materia prima. Este residuo presentó un alto porcentaje de celulosa y una considerable cantidad de hemicelulosas (Tabla 1). La relativa proporción de azúcares individuales depende del material lignocelulósico, la fracción de hemicelulosas de maderas duras es rica en pentosas¹⁴, siendo esto demostrado en el caso del *Curupaú* que se halla clasificado dentro del grupo de maderas duras, haciendo del mismo un sustrato idóneo para el crecimiento y fermentación de *P. stipitis*.

Otro factor producto del pretratamiento, además del contenido de monómeros, que influencia la fermentación es la presencia de inhibidores, tales como ácidos orgánicos de bajo peso molecular, furanos y compuestos aromáticos, los cuales son potentes inhibidores del metabolismo microbiano^{15,16,17}. Estos inhibidores pueden ser

eficientemente removidos por varios procesos de detoxificación^{18,19}. Sin embargo, el objetivo principal es aplicar un método de pretratamiento en el cual no se produzcan estos compuestos, dando la posibilidad de concentrar las fracciones para contribuir a la economía del uso de agua²⁰. Por esta razón, es importante optimizar las condiciones de pretratamiento para reducir la producción de inhibidores. Como resultado del pretratamiento de aserrín de *Curupaú*, no se registró o se registraron muy bajas concentraciones de inhibidores (Tabla 2) evitando de esta forma su efecto negativo en la fermentación.

Conversión de mezclas D-glucosa/D-xilosa por *P. stipitis* CBS 5773. Las levaduras, cuando oxidan o fermentan glucosa, pueden asimilar una parte de la misma, acumulándola en la biomasa celular en forma de glucógeno, ácidos grasos, etc. El principio de adaptación del microorganismo hacia un medio de cultivo rico en xilosa, se enfoca en la asimilación de la misma y se valora por consumo de sustrato y/o producción de biomasa²¹.

Si la concentración de monosacáridos es el factor limitante de crecimiento en un cultivo proliferante, entonces podemos tener un desarrollo equilibrado, en el cual el número de células se incrementa a la misma velocidad, pero esto no ocurre cuando el sustrato está en exceso o es un sustrato mixto, ya que entonces se producen velocidades diferentes de crecimiento²¹. El comportamiento de *P. stipitis* bajo condiciones aerobias en diferentes proporciones de un sustrato mixto definido conteniendo glucosa y xilosa (20g/L de azúcares totales) fue estudiado en tres experimentos: 1 (10g/L:10g/L), 2 (5g/L:15g/L) y 3 (1g/L:19g/L). Resultados reportados en las figuras 1, 2 y 3 demostraron que ambas fuentes de carbono fueron consumidas, esto es evidenciado por la variación en la velocidad de crecimiento. Sin embargo, este experimento demostró que a mayor proporción de xilosa en el medio de cultivo, mayor es el incremento de la densidad celular (experimento 3, 2 y 1: 7,92, 7,58 y 7,40 g/L de biomasa en peso seco, respectivamente). El crecimiento y la actividad metabólica de *P. stipitis* en un cultivo, dependen del medio en que ha sido preparado el inóculo, por esta razón, es necesario realizar previamente varias resiembras en el mismo medio de cultivo con el sustrato como factor limitante, en este caso, xilosa como sustrato, para estudiar su conversión biosintética a productos como biomasa y etanol²¹.

Influencia de la concentración de oxígeno. La influencia de la concentración de oxígeno en la producción de biomasa fue estudiada (Figura 4). Los resultados obtenidos evidencian mayor producción de biomasa bajo condiciones aerobias (8.81g/L) y no así en condiciones microaerobias (7.65g/L). Cuando la concentración de sustrato es el factor limitante del crecimiento se obtiene más biomasa en aerobiosis, debido a que la asimilación de xilosa en presencia de oxígeno contribuye a la respiración celular, ya que en este proceso de producción de energía, el oxígeno actúa como último aceptor de electrones contribuyendo a la formación de ATP y manteniendo la permeabilidad de la membrana²¹.

Fermentación en medio definido (mezcla de D-glucosa/D-xilosa) y en medio complejo (hidrolizado de aserrín de *Curupaú*) en

condiciones aerobias y microaerobia. La fermentación del medio definido (mezcla de D-glucosa/D-xilosa) fue utilizada como referencia comparativa a la fermentación del hidrolizado de aserrín de *Curupaú* (medio complejo). La concentración de azúcares fermentables fue preparada de acuerdo a la concentración de azúcares obtenida en el hidrolizado de aserrín de *Curupaú* después de su pretratamiento (Tabla 3). La fermentación de ambos medios fue llevada a cabo en condiciones aerobias y microaerobias. Estudios realizados^{22, 23} demuestran que en condiciones limitadas de oxígeno, *P. stipitis* utiliza el 10% del sustrato para la producción de biomasa y el 90% para la producción de etanol. Estos resultados son confirmados en la Figura 5, debido a que la producción de biomasa es mayor cuando se lleva a cabo la fermentación en condiciones aerobias. También se observó la influencia negativa en la producción de biomasa cuando un sustrato complejo es utilizado, esto debido a la presencia de inhibidores del metabolismo fermentativo (Tabla 2).

La concentración máxima de etanol producida fue de 1.46g/L y 1,45g/L, ambas obtenidas a las 24 horas de fermentación en condiciones microaerobias utilizando medio complejo constituido (hidrolizado de aserrín de *Curupaú*) y medio definido (mezclas D-glucosa/D-xilosa), respectivamente. Sin embargo, el mejor rendimiento fue de 0,40g de etanol producido por cada gramo de sustrato consumido en condiciones microaerobias, siendo evidente el efecto negativo de los inhibidores en la producción de etanol. No obstante, es necesario un estudio de inhibición de productos (biomasa y etanol) más detallado.

Los rendimientos de la producción de etanol respecto al rendimiento teórico (0,51 g etanol/g xilosa consumida) fueron de 52% y 79%, en medio complejo y definido, respectivamente (Tabla 4). El rendimiento de la producción de etanol cuando un medio definido es utilizado demuestra una adecuada adaptación del microorganismo en el medio, a diferencia del rendimiento de la producción de etanol en medio complejo. Esto debido a la presencia de inhibidores en el hidrolizado de aserrín de *Curupaú* como sustrato. Sin embargo, la baja

concentración de inhibidores (ácido acético, HMF y furfural) permiten contradecir la explicación planteada anteriormente, posiblemente la presencia de otros de subproductos no identificados (compuestos fenólicos y otros) coadyuven a una mayor inhibición en la producción de etanol. Una posible alternativa para resolver este problema es la detoxificación del hidrolizado mediante distintos métodos²⁴.

AGRADECIMIENTOS

A la Agencia Sueca de Desarrollo Internacional (ASDI SAREC); al Instituto de Investigación de Procesos Químicos (IIDEPROQ); y al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB) de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA).

REFERENCIAS

- Govindaswamy S, Vane LM. Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose-fermenting yeast. *Bioresour Technol.* 2007; 98: 677–685.
- Hamelinck CN, van Hooijdonk G, Faaij APC. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term. *Biomass Bioeng.* 2005; 28: 384–410.
- Zhang YHP, Lynd LR. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. *Biotechnol Bioeng.* 2004; 88 (7): 797–824.
- Saha BC. Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2003; 30: 279–291.
- Wang Y, Shi WL, Liu XY, Shen Y, Bao XM, Bai FW. Establishment of a xylose metabolic pathway in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett.* 2004; 26: 885–890.
- Lynd LR, Wyman CE, Gerngross TU. Biocommodity engineering. *Biotechnol Prog.* 1999; 15 (5): 777–793.
- Bothast RJ, Saha BC. Ethanol production from agricultural biomass substrates. *Adv Appl Microbiol.* 1997; 44: 261–286.
- Schneider H, Wang PY, Chan YK, Maleszka R. Conversion of d-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol Lett.* 1981; 3: 89–92.
- Agbogbo FK, Coward-Kelly G, Torry-Smith M, Wenger KS. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. *Process Biochem.* 2006; 41: 2333–2336.
- Sánchez S, Bravo V, Eulogio Castro E, Moya AJ, Camacho F. The fermentation of mixtures of glucose and xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. *J Chem Technol Biotechnol.* 2002; 77 (6): 641–648.
- Bothast RJ, Saha BC. Ethanol production from agricultural biomass substrates. *Adv Appl Microbiol.* 1997; 44: 261–286.
- Postma E, Scheners WA, Dijken JP. Kinetics of growth and glucose transport in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066. *Yeast.* 1989; 5:159-165.
- Quispe Rivera L. Aprovechamiento de residuos lignocelulosicos [Proyecto de Grado]. La Paz: Universidad Mayor de San Andrés; 2007.
- Hahn-Hägerdal B, Linden T, Senac T, Skoog K. Ethanol fermentation of pentoses in lignocellulose hydrolysates. *Appl Biochem Biotechnol.* 1991; 28–29: 131–144.
- Larsson S, Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B, Tengborg C, Stenberg K, Zacchi G, Nilvebrant NO. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microb Technol.* 1999; 24: 151–159.
- Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour Technol.* 2000; 74: 25–33.
- Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Larsson CU, Gorwa-Grauslund M, Görgens J, van Zyl WH. Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. *Microb Cell Fact.* 2005; 4: 31.
- Larsson S, Reimann A, Nilvebrant N-O, Jönsson LJ. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulosic hydrolysates of spruce. *Appl Biochem Biotechnol.* 1999; 77–79: 91–103.
- Hahn-Hägerdal B, Jeppsson H, Olsson L, Mohagheghi A. An interlaboratory comparison of the performance of ethanol-producing microorganisms in a xylose-rich acid hydrolysate. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1994; 41: 62–72.
- Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Fonseca C, Spencer-Martins I, Gorwa-Grauslund M. Towards industrial pentose-fermenting yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007; 74: 937–953.
- Pares I, Farras R, Juárez A. *Bioquímica de los microorganismos*. Barcelona: Reverte; 1997.
- Brown, H. Some studies on yeast. *Ann. Bot.* 1914; 28: 197-226.
- Weusthuis RA, Visser W, Pronk JT, Scheffers WA, van Dijken JP. Effects of oxygen limitation

- on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluver effect. *Microbiol.* 1994; 4: 703-15.
- 24 Grootjen, DRJ., van der Lans, RGJM y Luyben, KAM Effect of the Aeration Rate on the Fermentation of Glucose and Xylose by *Pichia stipitis* CBS 5773. *Enzy Microb Techn.* 1990; 12: 20-23.
- 25 Taherzadeh MJ, Eklund R, Gustafsson L, Niklasson C, Liden G. Characterization and fermentation of dilute-acid hydrolyzates from wood. *Ind Eng Chem Res.*1997; 36: 4659–4665.
- 26 Dellweg H, Rizzi M, Methner H, Debus D. Xylose fermentation by yeasts 3. Comparison of *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis*. *Biotechnol Lett.* 1984; 6: 395–400.
- 27 Nigam JN. Ethanol production from hardwood spent sulfite liquor using an adapted strain of *Pichia stipitis*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2000; 26: 145-150.