UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas- Departamento de Microbiologia
Programa de Pós-graduação em Microbiologia

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
Facultad de Ingeniería – Departamento de Ingeniería Química y Ambiental
Programa de Doctorado en Ingeniería-Ingeniería Química

ANGELA MARIA GARCIA ACERO

ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE LEVADURAS TRANSFORMADORAS DE XILOSA A CONDICIONES DE ESTRÉS EN HIDROLIZADOS DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR

Belo Horizonte

2022

Ángela María García Acero

ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE LEVADURAS TRANSFORMADORAS DE XILOSA A CONDICIONES DE ESTRÉS EN HIDROLIZADOS DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR

Tesis presentada al programa de doctorado en Microbiología del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad Federal de Minas Gerais y al programa de doctorado en Ingeniería Química del departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia, como requisito parcial para la obtención de los títulos de Doctora en Microbiología y Doctora en Ingeniería-Ingeniería Química.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

Coorientador: Prof. Dr. Mario Enrique Velásquez Lozano

Belo Horizonte

2022

043 Acero, Angela Maria Garcia.
Estudio de la respuesta de levaduras transformadoras de xilosa a condiciones de estrés en hidrolizados de bagazo de caña de azúcar [manuscrito] / Angela Maria Garcia Acero. – 2022.
210 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa. Coorientador: Prof. Dr. Mario Enrique Velásquez Lozano.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. E Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Programa de Doctorado en Ingeniería-Ingeniería Química.

1. Microbiologia. 2. Leveduras. 3. Fermentação. 4. Xilose. I. Rosa, Carlos Augusto. II. Lozano, Mario Enrique Velásquez. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579

Ficha Catalográfica elaborada pela bibliotecária Fabiane C M Reis CRB 6 2680

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE **ANGELA MARIA GARCIA ACERO**

Nº REGISTRO: **2017702441**

Às 14:30 horas do dia **27 de setembro de 2022**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Juan Carlos Serrato Bermudez (Universidad Nacional de Colômbia, Colômbia), Luis Alfonso Caicedo Mesa (Universidad Nacional de Colômbia, Colômbia), Fátima de Cássia Oliveira Gomes (Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET/MG), Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk (Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa (Orientador) e o Dr. Mario Enrique Velásquez Lozano (Coorientador), para julgar o trabalho final **"Estudio de la Respuesta de Levaduras Transformadoras de Xilosa a Condiciones de Estrés en Hidrolizados de Bagazo de Caña de Azúcar."** da aluna **Angela Maria Garcia Acero**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Membros da Banca:

Prof. Dr. Juan Carlos Serrato Bermudez

Prof. Dr. Luis Alfonso Caicedo Mesa

Profa. Dra. Fátima de Cássia Oliveira Gomes

Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk

De acordo:

Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

(Orientador)

Dr. Mario Enrique Velásquez Lozano

(Coorientador)

Profa. Daniele da Glória de Souza

(Coordenadora do Programa de Pós-graduação

em Microbiologia)

Documento assinado eletronicamente por **Fatima de Cassia Oliveira Gomes**, **Usuário Externo**, em 29/09/2022, às 11:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza**, **Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 29/09/2022, às 14:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk**, **Usuário Externo**, em 29/09/2022, às 14:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Carlos Augusto Rosa**, **Servidor(a)**, em 29/09/2022, às 16:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Juan Carlos Serrato Bermudez**, **Usuário Externo**, em 07/12/2022, às 12:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Luis Alfonso Caicedo Mesa**, **Usuário Externo**, em 12/12/2022, às 18:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Mario Enrique Velásquez-Lozano**, **Usuário Externo**, em 30/08/2023, às 11:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1704946** e o código CRC **8C69267C**.

Referência: Processo nº 23072.230964/2021-75 SEI nº 1704946

Declaración de obra original

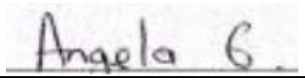
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, Figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Ángela María García Acero

Fecha 26/08/2022

A mi mamá (Francisca) por su vibra de amor,
A mi papá (Luis) por enseñarme a perseverar,
A mis hermanos (Diana, Andrés, Lised y Pedro) que siempre han creído en mí,
A mi sol (Leo) que sigue siendo mi luz intensa y cálida.

Gracias galera por ser mi red micelial

AGRADECIMIENTOS

Gostaria de agradecer sinceramente ao meu orientador da UFMG Carlos Rosa, pela confiança e acolhida no laboratório, pelo impulso para continuar nesta caminhada da biodiversidade, por compartilhar e cultivar em mim o amor pelas leveduras com seu exemplo.

Quiero brindar mis más sinceros agradecimientos a mi director de la UNAL, el profesor Mario Enrique Velásquez Lozano, quien siempre me brindó su apoyo para continuar en este intrincado camino de la cotutela, gracias por acompañarme a superar todos los obstáculos y siempre estar dispuesto a colaborar.

Ao grupo do LabLev, muito obrigada meninas pela parceria, ajuda e amizade neste momento da minha vida. Dra. Ana Raquel muitíssimo obrigada pelas palavras positivas sempre, por tudo que você me ensina por seu apoio e aportes no meu trabalho, você é uma “levedurologa” top. Gigi (Gisele), obrigada demais por ter me acolhido e apoiar minha fortaleça mental, minha parceira na corrida e na pesquisa. Flavia querida agradeço a boa disposição sempre para me ajudar, adorei o sorriso positivo até nos piores momentos da pesquisa. A Thais, Karina, Thelma, Fernanda C., Katharina, Fer Palladino, Marina, Jazmin, por sempre ter me escutado e pelas conversas acadêmicas proveitosas. A todas as pessoas que fizeram parte desse grupo só gratidão.

Gracias al grupo de bioprocesos y todas mis grandes compañeras y amigas en especial a Dianita por todos los aportes a este trabajo y Margareth por su acompañamiento en este camino de investigación y toda la cooperación. A Paolita por la ayuda y colaboración para el uso de equipos, materiales y reactivos, además de las conversaciones existenciales de la vida académica. A Paula y Fernanda por el trabajo comprometido y dedicado. A Diana Duran, Kelly, Angela y todos los compañeros con los que compartimos en algún espacio y momento.

Muito grata também com os professores Luiz Rosa y Susana Johann e seus grupos de pesquisa, pela ajuda e colaboração. A seus estudantes que sempre tiveram

a melhor atitude para me ajudar, escutar e me ensinar. A Viviane te agradeço pela conversa nas noites e o final de semana, além das caronas. Amanda, Aline, Blenda, Graci, Eldon, Livia, Lauren, Mayara, Thamar, Marina, Barbara, pessoas super de boa, e muitas outras mais.

Al director del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Aplicada del Departamento de Química profesor Pedro de Brito Brandão quien siempre me ha brindado su apoyo y ha sido parte fundamental en mi recorrido académico en la microbiología. A sus estudiantes por el acceso a sus equipos y reactivos, en especial a Diani Tamayo por su incondicional amistad ayuda y aportes.

Agradecimentos também ao professor Silvio Silvério da Silva e seu laboratório da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo – USP, pela produção e fornecimento os hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana de açúcar.

Agradecimiento especial a la dirección del Parque Natural Chicaque y a la Asociación de Protectores de los Recursos Naturales y del Ambiente de Tibacuy (APRENAT) por permitirme realizar la colecta en estos territorios. Agradezco también a Jairo Peña por sus aportes en las salidas de campo sobre botánica y el conocimiento sobre los robles.

Só gratidão com a secretaria do programa de Pós-graduação em Microbiologia, especialmente com Debora e Thiago, que sempre me ajudaram com a melhor disposição.

Un reconocimiento al grupo de tramites ambientales de la vicerrectoría de investigación de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá y en especial a Juan Pablo Rosas, por su permanente orientación, apoyo y gestión en la obtención de todos los permisos legales para el trabajo con biodiversidad en Colombia.

“Nada en la vida debe ser temido… solamente comprendido. Ahora es el momento de comprender más para temer menos”

Maria Salomea Skłodowska

RESUMEN

El uso de microorganismos como biocatalizadores para la transformación de biomasa residual ha sido estudiado en las últimas décadas. Sin embargo, dentro de los parámetros de selección de estos microorganismos la capacidad de tolerar y adaptarse a condiciones estresantes es una de las mayores limitantes para su empleo en escala industrial. Este trabajo tiene como objetivo describir la diversidad de la comunidad de levaduras transformadoras de xilosa asociadas a bosques de robles en los Andes Colombianos y estudiar la respuesta fenotípica a condiciones de estrés de levaduras no-convencionales, aisladas en ambientes naturales y fermentativos en Colombia capaces de metabolizar la D-xilosa, para su implementación en la fermentación de hidrolizados hemicelulósicos de bagazo de caña de azúcar. Para esto se realizó el aislamiento e identificación taxonómica de 175 levaduras asimiladoras de D-xilosa de bosques de robles de la región central de la cordillera oriental de los Andes en Colombia pertenecientes a 35 especies previamente conocidas y 15 posibles especies nuevas. Se observó que 75 aislados en los bosques de robles presentaron capacidad metabólica para la transformación de la D-xilosa hasta etanol o xilitol. También se evaluaron 50 levaduras de la colección Biológica Banco de Cepas y Genes del IBUN-UNAL, aislados en ambientes fermentativos en el municipio de Puerto López (Meta) y Paipa (Boyacá) de los cuales 12 presentaron capacidad para transformar D-xilosa y producir xilitol como producto principal. Se evaluó la implementación de condiciones de estrés térmico como estrategia para la preparación del inóculo en dos especies de levaduras asociadas a ambientes fermentativos, *Meyerozyma caribbica* y *Candida tropicalis*, para la fermentación de D-xilosa en medios suplementados con ácido acético. *M. caribbica* evidenció la adquisición de protección cruzada a estrés en las levaduras expuestas a 10 °C con un aumento del 29 % en la producción de xilitol frente a las células crecidas a 30 °C en la fermentación de la D-xilosa en presencia del ácido acético (6 g/L). La exposición a estrés ácido, oxidativo y térmico previo a la fermentación de hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar fue aplicado para dos levaduras aisladas en ambientes naturales, *Debaryomyeces nepalensis* y *Scheffersomyces cryptocercus/Sc. virginianus*, para la producción de xilitol y etanol, respectivamente. La respuesta fenotípica a las diferentes condiciones de estrés fue específica para cada especie y relacionada con el

direccionamiento metabólico para la transformación de la pentosa. *D. nepalensis* presentó un aumento del 32% en la producción de xilitol en comparación con las células sin tratar en fermentación del hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar (75% v/v). La estrategia de preparación del inóculo con exposición previa al estrés sumado a la fermentación en serie mejora la aptitud en *Scheffersomyces cryptocercus*/*Sc. virginianus* logrando fermentar la D-xilosa presente en el hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña sin diluir. Este es el primer trabajo realizado en la bioprospección de la diversidad de levaduras de bosques de robles en Los Andes Colombianos y los resultados demuestran el potencial para la exploración de servicios ecosistémicos no maderables presentes en estos hábitats forestales.

Palabras claves: Levaduras no-convencionales; fermentación, inhibidores, adaptación, protección cruzada.

ABSTRACT

The use of microorganisms as biocatalysts for the transformation of residual biomass has been studied in the last decades. However, within the parameters for the selection of these microorganisms, the ability to tolerate and adapt to stressful conditions is one of the greatest limitations for its use on an industrial scale. The aim of this work is to describe the diversity of the community of xylose transforming yeasts associated with oak forests in the Colombian Andes and to study the phenotypic response to stress conditions of non-conventional yeasts, isolated in natural and fermentative environments in Colombia capable of D-xylose metabolism, for its implementation in the fermentation of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysates. For this, the isolation and taxonomic identification of 175 D-xylose-assimilating yeasts from oak forests of the central region of the eastern Andes Mountain range in Colombia was carried out belonging to 35 species previously known and 15 possible new species. It was observed that 75 isolates presented the metabolic capacity for the transformation of D-xylose to ethanol or xylitol. We also evaluated 50 yeasts from the biological collection Bank of Strain and Genes of IBUN-UNAL, isolated in the municipality of Puerto López (Meta, Colombia) and Paipa (Boyacá), of which 12 have the capacity to ferment xylose and produce xylitol as the main product. The implementation of thermal stress conditions was evaluated as a strategy for the preparation of the inoculum in two yeast species associated with fermentative environments, *Meyerozyma caribbica* and *Candida tropicalis*, for the fermentation of D-xylose in media supplemented with acetic acid. *M. caribbica* showed the acquisition of cross-stress protection in yeasts exposed to 10 °C with a 29 % increase in xylitol production compared to cells grown at 30 °C in the fermentation of D-xylose in the presence of the acetic acid (6 g/L). Exposure to acid, oxidative, and thermal stress prior to fermentation of hemicellulosic hydrolysate from sugarcane bagasse was applied to two yeasts isolated in natural environments, *Debaryomyeces nepalensis* and *Scheffersomyces cryptocercus/Sc. virginianus*, to produce xylitol and ethanol, respectively. The phenotypic response to the different stress conditions was species-specific and related to metabolic wiring for pentose transformation. *D. nepalensis* showed a 32% increase in xylitol production compared to untreated cells in fermentation of diluted sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (75% v/v). The inoculum preparation strategy with prior

stress exposure coupled with serial fermentation improves fitness in *Scheffersomyces cryptocercus/Sc. virginianus*, achieving fermenting the D-xylose present in the sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate undiluted. This is the first work carried out on the bioprospecting of the yeast diversity from oak forests in the eastern Andes Mountain range (Colombia) and the results demonstrate the potential for the exploration of non-timber ecosystem services present in these forest habitats.

Keywords: Non-conventional yeasts; fermentation, inhibitors, adaptation, cross-protection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Enfoque conceptual de Biorrefinerías (Basado en Chandel et al., 2018: Dahmen et al., 2018; Kumar & Verma, 2021) 29

Figura 2. Componentes principales de la biomasa lignocelulosa. (Adaptado de Dahmen et al., 2018) 32

Figura 3. Hidrólisis del material lignocelulósico y los principales compuestos inhibidores generados. MGX: O-acetil-4-O-metilglucuronoxilanos; AGX: arabino-4-O-metilglucuronoxilanos. En cuadros rojos los principales monosacáridos presentes en los hidrolizados: glucosa y D-xilosa. (Adaptado Barros et al., 2020) 37

Figura 4. Ruta metabólica de oxido-reducción en levaduras transformadoras de D-xilosa. XR: xilosa reductasa; XDH: xilitol deshidrogenasa; XKS: xiluloquinasa; PDC: piruvato descarboxilasa; ADH: alcohol deshidrogenasa; ALD: aldehído deshidrogenasa; ACS: acetil-CoA sintasa (Basado en Kwak et al., 2019; Ruchala & Sibirny, 2021; Umai et al., 2022)..... 41

Figura 5. Parámetros de a) consumo de D-xilosa y b) productividad de etanol en la fermentación de levaduras en medio nutritivo (YPX, 5% de xilosa) e hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña (basado en datos publicados por Cadete, et al., 2012, Cadete, et al., 2017b; Morales, et al., 2014) 48

Figura 6. Principales vías de señalización para mantener la homeostasis celular. Regulaciones positivas (flechas) y negativas (líneas T). (Tomada y adaptada de Lin et al., 2021) 49

Figura 7. Georreferenciación de puntos de colecta por transectos. a) Colecta de 28 muestras en Parque Natural Chicaque. b) Colecta de 30 muestras en Parque Natural Cerro de Quínini. (adaptado de Palacio-Mejía, 2013)..... 61

Figura 8. Número de asilados de levaduras obtenidos en los diferentes medios de aislamiento..... 68

Figura 9. Porcentaje de especies pertenecientes a los géneros identificados para las levaduras aisladas en ecosistemas de bosques de robles. 69

Figura 10. Comparación de rarefacción basada en el tamaño de la muestra (línea continua) y extrapolación (línea discontinua, el doble del tamaño de la muestra) para un orden q=0 de la riqueza de especies en dos reservas naturales de bosques de robles (PN Cerro de Quínini y PN Chicaque). El área sombreada representa los intervalos de confianza del 95% obtenidos mediante el método bootstrap sobre la base de 999 repeticiones. 70

Figura 11. Distribución de especies aisladas en dos ecosistemas de bosques de robles (a) por localidad de muestreo y fuente de carbono (b) (CQ= PN. Chicaque; Qn= PN. Cerro de Quínini; X= D-xilosa; Xn= xilano) 71

Figura 12. Especies de levaduras productoras de etanol a partir de la fermentación en medio YPX-4%. Concentración de etanol determinada a partir del ensayo enzimático. 87

Figura 13. Especies de levaduras productoras de xilitol a partir de la fermentación en medio YPX-4%. Concentración de xilitol determinada a partir de HPLC. 88

Figura 14. Inhibición en el crecimiento de linajes productores de etanol en medio con hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (50%). ($\mu_{max\ Hidrolizado\ 50\%}$ / $\mu_{max\ YPX}$) 106

Figura 15. Inhibición en el crecimiento de linajes productores de xilitol en medio con hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (50%). ($\mu_{max\ Hidrolizado\ 50\%}$ / $\mu_{max\ YPX}$) 107

Figura 16. Producción de biomasa, consumo de D-xilosa y producción de etanol por especies fermentadoras de D-xilosa *P. membranifaciens* (CQ7.1X), *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X), *Sc. illinoinensis* (CQ6.1Xn; Qn25.3Xn) y *Sp. passaliadarum* (NRRL-Y 27907) en medio YPX-2% (a), (c) y (e) e de hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido 50% (b), (d) y (f). 110

Figura 17. pH final en el proceso de fermentación de levaduras productoras de etanol, D-xilosa *P. membranifaciens* (CQ7.1X), *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X), *Sc. illinoinensis* (CQ6.1Xn; Qn25.3Xn) y *Sp. passaliadarum* (NRRL-Y 27907) en medio YPX y medio hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (50%). La línea verde es el valor de pH inicial del medio de fermentación. 113

Figura 18. Producción de biomasa, consumo de D-xilosa y producción de xilitol por especies transformadoras de D-xilosa *Wickerhamomyces* sp. (CQ16.3Xn), *Sc. amazonensis* (Qn22.1X), *D. nepalensis* (Qn6.3Xn), *Sc. coipomensis* (CQ10.2X) y *C. tropicalis* (FTI-20037) en medio YPX-2% (a), (c) y (e) y hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (50%) (b), (d) y (f). 115

Figura 19. pH final en el proceso de fermentación de levaduras productoras de xilitol, *Wickerhamomyces* sp. (CQ16.3Xn), *Sc. amazonensis* (Qn22.1X), *D. nepalensis* (Qn6.3Xn), *Sc. coipomensis* (CQ10.2X) y *C. tropicalis* (FTI-20037) en medio YPX e hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (50%), n=3. Línea verde: pH inicial del medio. 120

Figura 20. Matriz de correlación de los parámetros cinéticos de crecimiento y productividad de levaduras aisladas de bosques de robles productoras de (a) etanol y (b) xilitol 121

Figura 21. Biplot del análisis por componentes principales (PCA) de los parámetros y los linajes productores de etanol aislados en bosques de robles en HHBA (50%) (1-5) (elipse rosada) y medio YPX-2 % (6-10) (elipse azul). 122

Figura 22. Biplot del análisis por componentes principales (PCA de los parámetros y los linajes productores de xilitol aislados en bosques de robles en medio con hidrolizado diluido (50%) (1-5) y medio YPX (6-10)..... 123

Figura 23. Dendograma de los linajes productores de (a) etanol (*P. membranifaciens* (CQ7.1X); *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X); *Sc. illinoinensis* (CQ6.1Xn; Qn25.3Xn) y *Sp. passaliadarum* (NRRL-Y 27907)) y (b) xilitol (*Wickerhamomyces* sp. (CQ16.3Xn); *Sc. amazonensis* (Qn22.1X); *D. nepalensis* (Qn6.3Xn); *Sc. coipomensis* (CQ10.2X) y *C. tropicalis* (FTI-20037)) en los medios de fermentación implementados (YPX, Hidro=medio con hidrolizado diluido (50%)), método Ward. D. 124

Figura 24. Boxplot para la descripción de cada grupo en el a) producción de etanol; b) rendimiento, c) productividad de etanol y d) Eficiencia. 125

Figura 25. Boxplot para la descripción de caga grupo en el a) producción de xilitol; b) rendimiento, c) productividad de xilitol y d) Eficiencia..... 126

Figura 26. Inhibición del crecimiento de linajes productores de xilitol, aisladas en ambientes fermentativos, en presencia de hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (50%). ($\mu_{max\ Hidrolizado\ 50\%}$ / $\mu_{max\ YPX}$)..... 132

Figura 27. Fermentación discontinua con medio suplementado con D-xilosa (5 %) y ácido acético 2 g/L por *Meyerozyma caribbica* UN113-3 (cepa IBUN-03558) a) producción de xilitol, c) biomasa y *Candida tropicalis* UN116-3 (IBUN-03565) b) producción de xilitol, d) biomasa. Se utilizaron tres condiciones de temperatura para la preparación del inóculo. El Control fue medio sin ácido acético y la condición para la preparación del inóculo fue 30 °C..... 143

Figura 28. Producción de xilitol a partir de fermentación discontinua con medio suplementado con D-xilosa (5 %) y ácido acético 6 g.L-1 por a) *Meyerozyma caribbica* UN113-3 (IBUN-03558) y, b) *Candida tropicalis* UN116-3 (IBUN-03565). Se utilizaron tres condiciones de temperatura para la preparación del inóculo. Medias con * son significativamente diferentes (p > 0,05) 145

Figura 29. Consumo de D-xilosa y formación de xilitol a partir de la fermentación discontinua con medio suplementado con D-xilosa (5 %) y ácido acético 6 g/L por *Meyerozyma caribbica* (cepa IBUN-03558) a) Consumo de D-xilosa (*círculo, línea continua*) y producción de biomasa (*círculo, Linea discontinua*); b) Consumo de ácido acético (*círculo, línea continua*) y producción de glicerol (*círculo, línea discontinua*). Se utilizaron tres condiciones de temperatura para la preparación del inóculo. El Control fue medio sin ácido acético y la condición para la preparación del inóculo fue 30 °C. 147

Figura 30. pH final de la fermentación discontinua con medio suplementado con D-xilosa (5%) y ácido acético 2 g/L y 6 g/L por a) *Meyerozyma caribbica* (IBUN-090-03558) y, b) *Candida tropicalis* (IBUN- 090-03565). Se utilizaron tres condiciones de temperatura para la preparación del inóculo. 149

Figura 31. Producción de xilitol por *D. nepalensis* (Qn6.3Xn) a partir de fermentación discontinua en medio con hidrolizado de bagazo de caña de azúcar diluido (75%) suplementado con extracto de levadura y peptona, en cuatro condiciones de preparación de inóculo. El medio YPX fue utilizado como control (Cuadrado negro). Medias con * son significativamente diferentes (test Tukey) 152

Figura 32. Fermentación discontinua por *D. nepalensis* (Qn6.3Xn) en medio con hidrolizado de bagazo de caña de azúcar diluido (75%) suplementado con extracto de levadura y peptona, a) Consumo de D-xilosa; b) producción de biomasa; y c) consumo de ácido acético, en cuatro condiciones de preparación de inóculo. El medio YPX se usó como control (D-xilosa 5%)..... 154

Figura 33. pH final de la fermentación de D-xilosa por *D. nepalensis* (Qn6.3Xn) en medio con hidrolizado de bagazo de caña de azúcar diluido (75%) suplementado con extracto de levadura y peptona, en cuatro condiciones de preparación de inóculo.157

Figura 34. Fermentación serial por *D. nepalensis* (Qn6.3Xn) en medio con hidrolizado de bagazo de caña de azúcar suplementado con extracto de levadura y peptona, a) producción de biomasa; y b) consumo de D-xilosa, glucosa, ácido acético y producción de xilitol y etanol. 158

Figura 35. Producción de etanol por *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X) a partir de fermentación discontinua en medio con hidrolizado de bagazo de caña de azúcar diluido (75%) suplementado con extracto de levadura y peptona, en cuatro condiciones de preparación de inóculo. El medio YPX fue utilizado como control (Cuadrado negro). Medias con * son significativamente diferentes (test Tukey).... 159

Figura 36. Fermentación discontinua por *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X) en medio con hidrolizado de bagazo de caña de azúcar diluido (75%) suplementado con extracto de levadura y peptona, a) Consumo de D-xilosa; b) producción de biomasa; y c) consumo de ácido acético, en cuatro condiciones de preparación de inóculo..... 161

Figura 37. pH final de la fermentación de D-xilosa por *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X) en medio con hidrolizado de bagazo de caña de azúcar diluido (75%) suplementado con extracto de levadura y peptona, en cuatro condiciones de preparación de inóculo. 165

Figura 38. Fermentación serial por *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X) en medio con hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar suplementado con extracto de levadura y peptona, a) producción de biomasa; y b) consumo de D-xilosa, glucosa, ácido acético y producción de xilitol y etanol de las células expuestas a ácido tartárico provenientes de la fermentación de hidrolizado hemicelulósico diluido (75%). 166

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Identificación molecular de levaduras y frecuencia de aislados por muestra y local de colecta. 73

Tabla 2. Identificación de nuevas especies aisladas en bosques de robles en la región central de la cordillera oriental de los Andes Colombianos. 84

Tabla 3. Parámetros de fermentación de levaduras aisladas en bosques de robles y *Sp. passalidarum* (NRRL-Y 27907) en medio YPX-5%. 100

Tabla 4. Parámetros de fermentación de levaduras productoras de etanol aisladas en bosques de robles en medio YPX-2% y medio HHBA (50%) (D-xilosa 2 %, ácido acético 3 g/L) 112

Tabla 5. Parámetros de fermentación de levaduras productoras de xilitol, aisladas en bosques de robles, en medio YPX-2% y medio HHBA (50%) (D-xilosa 2%; ácido acético 3 g/L). 118

Tabla 6. Identificación de levaduras productoras de xilitol aisladas en ambientes fermentativos de caña de azúcar y bebidas tradicionales en las dos temporadas climáticas del año. 128

Tabla 7. Parámetros de fermentación de levaduras productoras de xilitol aisladas en ambientes fermentativos en medio YPX (D-xilosa 4 %) 130

Tabla 8. Rendimiento y productividad para la producción de xilitol a partir de un medio suplementado con D-xilosa (5%) y ácido acético (6 g/L) por levaduras de *C. tropicalis* y *M*. *caribbica* aisladas en ambientes fermentativos (1g/L inóculo)..... 150

Tabla 9. Parámetros de fermentación para la producción de xilitol por *D. nepalensis* (Qn6.3Xn) en medio con hidrolizado de bagazo de caña de azúcar diluido (75%) suplementado con extracto de levadura y peptona. El medio YPX-5% se usó como control. 156

Tabla 10. Parámetros de fermentación para la producción de etanol por *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X) en medio con hidrolizado de bagazo de caña de azúcar diluido (75%) suplementado con extracto de levadura y peptona..... 163

LISTA DE ABREVIATURAS

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI
t	Tonelada	1000kg
ha	Hectárea	10000 m^2
g	gramo	
kg	Kilogramo	10^3 g
L	Litro	10^{-3} m^3
mL	Mililitro	10^{-6} m^3
gal	Galón	3.79 L
m	Metro	
mm	Milimetro	10^{-3} m
nm	Nanometro	10^{-9} m
cm	Centímetro	10^{-2} m
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar	m
h	hora	3600s
min	minutos	60s
°C	Grados Celsius	
mM	Milimolar	
$Y_{P/S}$	Rendimiento producto	g/g
$Y_{X/S}$	Rendimiento biomasa	g/g
Qp	Productividad volumétrica	g/L/h
X g	gravedades	g
mV	Milivoltios	mV

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término
µl	Microlitro
µmax	Tasa de crecimiento específica máxima
η	Eficiencia

Abreviatura	**Término**
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ATP	Adenosín trifosfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
PN	Parque Natural
Sc.	*Scheffersomyces*
S.	*Saccharomyces*
HHBA	Hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar
TRIS-HCl	Buffer tris (hidroximetil) aminometano
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HMF	5-hidroximetilfurfural
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótida
NAD^+	Nicotinamida adenina dinucleótido
XR	Xilosa reductasa
XDH	Xilitol deshidrogenasa
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
rpm	Revoluciones por minuto
IBUN	Instituto de Biotecnologia- Universidad Nacional
UNAL	Universidad Nacional de Colombia
UFMG	Universidad Federal de Minas Gerais

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN 23

CAPITULO 1: Contexto y Justificación 28

1.1 ESTADO DEL ARTE 28

1.1.1 Biorrefinería lignocelulósica 28

1.1.2 Levaduras transformadoras de D-xilosa 38

1.1.3 Respuesta al estrés celular 48

1.2 OBJETIVOS 56

1.2.1 OBJETIVO GENERAL 56

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: 56

CAPITULO 2: Diversidad de levaduras transformadoras de D-xilosa asociadas a bosques de robles en la región central de la cordillera oriental de los Andes Colombianos 57

2.1 Materiales y Métodos 59

2.1.1 Muestreo 59

2.1.2 Medio y condiciones de cultivo para aislamiento 61

2.1.3 Caracterización molecular de levaduras aisladas de bosques de robles en la región central de la cordillera oriental de Colombia 62

2.1.4 Tamizaje de levaduras transformadoras de D-xilosa 66

2.2 Resultados y Discusión 67

2.2.1 Aislamiento de levaduras asociadas a bosques de robles en la región central de la cordillera oriental de Los Andes de Colombia 67

2.2.2 Caracterización molecular de la diversidad de levaduras asociadas a ecosistemas de bosques de robles en los Andes Colombianos 69

2.2.3 Tamizaje de levaduras con potencial para la conversión de D-xilosa 87

2.3 Conclusiones 91

CAPITULO 3: Potencial de levaduras aisladas en Colombia para producción de etanol o xilitol a partir de D-xilosa proveniente de hidrolizados hemicelulósicos de bagazo de caña de azúcar 92

3.1 Materiales y Métodos 95

3.1.1 Ensayo de fermentación de D-xilosa en medio nutritivo por levaduras aisladas en bosques de robles 95

3.1.2 Fenotipaje de tolerancia a hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar (HHBA) diluido (50%) 96

3.1.3 Ensayo de fermentación de D-xilosa en hidrolizado hemicelulósico de bagazo de azúcar (HHBA, 50% v/v) por levaduras aisladas en bosques de robles 97

3.1.4 Ensayo de fermentación de D-xilosa en medio nutritivo por levaduras asociadas a ambientes fermentativos de Colombia 98

3.2 Resultados y Discusión 100

3.2.1 Fermentación de D-xilosa por levaduras aisladas en bosques de robles en la cordillera oriental de los Andes Colombianos 100

3.2.2 Tolerancia de levaduras aisladas en bosques de robles a hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar (HHBA, 50%) 105

3.2.3 Selección de linajes tolerantes a condiciones de estrés en hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar 120

3.2.4 Fermentación de D-xilosa por levaduras aisladas en ambientes fermentativos 127

3.3 Conclusiones 133

CAPITULO 4: Respuesta fenotípica de levaduras trasformadoras de D-xilosa a condiciones de estrés en hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar 135

4.1 Materiales y Métodos 138

4.1.1 Ensayos de fermentación de levaduras productoras de xilitol aisladas en ambientes fermentativos en condiciones de estrés ácido y térmico 138

4.1.2 Ensayos de fermentación de levaduras productoras de xilitol y etanol aisladas en bosques de robles en condiciones de estrés en hidrolizados hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar (HHBA) 139

4.1.3 Métodos Analíticos 140

4.1.4 Métodos estadísticos 140

4.2 Resultados y Discusión 142

4.2.1 Respuesta fenotípica de levaduras productoras de xilitol aisladas en ambientes fermentativos a condiciones de estrés ácido y térmico 142

4.2.2 Respuesta fenotípica de levadura productora de xilitol aislada en bosques de robles a condiciones de estrés en hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar 151

4.2.3 Respuesta fenotípica de levadura productora de etanol aislada en bosques de robles a condiciones de estrés en hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar 159

4.3 Conclusiones 168

CAPITULO 5: Recomendaciones 170

REFERENCIAS 171

Anexo A. Agrupamiento molecular 201

Anexo B. Método enzimático oxidasa-peroxidasa 202

Anexo C. Composición hidrolizados hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar 203

Anexo D. Parámetros de crecimiento 204

Anexo E. Lista de linajes de la colección IBUN-UNAL aislados de ambientes fermentativos 205

Anexo F. Fenotipaje de levaduras no-convencionales en ácidos orgánicos 207

Anexo G. Parámetros de fermentación 208

INTRODUCCIÓN

Dentro del contexto de la bioeconomía como alternativa de transición de los sistemas productivos actuales hacia prácticas que mitiguen el impacto ambiental, disminuyendo tanto la generación de desechos como el consumo de combustibles fósiles, las biorrefinerías toman relevancia tanto en el ámbito industrial como científico (Singh et al., 2022).La cadena de las biorrefinerías puede proveer un portafolio amplio de productos de base biológica, además de productos similares a los fabricados en las refinerías de petróleo (Kumar & Verma, 2021). Varias son las consideraciones al establecer estos sistemas, principalmente el potencial de la fuente de la biomasa a ser utilizada (Schröder et al., 2018), que debe ser evaluada en cuatro niveles: el potencial teórico —máxima cantidad de biomasa disponible a nivel mundial o en un sistema dado; el potencial técnico — fracción del potencial teórico que es aprovechable bajo las condiciones tecnológicas actuales (técnicas de cosecha, infraestructura y accesibilidad, técnicas de procesamiento, uso de tierra y restricciones ecológicas); el potencial económico — segmento del potencial técnico, que cumple con los criterios de rentabilidad económica dentro de las condiciones tecnológicas consideradas; y, por último, el potencial de implementación — fracción del potencial económico que puede implementarse dentro de un periodo determinado y bajo un contexto concreto (sociopolítico, limitaciones institucionales y sociales e incentivos políticos) — (IPCC, 2007).

La biomasa es todo recurso renovable derivado de materia orgánica de origen animal o vegetal, existente en la naturaleza o generada por el hombre y/o los animales (Ferreira et al., 2018), es decir deriva de organismos vivos y proviene de diferentes fuentes como la agricultura, los bosques y los desechos orgánicos (WBA, 2016). Este material se distribuye en todo el mundo, pero varía espaciotemporalmente en su disponibilidad de acuerdo con la actividad agrícola y agroindustrial de cada región, presentando potencial para su uso como materia prima alternativa en la obtención de una variedad de bioproductos de interés industrial (Andrade et al., 2021). Alrededor de 4600 millones de toneladas de residuos de biomasa lignocelulósica se producen como residuos agrícolas, de los cuales solo un 25% se usan de forma intensiva (Dahmen et al., 2018). La vocación agrícola de América del Sur genera grandes cantidades de residuos. En la agroindustria de la caña de azúcar Brasil y Colombia

son productores mundiales de azúcar, con una participación del 26.8% y 1.3%, respectivamente (Asocaña, 2022). Además, para el año 2021 se obtuvo una producción de 7,430 y 105 millones de galones de bioetanol de primera generación a partir de este cultivo en Brasil y Colombia, respectivamente (RFA, 2022; Asocaña, 2022). Brasil es el principal productor de azúcar y segundo productor de etanol, con una producción estimada en la zafra 2022/2023, de alrededor de 572.9 millones de toneladas de caña de azúcar (Conab, 2022); Colombia ocupa la posición 14 en la producción mundial de azúcar y en el 2020 se alcanzó una producción de 24.3 millones de toneladas de caña de azúcar (Asocaña, 2022). Estas cifras son relevantes si se considera que después del procesamiento de la caña, el residuo fibroso del tallo se genera en una relación de aproximadamente 30 t por cada 100 t de caña de azúcar (Mahecha, 2021). Este tipo de residuo agroindustrial representa un gran potencial como materia prima para la industria de las biorrefinerías por su bajo costo y disponibilidad. En América del Sur la caña de azúcar es el producto básico más importante por volumen, producido principalmente por Brasil y Colombia (Magalhães et al., 2019) y es esencialmente biomasa lignocelulósica, es decir, aquella que está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina.

Para la transformación de los componentes principales del material lignocelulósico, las plataformas de biorrefinerías han integrado diversas tecnologías de conversión, como la termoquímica, la bioquímica y el crecimiento de microorganismos para obtener productos de valor agregado (Banu, 2021). Este enfoque de integración en estos sistemas de producción permite la maximización del uso de la biomasa y superan las restricciones de eficiencia y costos de conversión (Singh et al., 2022). Las biorrefinerías lignocelulósicas requieren múltiples pasos de procesamiento para separar la lignina recalcitrante de la celulosa y la hemicelulosa y convertir los productos intermedios en productos de valor (Dahmen et al., 2018). Este proceso de fraccionamiento es clave en el éxito de estos sistemas productivos, pues debe garantizar la utilización efectiva de cada uno de los componentes de la biomasa. Sin embargo, compuestos tóxicos indeseables (como compuestos fenólicos, derivados de furano y ácidos débiles, entre otros), también son generados durante el proceso de hidrólisis del material lignocelulósico, lo que genera inhibición en el proceso de fermentación microbiana posterior (Hou et al., 2018), comprometiendo su desempeño en la bioconversión de la biomasa.

El uso de microorganismos con capacidad para metabolizar y convertir diferentes tipos de fuentes de carbono, capaces de proporcionar un alto rendimiento y productividad incluso en medios que contienen compuestos inhibidores derivados de la biomasa, podría ser una solución para mejorar la viabilidad económica de las biorrefinerías (Yamakawa et al., 2020). Las levaduras han sido implementadas como catalizadores en distintos bioprocesos debido a sus propiedades metabólicas, la robustez y la resistencia contra el bajo pH, la alta presión osmótica y a la infección por fagos (Kwak et al., 2019). No obstante, las levaduras tradicionalmente usadas en los procesos fermentativos industriales no poseen la capacidad de fermentar azúcar de cinco carbonos (pentosas). Levaduras no-convencionales o levaduras no *Saccharomyces* han despertado el interés como biocatalizadores porque poseen características que podrían ser útiles para su aplicación en hidrolizados lignocelulósicos como la capacidad de metabolizar sustratos complejos, así como soportar alta osmolaridad y temperatura (Yamakawa et al., 2020). Sin embargo, su potencial en condiciones de proceso aún se encuentra poco estudiado.

En estas plataformas de bioconversión se requiere entonces la implementación de levaduras capaces de fermentar pentosas y resistir la presencia de los inhibidores generados en los hidrolizados. Consecuentemente, la importancia de estudiar levaduras aisladas de ambientes naturales radica en la capacidad de adaptación que por variación natural (polimorfismos) estas han adquirido (Stuecker et al., 2018). Este objetivo ha sido planteado en los trabajos realizados por los grupos de investigación del Laboratorio de Taxonomía, Biodiversidade e Biotecnología de Fungos de la Universidade Federal de Minas Gerais y el Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Nacional de Colombia, en función de la búsqueda de microorganismos potenciales para la transformación de biomasa y con resistencia a las condiciones de proceso.

Por lo anteriormente expuesto, este trabajo aporta en el avance del estudio de la respuesta fenotípica de levaduras fermentadoras de D-xilosa, aisladas en ambientes naturales y fermentativos en Colombia a condiciones de estrés para la transformación de la D-xilosa presente en hidrolizados hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar, empleando estrategias de cultivo y fermentación serial para mejorar

la tolerancia y desempeño en el proceso de bioconversión de D-xilosa proveniente de biomasa residual.

Para la presentación de este trabajo de investigación el documento se encuentra divido en cinco capítulos. En el primer capítulo se construyó el soporte teórico desde una extensa revisión bibliográfica estableciendo las oportunidades y desafíos para la implementación de biorrefinerías a partir de biomasa lignocelulósica, la importancia del proceso de selección de levaduras como biocatalizadores para esta industria, considerando los componentes principales de este tipo de materia prima y los efectos inhibitorios que pueden traer algunos de ellos para las levaduras afectando en el rendimiento del proceso, así como, los avances sobre el estudio de la respuesta a estrés celular presente en algunas levaduras de interés biotecnológico. Esta construcción del estado del arte permitió establecer los objetivos y la estrategia que se desarrolló en el presente trabajo.

El segundo capítulo describe la biodiversidad y potencial de levaduras transformadoras de D-xilosas aisladas en ambientes naturales. Se reportan para dos ecosistemas de bosques de robles ubicados en la región central de la cordillera oriental de los Andes Colombianos 35 especies ya descritas en la literatura, pertenecientes a 20 géneros y 15 posibles especies nuevas pertenecientes a los géneros *Candida, Ogatea, Pichia, Wickerhamomyces*, *Scheffersomyces, Sugiyamaella, Fibulobasidium* y *Tremella*,. *Schefersomyces* se presenta como un género de levaduras promisorias presente en la biodiversidad microbiana de Colombia para la producción de etanol y xilitol. El estudio de la diversidad de levaduras fue realizado bajo el marco legal del CONTRATO MARCO DE ACCESO A RECURSOS GENÉTICOS Y SUS PRODUTOS DERIVADOS No. 121. De 2016 – Otrosí No 8 de 2018 – RGE-152-8 firmado entre la Universidad Nacional de Colombia y el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Colombia, permiso de colecta mediante la Resolución 1012 de 2019 y los permisos de exportación de especímenes no CITES N° 1772, N° 2789 y N° 2790 emitidos por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA).

El capítulo tres describe el desempeño fermentativo de levaduras productoras de etanol y xilitol aisladas en bosques de robles y evalúa la tolerancia a las condiciones

del hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (50% v/v), mediante análisis estadístico multivariado, usando la prueba de análisis de componentes principales y análisis de conglomerados jerárquicos, incluyendo parámetros de fermentación y crecimiento de las levaduras. Asimismo, se expone el potencial de especies aisladas de ambientes fermentativos en zona rural del municipio de Puerto López (Meta) y bebidas fermentadas del municipio de Paipa (Boyacá) para la producción de xilitol como producto principal en procesos de fermentación de la D-xilosa.

En el cuarto capítulo se detalla la implementación de una estrategia de cultivo para dos linajes asociados a ambientes fermentativos de las especies *Meyerozyma caribbica* y *Candida tropicalis*, para evaluar la adquisición de adaptación cruzada a condiciones de estrés ácido en medio nutritivo. Además, para dos linajes de las especies *Debaryomyeces nepalensis* y *Scheffersomyces cryptocercus/Sc. virginianus* aislados en ambientes naturales en bosques de robles, se evaluaron como estrategia de cultivo la exposición previa a condiciones leves de estrés térmico, ácido y oxidativo, seguido de fermentación serial con hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar a escala de laboratorio. En el último capítulo se establecen las recomendaciones concernientes a los resultados de este trabajo de investigación.

CAPITULO 1: Contexto y Justificación

1.1 ESTADO DEL ARTE

1.1.1 Biorrefinería lignocelulósica

En la actualidad sistemas de desarrollo económico sostenibles han sido una prioridad en el marco internacional y nacional, derivado esto de los impactos al ambiente que se generan por los sistemas de producción actuales, así como la disminución de las reservas de petróleo (Cho et al., 2020). El uso eficiente y sostenible de los recursos de biomasa (cultivos y residuos), producida en enormes cantidades principalmente a través de la fotosíntesis (Chandel et al., 2018), pueden ser mejorados por el uso de procesos de biorrefinería para generar productos de base biológica que contribuya al desarrollo de la economía circular futura (Galbe & Wallberg, 2019). En las biorrefinerías como un equivalente a la industria petroquímica, la biomasa es procesada de manera sostenible para la obtención de bioproductos comercializables (químicos, materiales) y bioenergía (biocombustibles, energía, calor) (Chandel et al., 2018; Galbe & Wallberg, 2019; Andrade et al., 2021).

La cadena del proceso de biorrefinería se encuentra estrechamente ligada a la variabilidad en la estructura de la biomasa en función de la fuente, así como su estructura compleja y recalcitrante. El procesamiento de la biomasa lignocelulósica requiere descomponer la estructura recalcitrante separando los componentes (refinación primaria) y los pasos posteriores de conversión y procesamiento (refinación secundaria) (Dahmen et al., 2018; Kumar & Verma, 2021). El enfoque de biorrefinerías involucra procesos de múltiples pasos (Figura 1) el cuál inicia después de la selección de la biomasa que servirá como materia prima para el proceso. El primer paso es el pretratamiento de la biomasa, que contiene los precursores para la transformación y obtención de productos de valor agregado, esto con el fin de hacerla más susceptible para el procesamiento posterior. Seguido del pretratamiento, los componentes de la biomasa son sometidos a tratamientos químicos, físicos y/o biológicos que pueden ser combinados. Los productos resultantes de este paso pueden ser utilizados como bloques de construcción química para obtener una amplia variedad de productos que presuponen procesos específicos para cada producto de valor agregado.

Factores importantes para el desarrollo de plataformas de biorrefinerías lignocelulósicas se han centrado en el manejo y transporte de las materias primas que impacta los costos de producción. Por lo anterior es primordial en este concepto productivo la disponibilidad de biomasa, que incluye el suministro durante todo el año, acceso a biomasa de tipo similar para poder operar una biorrefinería dentro de un rango estrecho de condiciones operativas, una cadena de suministro, instalaciones de almacenamiento para que sea posible una operación continua, mecanización de procesos, transferencia de datos de laboratorio a pequeña escala a datos de diseño de ingeniería; y madurez técnica en las tecnologías existentes para el proceso (Galbe & Wallberg, 2019). Por lo tanto, construcción de biorrefinerías en regiones con alta productividad de biomasa, como África y América Latina, y la exportación de materiales e intermedios de base biológica procesados podrían ayudar a fortalecer la situación económica en estas áreas y reducir los impactos ambientales a través del transporte de biomasa, siempre que la demanda del mercado permanezca estable (Dahmen et al., 2018). Las biorrefinerías pueden proporcionar una cartera de compuestos a partir de fuentes biogénicas que funcionan como componentes básicos para la producción de productos químicos de alto valor. El desafío es crear modelos comerciales viables para productos de base biológica, adaptar plantas y sistemas de planta para optimizar las funcionalidades disponibles.

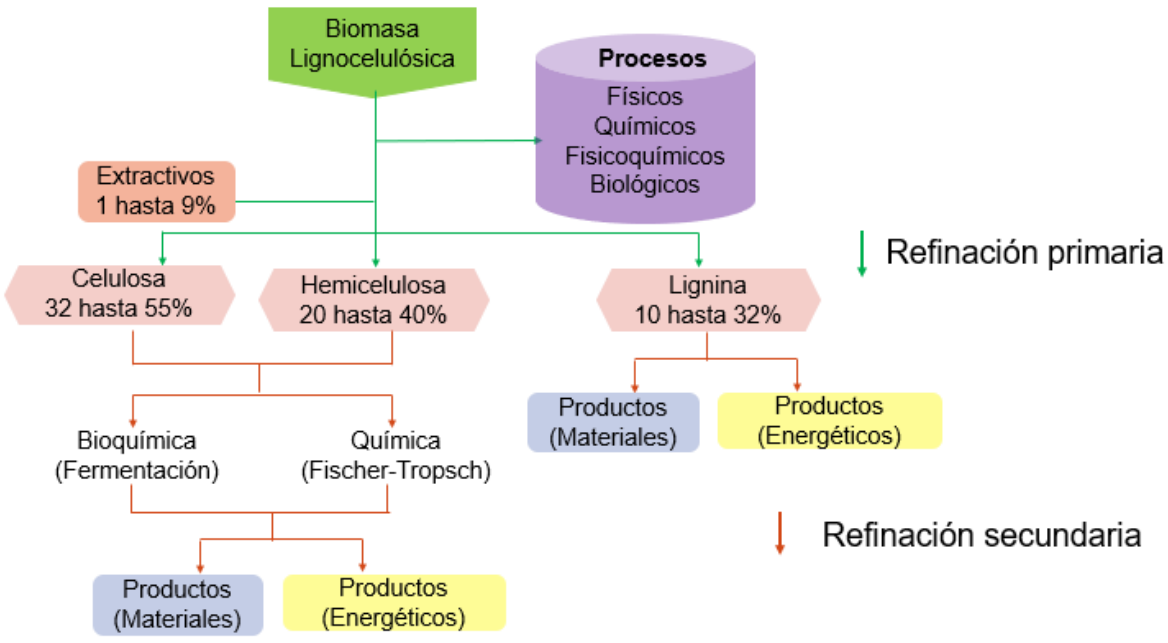


Figura 1. Enfoque conceptual de Biorrefinerías (Basado en Chandel et al., 2018: Dahmen et al., 2018; Kumar & Verma, 2021)

Los productos de base biológica que se pueden generar en estas plataformas a partir de biomasa (vegetal, animal, microorganismos, residual), han sido clasificados en energéticos y no energéticos (bioquímicos, materiales). Los principales productos energéticos pueden encontrarse en estado sólido (los gránulos), líquidos (los bioaceites, el bioetanol, el biobutanol) y gaseosos (el biogás, el gas de síntesis y el biohidrógeno) (Kumar & Verma, 2021). La generación de productos bioquímicos se deriva de los componentes químicos básicos de la biomasa que son moléculas con diferentes grupos funcionales y que pueden transformarse en una nueva familia de productos químicos de valor agregado, como azúcares, alcoholes, glicerol, ácidos orgánicos, poliésteres, resinas y solventes entre otros.

La biomasa lignocelulósica ha sido propuesta como una potencial fuente para producir energía y productos de valor agregado, esto fundamentado en la tasa de producción y en su bajo costo (De Bhowmick et al., 2018). La biomasa lignocelulósica es el recurso más abundante disponible para la generación de productos químicos y combustibles, con un estimado de 181.5 mil millones de toneladas producidas anualmente (Paul & Dutta, 2018). De los 8.2 billones de toneladas que se utilizan actualmente como forraje o con fines energéticos y materiales, alrededor de 7 billones de toneladas se producen a partir de tierras dedicadas para la agricultura, el pasto y los bosques y otros 1.2 billones de toneladas provienen de residuos agrícolas (Dahmen et al., 2018). Por lo anterior, el esquema de biorrefinerías lignocelulósicas ha demostrado un potencial promisorio, sumado a esto presenta capacidad de acoplarse a un amplio rango de materias primas de bajo costo (paja, juncos, hierba, madera, desechos de papel, desechos agrícolas etc.) que podrían generar productos de bioconversión tanto para el mercado existente petroquímico y el futuro mercado de productos de base biológica (Galbe & Wallberg, 2019).

La biomasa lignocelulósica se puede utilizar en dos tipos principales de biorrefinerías: de gas de síntesis y conversión bioquímica. Las biorrefinerías de syngas son menos sensibles a las cualidades de la biomasa y están relativamente avanzadas técnicamente, pero requieren inversiones altas y las instalaciones a gran escala para ser económicamente factibles (Dahmen et al., 2018). La bioconversión requiere múltiples pasos de procesamiento para separar la lignina recalcitrante de la celulosa y la hemicelulosa y convertir los productos intermedios en productos valiosos

(Lask et al., 2019). Los procesos de refinación para las fracciones de lignina y hemicelulosa de alta calidad aún deben ser desarrollados (Guo et al., 2018). La viabilidad económica de esta biorrefinería estaría inclinada por la bioconversión eficiente de los tres componentes principales de la biomasa lignocelulósica, es decir, celulosa, hemicelulosa y lignina para la producción de bioquímicos y biocombustibles (Singh et al., 2022). Este intenso esfuerzo por parte de diferentes grupos de investigación en América del Sur se ha concentrado en la bioconversión de los subproductos de la caña de azúcar y los granos. Sin embargo, solo hay cuatro biorrefinerías operativas (plantas de demostración), ubicadas en Brasil y dedicadas a la conversión de bagazo de caña de azúcar en bioetanol (Magalhães et al., 2019). Este panorama evidencia la necesidad de desarrollar procesos que contribuyan al aprovechamiento de la biomasa de diversos sectores agroindustriales en conjunto con la promoción de una agricultura sostenible para generar un amplio portafolio de productos que impulsen el desarrollo económico de la región.

1.1.1.1 Biomasa lignocelulósica

El material lignocelulósico puede clasificarse en cuatro grupos basado en el tipo de fuente de la materia prima: a) residuos forestales; b) residuos sólidos municipales; c) Plantas perennes y d) residuos de cultivos (Patinvoh & Taherzadeh, 2019). La lignocelulosa consiste principalmente en polímeros naturales que forman la pared celular, celulosa, hemicelulosa y lignina (Figura 2). Además, la biomasa lignocelulósica contiene cantidades variables de humedad, proteínas, minerales y constituyentes menores, según su origen (Dahmen et al., 2018), pero se estima que los componentes primarios se encuentran en un rango de 32 a 55% de celulosa, 20 a 40% de hemicelulosas, 10 a 32% de lignina y 1 –9% de extractos (Banu et al., 2021; Kumar et al., 2021).

La celulosa $(C_6H_{10}O_5)_n$ es un polímero compuesto de unidades de glucosa con enlaces β-1,4 con una estructura cristalina que es poco accesible para las enzimas degradantes, característica que se asocia con el número de unidades de glucosa relacionado con su grado de polimerización (Kumar et al., 2021). Las moléculas de celulosa se mantienen juntas mediante enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals que le confiere propiedades como la hidrofilia y degradabilidad, pero tienen una

fuerte tendencia a formar enlaces de hidrógeno intramoleculares e intermoleculares y esta tendencia aumenta la rigidez de la celulosa y hace que sea muy estable, altamente insoluble y resistente a la mayoría de los solventes orgánicos (Lask et al., 2019; Wang et al., 2021b). Los productos directos de la celulosa incluyen pulpa, papel, textiles, derivados de celulosa (acetato de celulosa, carboximetilcelulosa, metilcelulosa e hidroxietilcelulosa), nanocelulosa, y celulosa bacteriana; como productos derivados se describe la obtención de polihidroxialcanoatos, enzimas, ácidos orgánicos, biocombustibles y solventes (Chandel et al., 2018).

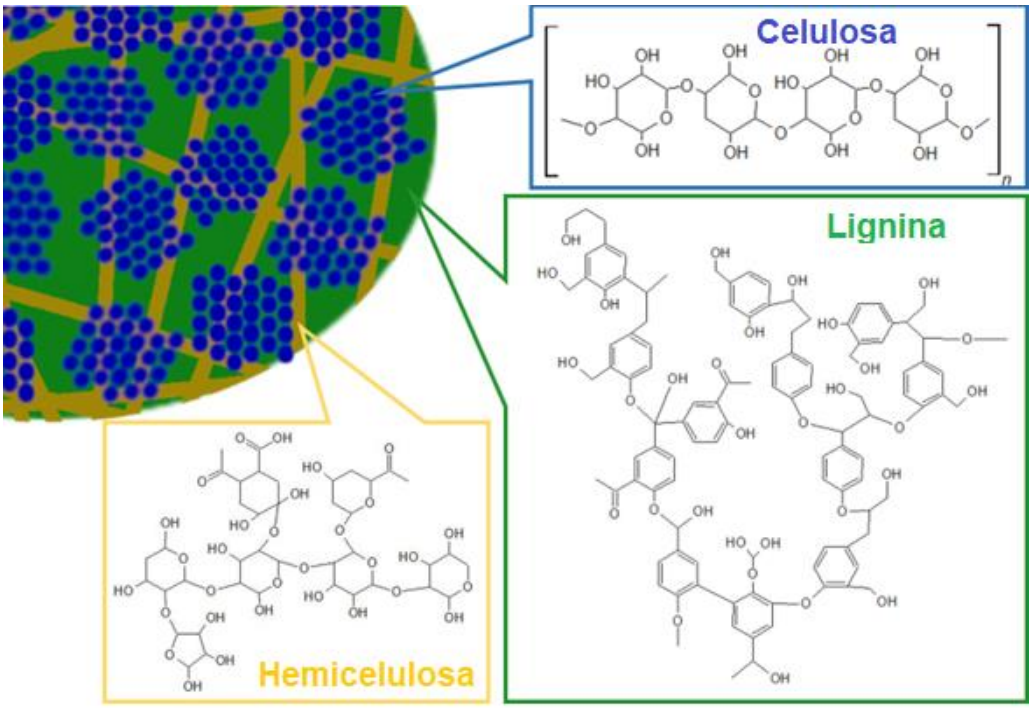


Figura 2. Componentes principales de la biomasa lignocelulosa. (Adaptado de Dahmen et al., 2018)

La hemicelulosa $(C_5H_8O_4)_m$ es el segundo polímero heterogéneo más abundante, que puede contener pentosas (β-D-xilosa, α-L-arabinosa), hexosas (β-D-manosa, β-D-glucosa, α-D-galactosa, α-L-ramnosa y la α-L-fucosa), ácidos urónicos (ácidos α-D-glucurónicos, α-D-4-O-metilgalacturónicos y α-D-galacturónicos) y grupos acetilo (Wang et al., 2021b), dependiendo de la fuente. Se compone de un esqueleto de monosacáridos interconectados a través de enlaces glucosídicos β-1,4 actuando como agente aglutinante entre las fracciones de celulosa y lignina para darle rigidez y flexibilidad a la pared celular (Mankar et al., 2021). Presenta grupos acetato unidos aleatoriamente a los grupos hidroxilo de los azúcares con enlaces éster y carece de

una estructura cristalina, que brindan más oportunidades para alteraciones químicas y enzimáticas selectivas (Ashokkumar et al., 2022). En su columna vertebral compuesta por unidades de D-xilopiranosa (madera dura) o D-manopiranosa, D-glucopiranosa (madera blanda) contiene puntos de ramificación en (1→ 2), (1→ 3) y (1→ 6) (Wang et al., 2021b). La hemicelulosa sirve como sustrato directo para la producción de diferentes tipos de películas, recubrimientos e hidrogeles y es fuente para la obtención de productos secundarios como ácidos orgánicos, biocombustibles y solventes, entre otros compuestos de interés industrial (Chandel et al., 2018).

La lignina $[C_9H_{10}O_3\ (OCH_3)_{0.9-1.7}]_x$ es una macromolécula hetero-poli-aromática tridimensional formada por alcohol sinapílico, alcohol coniferílico y alcohol p-cumarílico (Mankar et al., 2021) contiene varios grupos funcionales, como fenilpropano, metoxi y sustancias polifenólicas no carbohidratos (Ashokkumar et al., 2022). Esta molécula se entrecruza principalmente con hemicelulosas en la biomasa lignocelulósica a través de enlaces covalentes y enlaces de hidrógeno, proporcionando resistencia estructural, rigidez y resistencia contra patógenos e insectos (Wang et al., 2021b). La lignina actúa como agente de fortalecimiento hidrofóbico, lo que complica la hidrólisis y mejora la característica recalcitrante de la lignocelulosa. Los enlaces de éter β-O-4 representan el 50 % del total de enlaces en la lignina nativa junto con enlaces C-C con un 5–12 % adicional de β-β, 1–9 % de 5–5 y β-1. Por lo tanto, la destrucción de β-O-4, el enlace más reactivo, es el paso crítico en la conversión de lignina (Ashokkumar et al., 2022). La lignina de alto peso molecular (≤20 000 g/mol) se utiliza en mezclas de polímeros, fibras de carbono, adhesivos, biocarbón, hidrocarburos, compuestos aromáticos, compuestos fenólicos. La producción de resina epoxi y polímeros se sintetizó utilizando fracciones de bajo peso molecular (490–2600 g/mol) (Banu et al., 2021)

En el proceso bioquímico para transformación de la biomasa lignocelulósica, superando la recalcitrancia propia del material y logrando la liberación de azúcares son necesarias 5 etapas: 1) pretratamiento, 2) hidrólisis de carbohidratos complejos, 3) fermentación, 4) purificación de la corriente del producto y 5) tratamiento del efluente (Lask et al., 2019). Este proceso abarca una red de instalaciones que integran diferentes tecnologías (procesos y equipos) que permiten remover la lignina y romper los enlaces glucosídicos de la celulosa y hemicelulosa para obtener monosacáridos

susceptibles de ser transformados o para utilizarlos intactos para productos de base biológica (Chandel et al., 2018). El pretratamiento debe recuperar efectivamente las tres fracciones para la optimización del flujo de masa y energía en el sistema integrado (Banu et al., 2021), evitando disminuir las eficiencias de los procesos de hidrólisis posteriores. Por lo tanto, las principales características de una técnica de pretratamiento eficiente implican la descomposición del complejo lignocelulósico y minimización de la producción de compuestos inhibidores (Chandel et al., 2018). En esta primera etapa varios procesos físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos han sido implementados de manera independiente o en combinaciones (Chandel et al., 2018; Galbe & Wallberg, 2019; Ashokkumar et al., 2022), estos procesos y técnicas difieren en eficiencia y demandas de material/energía y tienen varias ventajas y desventajas con respecto a la producción de subproductos inhibidores y otros pasos del proceso (Lask et al., 2019).

La biomasa recalcitrante, como el material lignocelulósico, requiere de un método de pretratamiento rentable, dado que los productos de degradación del material pretratado pueden tener posteriormente un efecto inhibitorio sobre los pasos de hidrólisis y para otras operaciones de la unidad aguas abajo (Chandel et al., 2018). Esta etapa representa un obstáculo a superar para que el concepto de biorrefinería se realice a gran escala (Galbe & Wallberg, 2019). En el pretratamiento se utilizan diversos procesos en los que se han centrado los esfuerzos de investigación, algunos de ellos para reducir el tamaño de partícula (molienda, extrusión, microondas, ultrasonido) (Mankar, et al., 2021); otros métodos en función del pH (alcalinos y ácidos), en donde la fracción de hemicelulosas se hidroliza a pH bajos y la fracción de celulosa en general se ve menos afectada, por otro lado, a un pH más alto, es la lignina la que se solubiliza y los subproductos generados dependen de la severidad del tratamiento (Galbe & Wallberg, 2019); uso de solventes orgánicos (organosolv) para escindir los enlaces de lignina y hemicelulosa mediante la solubilización, lo que mejora el área superficial general de la celulosa (Mankar, et al., 2021); método de hidrotermólisis en donde se utiliza agua líquida bajo presión a altas temperatura generando la autoionización del agua (Galbe & Wallberg, 2019); método de pretratamiento por explosión de fibra de amoníaco (AFEX) con amoníaco líquido anhidro a temperaturas de reacción moderadas y presiones altas (Mankar, et al., 2021¸ Ashokkumar et al., 2022); uso de líquidos iónicos (IL) que son sales que constan de

un anión inorgánico y un catión orgánico, de igual manera han sido implementados los disolventes eutécticos profundos, que son una clase de mezclas eutécticas de ácidos y bases de Lewis o Brønsted, que se pueden formar a partir de una variedad de especies aniónicas y catiónicas, estas mezclas presentan ventajas frente a solventes convencionales y líquidos iónicos, pues son solventes económicos, no tóxicos y biodegradables (Galbe & Wallberg, 2019; Mankar, et al., 2021); otro método alternativo que ha surgido como una tecnología innovadora y robusta para la valorización de la biomasa es la tecnología de fluidos supercríticos, en donde aún existen desafíos asociados con la alta temperatura y presión, formación de inhibidores, tiempo de residencia muy pequeño, etc. (Mankar, et al., 2021). Los métodos biológicos pueden llevarse a cabo aprovechando la acción enzimática de algunos microorganismos, en donde los hongos han jugado un papel clave debido a las capacidades para descomponer la lignina (hongos de pudrición blanca), celulosa (hongos de pudrición blanda) o hemicelulosas y celulosa (hongos de pudrición marrón), encontrando como cuello de botella la lenta tasa de degradación, lo que los hace poco prácticos para uso industrial (Galbe & Wallberg, 2019). Asimismo, se ha implementado la adición de enzimas de despolimerización exógenas que supone un gasto adicional para el proceso (Brandt et al., 2021).

La evaluación de un método de pretratamiento no se limita a calcular la recuperación y los rendimientos de los principales compuestos en la materia prima lignocelulósica, se debe además considerar si es adecuado para un determinado paso de pos-pretratamiento (Galbe & Wallberg, 2019). Para encontrar diseños de proceso exitosos ambiental y comercialmente con bajo costo, se ha relacionado la posibilidad de combinar dos o más enfoques para maximizar la deconstrucción de la biomasa (Mankar, et al., 2021). Múltiples fuentes de materias primas y procesos de conversión han sido valoradas mediante análisis del ciclo de vida y las evaluaciones tecnoeconómicas (Lask et al., 2019; Ashokkumar et al., 2022) demostrando que la gran variación de materiales lignocelulósicos dificulta encontrar un diseño de proceso general para una biorrefinería y cualquier recomendación de un método de pretratamiento adecuado debe basarse en una evaluación técnico-económica con datos al menos de una escala piloto (Galbe & Wallberg, 2019).

Debido a la alta complejidad de la estructura de esta materia prima, la fragmentación del material pretratado es probablemente el indicador más importante en los costos generales del proceso (Galbe & Wallberg, 2019). La degradación de polímeros de lignocelulosa en sus monómeros estructurales es esencial para la síntesis adicional de biocombustibles y componentes químicos básicos en la biorrefinería (Andrade et al., 2021). En el proceso de hidrólisis de los componentes del material lignocelulósico (Figura 3) no solo se liberan azúcares simples, otros productos generados de la deshidratación de azúcar y despolimerización de lignina, tales como ácidos orgánicos, furaldehídos derivatizados y compuestos fenólicos (Guo et al., 2018; Hou et al., 2018) también son obtenidos. La glucosa y manosa pueden isomerizarse para formar fructosa, que luego se convierte en HMF (5-hidroximetilfurfural) mediante deshidratación; la D-xilosa se puede convertir enzimáticamente en xilulosa, que luego se deshidrata para formar furfural. El HMF y el furfural producidos pueden hidrolizarse para generar ácido fórmico (Guo et al., 2022) Estos compuestos son conocidos por tener un gran impacto negativo en los microorganismos que participan en el proceso de fermentación.

Aunque los residuos lignocelulósicos se han ubicado como un material de alta importancia biotecnológica gracias a las propiedades de sus componentes y la posibilidad de conversión de estos a una gran cantidad de productos de valor agregado, en la actualidad aún es un reto para el proceso de bioconversión de materiales lignocelulósicos, contar con microorganismos fermentadores, de los compuestos monoméricos (pentosas y hexosas), que exhiban un buen desempeño en las condiciones de proceso; parámetros importantes para la elección del microorganismo como biocatalizador se centran en el rango de temperatura, intervalo de pH, la tolerancia al producto, tasa de crecimiento, la productividad, la tolerancia osmótica, especificidad, rendimiento, estabilidad genética, tolerancia a inhibidores y dependiendo de la fuente de materia prima, el contenido de nutrientes en el medio puede ser insuficiente (Brandt et al., 2021, Duque et al., 2021).

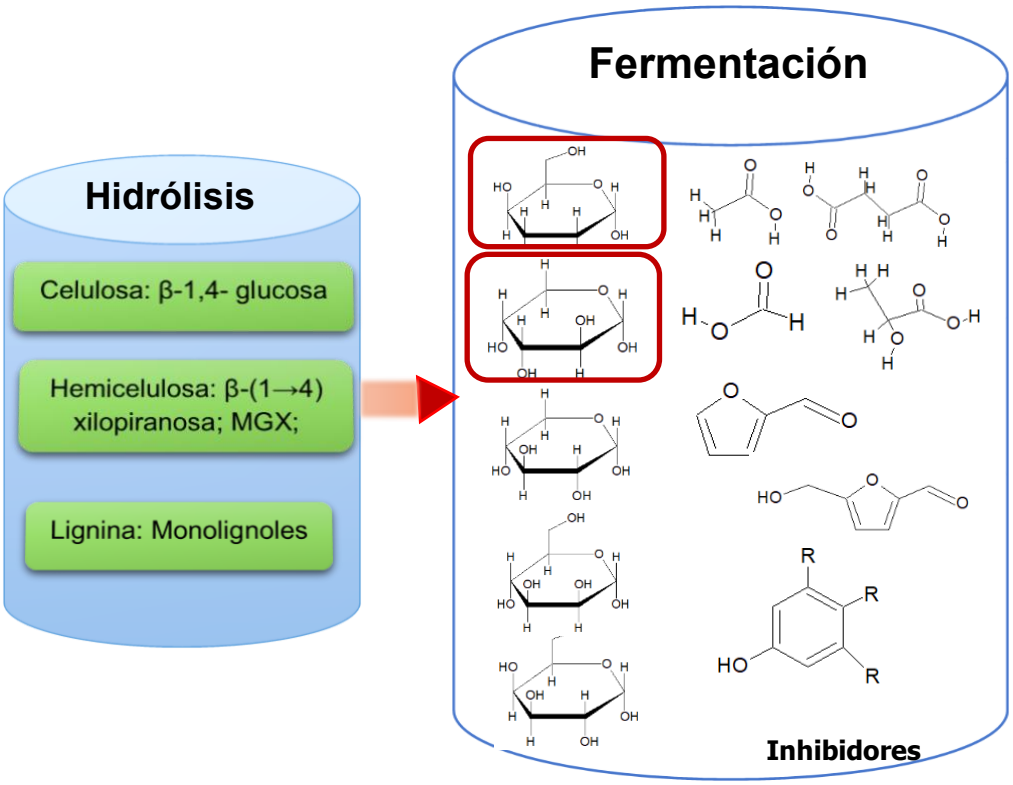


Figura 3. Hidrólisis del material lignocelulósico y los principales compuestos inhibidores generados. MGX: O-acetil-4-O-metilglucuronoxilanos; AGX: arabino-4-O-metilglucuronoxilanos. En cuadros rojos los principales monosacáridos presentes en los hidrolizados: glucosa y D-xilosa. (Adaptado Barros et al., 2020)

Bagazo de caña de azúcar

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es un cultivo perenne que crece principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, con una producción anual mundial de alrededor de 1.8 billones de t (base húmeda) siendo Brasil e India los principales productores (Negrão et al., 2021). Después del procesamiento industrial de la caña de azúcar para la extracción de los jugos, utilizados para la producción de azúcar y etanol de primera generación, se obtienen como subproducto el bagazo de caña de azúcar en grandes cantidades (Kumar et al., 2021), además de puntas y hojas de plantas. Solo un tercio de la masa seca de la caña de azúcar sobre el suelo está en el jugo (Negrão et al., 2021). La quema del bagazo a cielo abierto ha sido una práctica empleada como proceso de gestión en los ingenios de azúcar para la eliminación de estos residuos causando problemas de contaminación ambiental (Kumar et al., 2021).

La generación del bagazo de caña de azúcar como residuo del segundo cultivo agrícola más producido requiere un manejo adecuado, su producción se estima en 540 millones de toneladas por año a nivel mundial, solo entre los diez principales países productores (Kumar et al., 2021). Debido a su alta disponibilidad, constituyendo alrededor del 30% de la cosecha de caña de azúcar, se estima que el bagazo podría valorizarse para diversificar la generación de productos de valor agregado de usos energéticos y no energéticos (Khatri & Pandit, 2022). La investigación alrededor de este residuo ha permitido utilizarlos en varias aplicaciones como medio nutritivo para el cultivo de diversos microorganismos para la producción de metabolitos de importancia industrial, en la generación de electricidad, gas de síntesis y como bio-absorbente en la biorremediación de metales pesados como Pb, Zn, Cu, Cd y otros (Kumar et al., 2021). La ceniza de bagazo de caña de azúcar está siendo estudiada como reemplazo parcial de cemento y otros materiales de construcción (Khalil et al., 2021).

Los componentes estructurales del bagazo de caña de azúcar son la celulosa (43.1%), hemicelulosa (31.1%) y lignina (11.4%) (Kim, 2018). Magalhães y colaboradores (2019) estimaron, a partir de este residuo, para 2025 en América del Sur una producción de 100.62 y 73.71 millones de t de celulosa y hemicelulosa, respectivamente. Los azúcares estructurales del bagazo, relacionados con la celulosa y la hemicelulosa, lo convierten en un sustrato potencial para la producción de biocombustibles, ácidos orgánicos, enzimas y otros productos de valor agregado en biorrefinerías. Estos enfoques para el uso de estos recursos responden al objetivo de lograr el desarrollo de una economía circular que se basa en el concepto de que los residuos de un proceso industrial serán útiles como materia prima para otro, de tal manera que se minimice el impacto ambiental y los residuos, considerados como productos de desecho, aporten valor económico a la cadena de producción (Andrade et al., 2021).

1.1.2 Levaduras transformadoras de D-xilosa

El metabolismo central de carbono en las levaduras le ha conferido ventajas fermentativas en procesos de conversión de la glucosa frente a otros microorganismos. En la fermentación de hexosas preferencialmente ha sido usada *S. cerevisiae,* una levadura Crabtree positiva, que utiliza la fermentación incluso en

presencia de oxígeno, cuando las concentraciones de glucosa son suficientemente altas (Pfeiffer & Morley, 2014). Sin embargo, en el hidrolizado proveniente de material lignocelulósico las hexosas no son el único monosacárido presente, también se compone de pentosas (D-xilosa y arabinosa) (Wang et al., 2021b), lo que genera una desventaja para el uso de este biocatalizador por su incapacidad para fermentar D-xilosa. Se ha descrito que levaduras Crabtree-positivas, como *S. cerevisiae*, crean cambios más drásticos en los niveles de transcripción metabólica y genes reguladores implicados en la glucólisis y la gluconeogénesis, cuando la D-xilosa sustituye a la glucosa como fuente de carbono (Papini et al., 2012; Kwak & Jin, 2017).

Existe una diversidad de microorganismos como bacterias, hongos y levaduras que son capaces de fermentar la D-xilosa de manera natural, aunque no todos presentan la capacidad de adaptarse a las condiciones de proceso (Chandel et al., 2011, Lopes et al., 2016; Kim & Woo, 2018; Barros et al., 2020). Una variedad de levaduras con nuevas actividades catabólicas y anabólicas para la utilización eficiente de la D-xilosa han sido aisladas a partir de diversos ambientes naturales (Bergmann et al., 2019, Barros et al., 2020). Sin embargo, en levaduras que utilizan D-xilosa naturalmente se han descrito limitaciones, como baja tolerancia al etanol, requisitos de oxígeno para el crecimiento, fermentación de glucosa ineficiente y consumo del etanol acumulado (Ruchala & Sibirny, 2021). Durante la investigación de la utilización de D-xilosa en las levaduras, se ha capturado un nuevo metabolismo global de las redes metabólicas en el cultivo de D-xilosa. En oposición a un patrón de represión de la glucosa (Kwak et al., 2019), se ha observado que levaduras Crabtree-negativas exhiben patrones transcripcionales similares de glucólisis y gluconeogénesis en glucosa y D-xilosa (Papini et al., 2012). Sin embargo, la D-xilosa puede inducir efectos respiratorios en el metabolismo central del carbono incluso en condiciones anaeróbicas (Zha et al., 2021), y una regulación de la vía menos rigurosa durante el metabolismo de la D-xilosa relaja el flujo metabólico, de modo que el metabolismo celular se redirige del metabolismo estrictamente fermentativo de la glucosa al metabolismo respiratorio de la D-xilosa, lo que produce una pérdida de carbono en forma de liberación de CO_2 (Li et al., 2019).

La D-xilosa es la pentosa más abundante en la biosfera, se encuentra como componente de heteropolímeros principalmente asociados a material vegetal

(Ruchala & Sibirny, 2021). En las levaduras, la capacidad de degradar las pentosas no es una característica metabólica que predomine; no obstante, los genes para la asimilación de D-xilosa parecen estar muy extendidos en las levaduras ascomicetos, incluidas, varias levaduras que carecen de la capacidad de crecer en este azúcar (Ruchala & Sibirny, 2021). El proceso del metabolismo de la D-xilosa en levaduras inicia con el transporte del azúcar del medio externo hacia el interior de la célula, que puede realizarse a través de un transportador específico natural o secuestrando los transportadores de hexosa (Sharma et al., 2018). Muchos transportadores de monosacáridos en levaduras operan por difusión facilitada, un mecanismo independiente de la energía que cataliza el movimiento de una única molécula de soluto en un momento en su gradiente de concentración, a través de una membrana. Sin embargo, en levaduras fermentadoras de D-xilosa generalmente el transporte ocurre mediante sistema que consume energía y son capaces de transportar el soluto acoplado al movimiento simultáneo de protones (Patiño et al., 2019). Sin embargo, la adaptación del sistema de simporte de protones varía de una especie a otra y también depende de varios tipos de niveles de estrés (Sharma et al., 2018).

En la naturaleza, se utilizan dos vías catabólicas diferentes para convertir la D-xilosa en xilulosa, que puede canalizarse hacia la vía glucolítica a través de la xiluloquinasa (XK, EC 2.7.1.17) mediante la vía de las pentosas fosfato (la ruta de isomerización y la de óxido-reducción) (Kwak & Jin, 2017; Kim & Woo, 2018). La ruta de oxido-reducción (Figura 4) ha sido descrita en levaduras no-convencionales que utilizan D-xilosa, incluyendo levaduras representativas como *Scheffersomyces stipitis*, *Sc. shehatae*, *Spathaspora arborariae, Sp. passalidarum*, *Sp. girioi, Sp. hagerdaliae* y *Sp. gorwiae* (Nguyen et al., 2006; Cadete et al., 2016, Lopes et al., 2016). Esta ruta metabólica de la D-xilosa reductasa (XR, EC 1.1.1.30) y xilitol deshidrogenasa (XDH, EC 1.1.1.9) implica los genes candidatos para la D-xilosa reductasa (*XYL1*), xilitol deshidrogenasa (*XYL2*) y la xiluloquinasa (*XYL3*) que existen en casi todas las levaduras de ascomicetos, lo que sugiere que la incapacidad para crecer en D-xilosa implica otros factores como la regulación de la expresión génica, la especificidad enzimática o la falta de capacidad de transporte de D-xilosa (Ruchala & Sibirny, 2021).

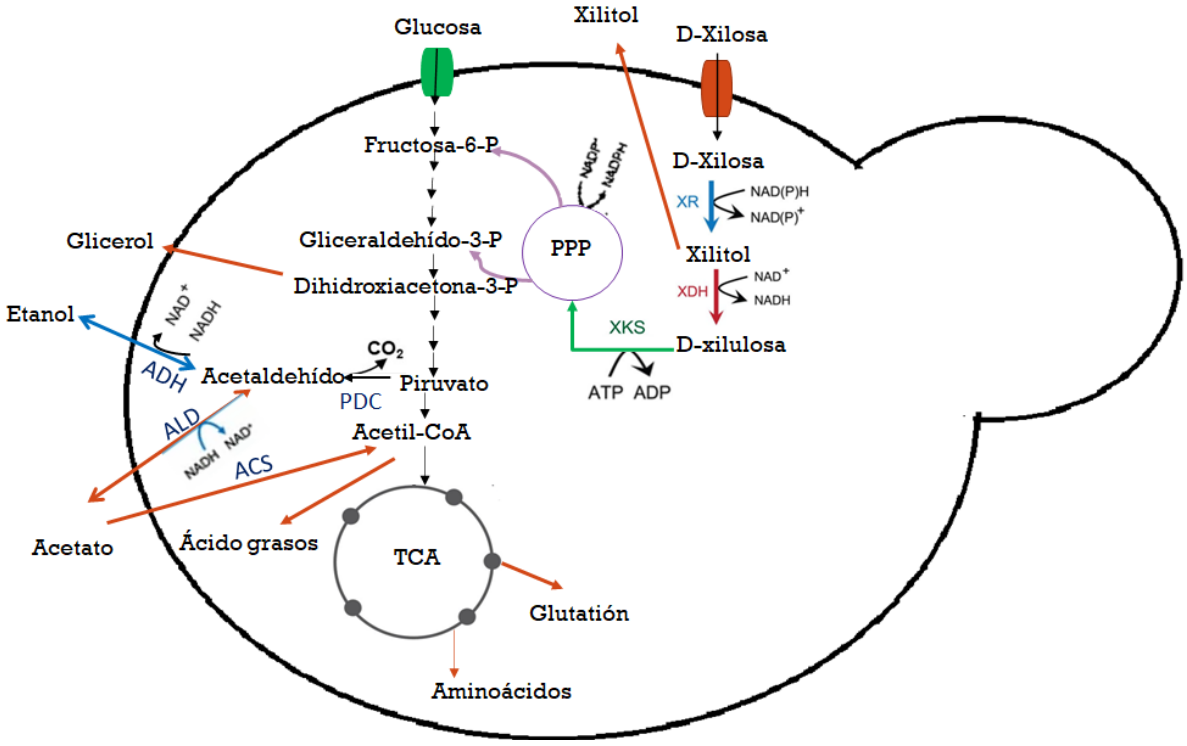


Figura 4. Ruta metabólica de oxido-reducción en levaduras transformadoras de D-xilosa. XR: xilosa reductasa; XDH: xilitol deshidrogenasa; XKS: xiluloquinasa; PDC: piruvato descarboxilasa; ADH: alcohol deshidrogenasa; ALD: aldehído deshidrogenasa; ACS: acetil-CoA sintasa (Basado en Kwak et al., 2019; Ruchala & Sibirny, 2021; Umai et al., 2022)

Estrategias desde la ingeniería metabólica para construir levaduras genéticamente modificadas capaces de fermentar D-xilosa también han sido estudiadas, no obstante debido a los diferentes patrones metabólicos entre la utilización de la glucosa y la D-xilosa por las levaduras, la introducción de la vía de asimilación de la D-xilosa en un huésped diseñado teniendo en cuenta únicamente el metabolismo de la glucosa, no siempre es adecuado para maximizar las potencialidades de la utilización de la D-xilosa en las levaduras (Kwak et al., 2019). Para la implementación de la vía XR-XDH debido a la preferencia de doble cofactor para NADPH y NADH, donde las reductasas utilizan preferentemente NADPH, mientras que las deshidrogenasas prefieren NAD^+ (Patiño et al., 2019), el desequilibrio de estos dos cofactores representa un importante punto de control para la obtención de los metabolitos.

Levaduras productoras de xilitol

El xilitol se caracteriza por ser un polialcohol con un mercado emergente debido a sus propiedades para la industria alimentaria como edulcorante bajo en calorías, que traen beneficios para la salud como el metabolismo independiente de la insulina y la naturaleza prebiótica (Yamakawa et al., 2020). Adicionalmente, este compuesto puede ser usado como bloque de construcción en la obtención de otros productos de interés (ácido xilárico, glicoles, hidroxil furano y 1,2-propanodiol). Se estima que el mercado mundial de xilitol alcanzará los 1370 millones de dólares estadounidenses (4-5 dólares/kg) para 2025 (Hernández-Pérez et al., 2019). Actualmente, el xilitol se produce industrialmente mediante la hidrogenación catalítica de D-xilosa sobre un catalizador Raney-Nickel demostrando un rendimiento con valores de 0.85 kg de cristales de xilitol por kg de D-xilosa (Özüdoğru et al., 2019). Sin embargo, se presentan algunas desventajas, como su alto consumo de energía, ya que el proceso debe estar sometido a altas temperaturas, altas presiones, y el catalizador (Rao et al., 2016), lo que lo hace un proceso costoso y no ecológico.

Desde hace algún tiempo se estudia la producción de xilitol por el método biotecnológico, considerando que puede ser un método más económico y amigable con el ambiente mediante la valorización de los residuos lignocelulósicos. Tanto levaduras como bacterias pueden producir xilitol, aunque se ha demostrado que las levaduras producen mayores cantidades de este compuesto (Umai et al., 2022). El xilitol se obtiene en células de levadura como producto de la reacción catalizada por D-xilosa reductasa (XR), que depende de NADH o NADPH (Figura 4). La acumulación y posterior secreción de este metabolito esta mediada por la relación de cofactores ($NAD(P)H/NAD^+$) presentes en las células y la actividad de xilitol deshidrogenasa (XDH) para metabolizar el xilitol hasta xilulosa (Kieliszek et al., 2017). Cuando la oxidación del NADH es baja se produce un desequilibrio redox que lleva a la inhibición de la XDH dependiente de NAD^+, resultando una mayor producción de xilitol. Entre los géneros de levaduras productoras naturales de xilitol se destacan linajes de *Candida, Meyerozyma, Spathaspora, Scheffersomyces, Debaryomyces, Wickerhamomyces*, *Cyberlindnera* y *Kluyveromyces* (Cadete et al., 2015; Cadete et al., 2016; Lopes et al., 2016; Yan et al., 2021; West, 2021, Palladino et al., 2021; Leonel et al., 2021). Estas levaduras han mostrado una conversión eficiente de D-xilosa hasta la secreción de xilitol, con rendimientos entre 0.35 g/g y 0.83 g/g, en diferentes condiciones nutricionales y de operación, a partir de medios sintéticos e hidrolizados

lignocelulósicos de varios residuos agroindustriales como cascarilla de arroz, residuos vegetales, caña de bambú, residuos de poda de olivo y otros (Lopes et al., 2016; Guleria et al., 2022; West, 2021; De Albuquerque et al., 2015; Mateo et al., 2015; Miura et al., 2013), evidenciando, la tolerancia a los inhibidores de fermentación que se producen durante los tratamientos de hidrólisis (como ácido acético, derivados de furano y compuestos fenólicos) (López-Linares et al., 2018; Singh et al., 2022).

Levaduras productoras de etanol

La producción de etanol (C_2H_5OH) de segunda generación (2G) surge como alternativa al uso de combustibles fósiles y la mitigación de emisión de gases de efecto invernadero. El bioetanol es un alcohol obtenido mediante la fermentación microbiana de carbohidratos derivados de material vegetal principalmente (Tse et al., 2021). Es un combustible líquido que puede ser usado directamente como alcohol carburante o en mezclas para oxigenar las gasolinas. Además, sirve como bloque de construcción para varios productos químicos y combustibles avanzados por rutas químicas, como el etileno, óxido de etileno, butadieno, éter dietílico, ácido acético, butanol, acetato de etilo y otros alcoholes (Magalhães et al., 2019).

La producción mundial de bioetanol en el 2021 fue de 27.270 millones de gal anual, siendo producido principalmente por Estados Unidos a partir de cultivo de maíz y Brasil a partir de cultivo de caña de azúcar, con una participación del 82% de la producción total (RFA, 2022). La transición del uso de materias primas comestibles a fuentes no alimentarias para la producción de bioetanol es un paso importante para reducir los costos de producción y evitar la competencia con los suministros mundiales de alimentos (Cho et al., 2020). La producción de bioetanol a partir de materia prima de lignocelulósica es de gran interés debido a las ventajas de sus características de combustión limpia, baja emisión de carbono, baja toxicidad y volatilidad (Ashokkumar et al., 2022).

La levadura *S. cerevisiae* es el microorganismo que se utiliza en la actualidad por los sistemas de producción industrial de bioetanol, debido a la capacidad de adaptarse rápida y eficientemente a un entorno fluctuante. Sin embargo, en la transformación de la fracción hemicelulósica de la biomasa este microorganismo

presenta desafíos en la tolerancia a las condiciones de estrés de la fermentación 2G y la cofermentación de los azúcares hexosa y pentosa (Brandt et al., 2021), pues no presenta la capacidad de fermentar D-xilosa. La producción de etanol a partir de este monosacárido de cinco carbonos la realizan levaduras no-convencionales que presentan la capacidad de transportar la D-xilosa al medio intracelular y reducirla a xilitol por la acción de la XR dependiente de NAD(P)H. Seguido de la oxidación de xilitol a xilulosa por un XDH dependiente de NAD^+, y por la acción de fosforilación de la XK, la xilulosa-5-P se integra en la vía no oxidativa de las pentosas fosfato (Ochoa-Chacón et al., 2021) y así ser incorporada a la vía glucolítica para su transformación hasta etanol por la acción de la alcohol deshidrogenasa (ADH, EC 1.1.1.1) (Figura 4). La tasa de conversión de etanol depende de la tasa de consumo de azúcar, por lo tanto, el sistema transportador de azúcar juega un papel importante, que varía de una especie a otra (Sharma et al., 2018).

La síntesis de etanol desempeña un papel esencial en el equilibrio redox de cofactores (es decir, la reoxidación del NADH producido en la glucólisis), y la vía de generación de acetil-CoA citosólico que se requiere para la biosíntesis de ácidos grasos y otros requisitos biosintéticos (Gambacorta et al., 2020). El catabolismo de la D-xilosa hasta etanol requiere un equilibrio de cofactores (NADH/NADPH) para las reacciones catabólicas de conversión de D-xilosa en xilulosa. La principal distinción entre $NADP^+$ /NADPH y NAD^+ /NADH es que la primera vía está vinculada a vías anabólicas y la segunda vía está vinculada a vías catabólicas (Ochoa-Chacón et al., 2021). Para superar este desequilibrio se han descrito en levaduras mecanismos de reoxidación de NADH: fermentación alcohólica; producción de glicerol; la respiración del NADH citosólico a través de las NADH deshidrogenasas mitocondriales externas; respiración del NADH citosólico a través de la lanzadera de glicerol-3-fosfato; oxidación de NADH intramitocondrial a través de una NADH deshidrogenasa, lanzadera de etanol-acetaldehído, lanzadera de malato-oxalacetato, una lanzadera de malato-aspartato y una lanzadera de malato-piruvato (Bakker et al., 2001). Estas vías paralelas juegan un papel clave en la regulación de la reoxidación del NADH generado en reacciones de asimilación y disimilación para mantener el flujo de la D-xilosa hacia la conversión a etanol.

1.1.2.1 Efecto de compuestos inhibidores

Dependiendo del pretratamiento y los métodos de hidrólisis utilizados para la degradación de materias primas lignocelulósicas, se obtienen fuentes de carbono variadas (polímeros o monómeros) además de compuestos que generan toxicidad para las células. La formación excesiva de estos inhibidores ocurre por una fuerte desintegración de la estructura de la capa de lignina, hidrólisis, descomposición y reacciones de deshidratación secuencial (Guo et al., 2022). Los inhibidores podrían interferir con la función celular y el equilibrio de la presión osmótica, inhibiendo directamente la fermentación. Linajes tolerantes a los inhibidores capaces de fermentar hidrolizados no detoxificados son un requisito absoluto para el desarrollo de procesos factibles de bioconversión de biomasa lignocelulósica (Kwak & Jin, 2017; Guo et al., 2018).

El ácido acético es el ácido orgánico más abundante generado durante los procesos de pretratamiento e hidrólisis (también se produce lactato, succinato y formiato), por lo que representa un reto para las levaduras en los procesos biotecnológicos a partir de esta materia prima. El ácido acético se forma principalmente por desacetilación del acetilxilano de las hemicelulosas, mientras que el ácido fórmico se puede formar por degradación de azúcares (Li et al., 2022). Aunque este compuesto es un metabolito intermedio en las rutas bioquímicas y puede ser utilizado como fuente de carbono por diversas levaduras, la exposición de las células a este compuesto puede generar respuestas adaptativas o ser tóxico y provocar la muerte celular. El efecto del ácido acético en las células depende de las concentraciones extracelulares del mismo, el pH del medio, así como las condiciones nutricionales y la fase de crecimiento de la levadura (Mira et al., 2010; Kitanovic et al., 2012). Este ácido orgánico existe en forma no disociada y se difunde pasivamente a través de la membrana plasmática cuando el pH del entorno extracelular es inferior al valor de pKa, también se ha indicado el transporte por el canal de acuagliceroporina (Ndukwe et al., 2020). La acidificación intracelular es la razón principal de los efectos inhibidores de los ácidos orgánicos sobre el crecimiento y metabolismo celular, causado por el consumo de una gran cantidad de ATP (Adenosín trifosfato) y el agotamiento simultaneo de H^+, para mantener la homeostasis del pH intracelular, mediante la acción de la ATPasa en la membrana plasmática y vacuolar (Guaragnella

& Bettiga, 2021; Li et al., 2022). El ion acetato también puede interferir en las actividades celulares ocasionando daño a la síntesis, estructura y funciones del ADN/ARN y las proteínas. Además, el estrés por exposición a ácidos débiles puede generar aumento en la presión de turgencia, estrés oxidativo, agregación de proteínas, aumento en el nivel de aniones celulares, degradación de vacuolas intracelulares, peroxidación de lípidos e inhibición del tráfico de las membranas celulares, organización de los lípidos, y puede inducir la muerte celular programada (Ndukwe et al., 2020; Lin et al., 2021).

La toxicidad de los derivados del furano como el 2-furaldehído (furfural) y el 5-hidroximetil-furfural (HMF) afecta la relación NAD^+/NADH que resulta en la inhibición del crecimiento celular y de las enzimas glucolíticas y fermentativas esenciales para las vías metabólicas centrales (como piruvato, acetaldehído y alcohol deshidrogenasas) (Guo et al., 2022), la reticulación proteína-proteína y la degradación del ADN en cadenas simples (Uddin & Hadi,1995). El furfural puede inducir la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) en las células, lo que da como resultado un daño irreversible en las mitocondrias y la membrana de la vacuola, dos compartimentos que regulan el equilibrio redox del citosol, la pérdida de sus funciones puede resultar en una reducción de las tasas de consumo de azúcar; además, genera daño en la actina, el citoesqueleto y la cromatina nuclear. En adición, el furfural y el HMF pueden inhibir la síntesis de proteínas y ARN alterando la expresión génica específica, lo que inhibe el crecimiento celular (Li et al., 2022). Sin embargo, la levadura puede metabolizar furfural y HMF a sus alcoholes menos tóxicos por medio de oxidorreductasas utilizando NAD(P)H como cofactor un proceso metabólico que ocurre a altas tasas, no obstante, debido a la menor capacidad del HMF para penetrar la membrana celular que la del furfural, las células tardan más tiempo en desintoxicar el HMF. La conversión de estos derivados de furano aumenta la energía celular para el mantenimiento y reduce la concentración de cofactores redox (Ask et al., 2013; Li et al., 2022).

Los compuestos fenólicos formados durante la degradación de la lignina y la deshidratación de los azúcares son insolubles o parcialmente solubles en el hidrolizado. Estos inhibidores presentan distintos grupos funcionales como formilo,

carboxilo e hidroxilo e incluyen ácidos (ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido 4-hidroxibenzoico y ácido siríngico), alcoholes (guaiacol, catecol y alcohol vainillico) y aldehídos (vainillina, aldehído siríngico y 4-hidroxilbenzaldehído), que reducen los rendimientos de etanol y alteran los rendimientos de glicerol y acetato de las fermentaciones de *S. cerevisiae* (Adeboye et al., 2014). Sin embargo, la caracterización detallada de los compuestos fenólicos formados es un desafío debido a su diversidad y complejidad en la estructura (Li et al., 2022). Además, estos compuestos aumentan la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), superóxidos (O^{2-}) e hidroxilo (OH^-) que interactúan con las proteínas/enzimas, y resultan en su desnaturalización, dañan el citoesqueleto, causan mutagénesis en el ADN e inducen la muerte celular programada, generan invaginaciones de la membrana citoplasmática, la disminución del potencial y la permeabilidad de la membrana, reprimen el proceso de traducción, e inhibe la función ribosómica (Mikulášová et al., 1990; Li et al., 2022). Los compuestos aromáticos, que poseen un enlace insaturado, un grupo formilo y sustituyentes del grupo carbonilo en la posición orto, mostraron una toxicidad más significativa en el crecimiento de *S. cerevisiae* (Hou et al., 2018). Distintas vías metabólicas para tolerar la exposición a inhibidores fenólicos evidenciaron que la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), pueden tener una localización subcelular diferenciada (citosol, mitocondria y en menor medida retículo endoplasmático) de acuerdo con el compuesto fenólico evaluado (Fletcher et al., 2019). Además, se sabe que los compuestos fenólicos y aromáticos actúan de manera sinérgica con otros inhibidores que incluyen derivados de furano (Watanabe et al., 2019).

El rendimiento y la productividad de las levaduras en el proceso de bioconversión de la biomasa lignocelulósica (Figura 5) se reducen en gran medida debido a la citotoxicidad de los compuestos inhibidores, generados por la degradación de la lignina y/o la deshidratación de los azúcares durante los procesos de tratamiento previo, que se liberan posteriormente en el hidrolizado junto con los azúcares fermentables (Hou et al., 2018; Watanabe et al., 2019; Li et al., 2022).

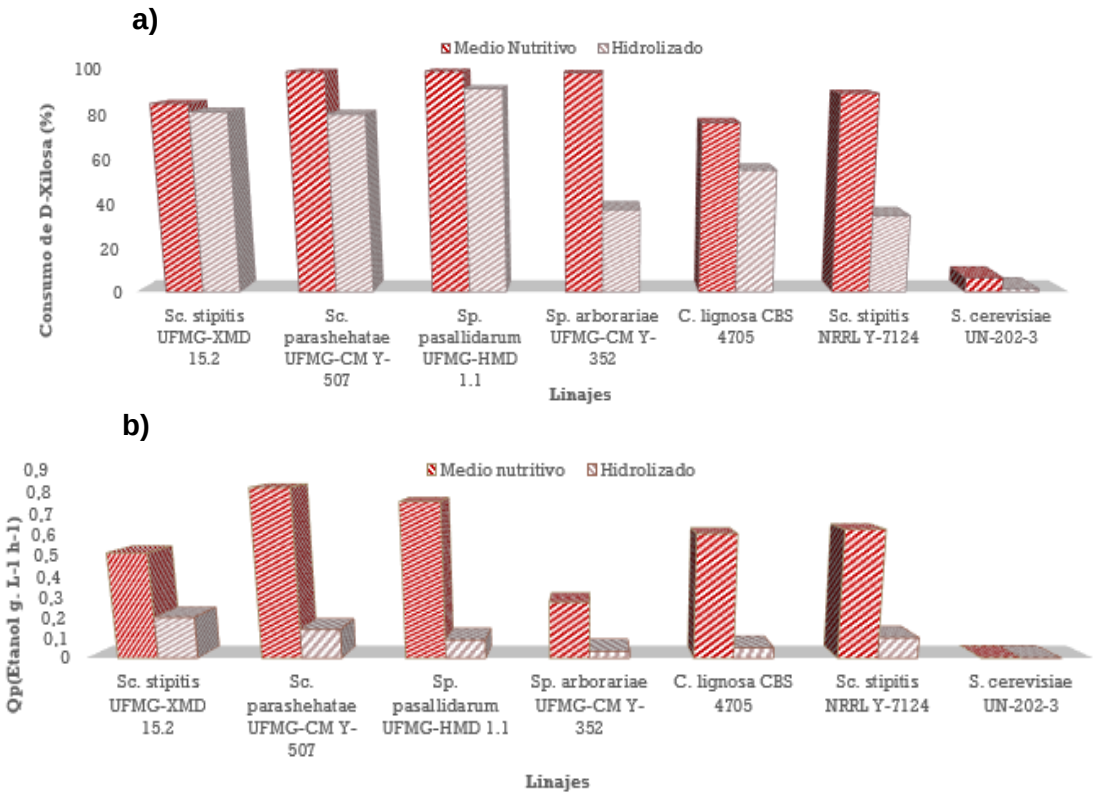


Figura 5. Parámetros de a) consumo de D-xilosa y b) productividad de etanol en la fermentación de levaduras en medio nutritivo (YPX, 5% de xilosa) e hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña (basado en datos publicados por Cadete, et al., 2012, Cadete, et al., 2017b; Morales, et al., 2014)

Los efectos citotóxicos pueden ser acumulativos debido a los efectos sinérgicos (positivos o negativos) de los compuestos inhibidores que presentan daño sobre el mismo proceso celular, como la formación de ROS inducida por los ácidos y derivados del furano y el daño en la membrana celular generado por los fenoles y los ácidos orgánicos, que pueden promover respuestas más complejas y más costosas energéticamente para la célula con disminución significativa en la eficiencia de la fermentación (Brandt et al., 2021; Li et al., 2022).

1.1.3 Respuesta al estrés celular

Los organismos han desarrollado estrategias para aumentar las respuestas al estrés celular y recuperar la constancia del estado interno (homeostasis) al ser expuestos a cambios repentinos y dramáticos que afectan directamente la supervivencia de las células (Enjalbert et al., 2003). Dentro de estos mecanismos se han descrito procesos de homeostasis intracelular, modificación de la vía metabólica central, regulación de

la transcripción, plegamiento y estabilización de proteínas, proceso catabólico de proteínas dependiente de ubiquitina, transporte mediado por vesículas, síntesis de proteínas, vías de señalización MAPK, ciclo celular, muerte celular programada (Dong et al., 2017). Existe entonces una plasticidad genómica que permite abordar la hipótesis de que las células pueden adquirir nuevas funciones o reconfigurar estructuras macromoleculares más adecuadas para nuevos entornos (Mans et al., 2018). Las respuestas al estrés por parte de levaduras generalmente presentan un control global, donde participan como reguladores diferentes factores de transcripción e incluye un sistema complejo de vías de señalización (Figura 6), permitiendo que las células dañadas se recuperen y eviten daños mayores (Lin et al., 2021)

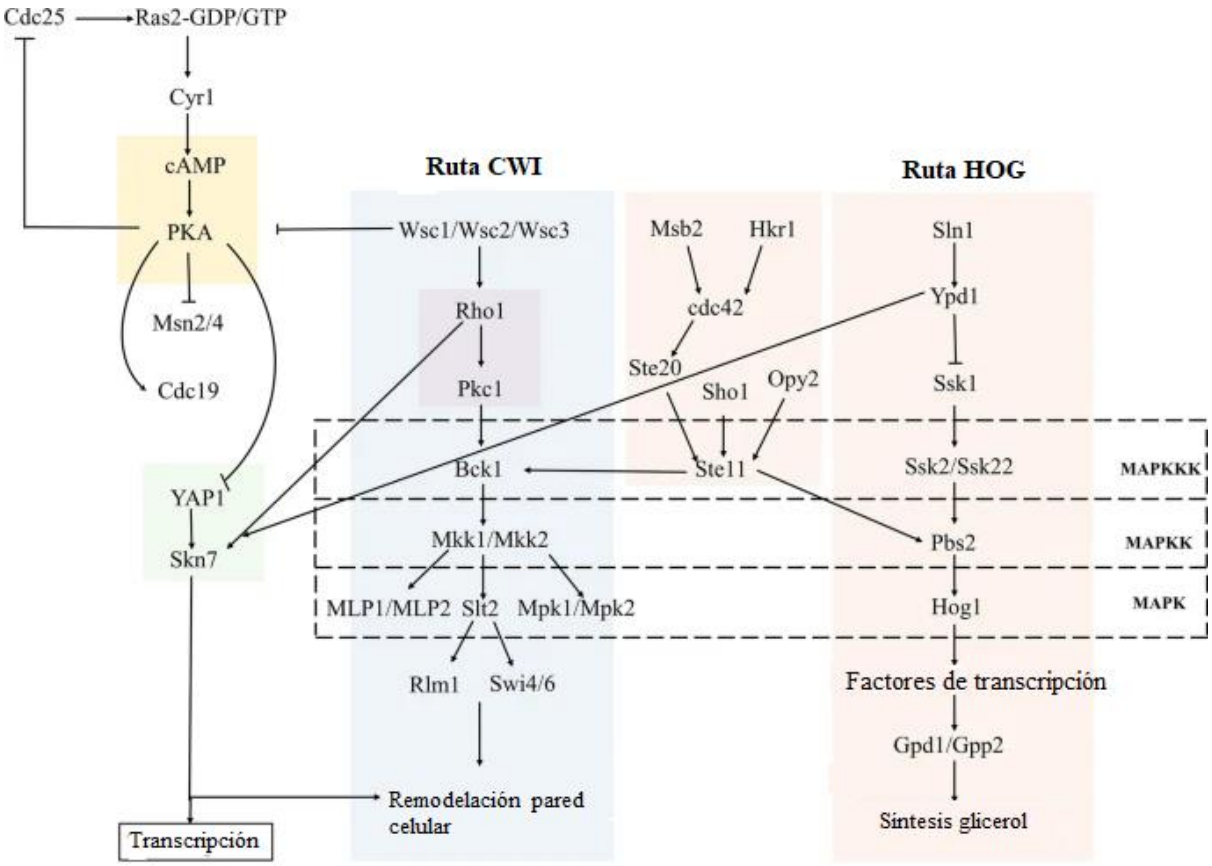


Figura 6. Principales vías de señalización para mantener la homeostasis celular. Regulaciones positivas (flechas) y negativas (líneas T). (Tomada y adaptada de Lin et al., 2021)

Estudios realizados en *S. cerevisiae* mediante análisis ómicos, han permitido relacionar procesos celulares con la respuesta al estrés (Li et al., 2022), sugiriendo

que las respuestas al estrés celular en *S. cerevisiae* se superponen en condiciones de estrés específicas, manteniendo algunas respuestas exclusivas para cada condición de estrés, lo que hace que los mecanismos de tolerancia al estrés ambiental sean más complejos (Lin et al., 2021). Las células emplean diferentes grupos de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) de varias maneras, de modo que organizan las actividades que intervienen en los mecanismos, como las proteínas de estrés y los factores de transcripción. La reprogramación de la expresión génica en levaduras se rige principalmente por los factores de transcripción de la respuesta al estrés general MSN2 y/o MSN4 que se unen a los elementos de respuesta al estrés en los promotores de sus genes objetivo (Saini et al., 2018). Se ha demostrado que Msn2p /4p regulan alrededor de 180 genes en respuesta al estrés térmico y al peróxido de hidrógeno (Gasch et al., 2000) y 136 genes cooperativamente bajo varias condiciones de estrés (Causton et al., 2001). Las cascadas MAPK son partes importantes de la red de señalización que regulan la adaptación, constituyendo importantes vías como la de glicerol de alta osmolaridad (HOG, por sus siglas en inglés) e integridad de la pared celular (CWI, por sus siglas en inglés) (Lin et al., 2021).

La vía HOG asociada generalmente a estrés osmótico, se compone de sensores asociados a la membrana, efectores citoplasmáticos y nucleares. Entre ellos el mediador de señalización central Hog1 juega un papel importante en la activación de respuesta a varios factores de estrés, entre ellos puede activar la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GPD1) y acumular glicerol como sistema de protección en el mantenimiento del equilibrio osmótico (Brandt et al., 2021), además puede activar el sistema de defensa antioxidante ante el aumento de sustancias reactivas de oxígeno (ROS), ajusta la proporción de las composiciones de esteroles en la membrana, mejorando la tolerancia térmica de las levaduras (Lin et al., 2021) y participa en la respuesta al estrés ácido (Ndukwe et al., 2020). En levaduras genéticamente modificadas para el consumo de D-xilosa, la eliminación de *HOG1* beneficia específicamente la utilización de D-xilosa, pero disminuye la capacidad de las células para montar una respuesta al estrés (Wagner et al., 2019).

La vía CWI media la expresión de genes de biogénesis y remodelación de la pared celular, se han encontrado los genes de esta vía positivamente regulados en respuesta al estrés por furfural y HMF (Li et al., 2022). El estrés ambiental causa daños

en la pared celular, que es la primera barrera de defensa en las levaduras, por lo que su regulación esta medida por el factor de transcripción *Rlm1* que induce la expresión de proteínas remodeladoras de la pared celular, incluidas la β-1,3-glucano sintasa, la transglicosilasa de quitina y la proteína de la pared celular O-glicosilada, para permitir cambios en la proporción de las composiciones de la pared celular y cambios en la reticulación de estas composiciones (Lin et al., 2021). Se describió que la vía HOG y la vía CWI tienen funciones superpuestas con el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS, por sus siglas en inglés) que es una de las vías críticas para la degradación de proteínas, en las células eucariotas, activada por estrés térmico (Meena et al., 2011).

La sobreexpresión de la vía YAP1/SKN7 y MSN2 se relacionaron con el aumento de la tolerancia de levadura a furfural y HMF, pues implican la regulación de agentes antioxidantes (Sasano et al., 2012). La mayoría de los genes regulados por YAP1 se clasifican en numerosas categorías funcionales de metabolismo redox, metabolismo de aminoácidos, respuesta al estrés, reparación del ADN y co-regulación con chaperonas (Lin et al., 2021). Fue demostrado que la sobreexpresión de YAP1 activó la transcripción de los genes de catalasas *CTA1* y *CTT1*, mejorando la tolerancia a furfural, pero no a HMF (Kim & Hahn, 2013), lo que sugiere que el consumo rápido de furfural se asocia a la acumulación de especies reactivas de oxígeno. Asimismo, se ha propuesto un mecanismo donde *Hap1p* interactúa con otros factores de transcripción en el promotor CTT1 durante el estrés por etanol (Stuecker et al., 2018). Además, *Yap1* y *Skn7* como factores significativos de señalización de respuesta de ROS también han demostrado participar en la reparación del rompimiento de la doble cadena de ADN (Lin et al., 2021).

La trehalosa es otro sistema en la respuesta al estrés ambiental. Este disacárido no reductor que actúa como carbohidrato de reserva y potencial protector contra el estrés en condiciones adversas. Su actividad protectora está relacionada con sus propiedades como alta hidrofilia, estabilidad química y la ausencia de formación de enlaces de hidrógeno internos lo que permite preservar la integridad de la célula frente a una variedad de tensiones ambientales y limitaciones nutricionales (Saini et al., 2018). En levaduras el mantenimiento del nivel de trehalosa intracelular requiere un equilibrio entre la síntesis y la degradación enzimática que esta mediado por un gran complejo enzimático que comprende cuatro subunidades y otras enzimas que

hidrolizan este azúcar (Ndukwe et al., 2020). La acumulación de trehalosa en el citosol ha sido inducida por el estrés oxidativo generado por la exposición a ácidos orgánicos y estrés térmico, la desecación y la congelación (Lin et al., 2021).

El umbral de tolerancia define la letalidad de un factor de estrés y la capacidad de adaptación del microorganismo. En levaduras expuestas a condiciones letales de concentración de ácido se induce la apoptosis, proceso que está modulado por categorías para su ejecución como la función mitocondrial, la transcripción de genes reprimidos por glucosa, la síntesis y modificaciones de proteínas, el tráfico vesicular para protección, o transporte y biosíntesis de aminoácidos, respuesta al estrés oxidativo, crecimiento y diferenciación celular, fosforilación de proteínas y desacetilación de histonas (Sousa et al., 2013). También se ha descrito la participación de vía de la señalización del objetivo de la rapamicina (TOR, por sus siglas en inglés) que es reconocido controlador central del crecimiento en eucariotas. Las alteraciones proteómicas sugieren una vinculación directa o indirectamente a una regulación dependiente de TOR e incluyen la captación, el transporte y la síntesis de aminoácidos (Guaragnella & Bettiga, 2021). Se ha relacionado los aminoácidos de cadena ramificada en las vías de detección de nutrientes reguladas por TOR indicando que la leucina (Leu) activa fuertemente esta vía de señalización (Takagi, 2019). En condiciones de estrés ácido los genes *ADE1*, *ADE13* y *ADE17* que ejercen control sobre la biosíntesis de purinas y la biosíntesis de aminoácidos, mostraron niveles de transcripción significativamente mayores mediante la suplementación con sulfato de zinc mejorando la producción de etanol en *S. cerevisiae* (Zhang et al., 2019).

En levaduras se han identificado mecanismos de respuesta al estrés, entre los cuales se encuentra la respuesta de estrés ambiental (o respuesta al estrés general provocada por muchos factores de estrés diferentes) y numerosos mecanismos específicos para factores de estrés particular (Saini et al., 2018). La activación de mecanismos de defensa y reparación está asociada al daño en macromoléculas celulares y/o potenciales redox que interrumpen las funciones celulares. La inducción de estos programas de respuesta puede proporcionar a la célula protección cruzada al estrés, es decir, resistencia al segundo estrés severo después de un tipo diferente de estrés primario leve (Święciło, 2016). Un ejemplo, es la respuesta al choque térmico (HSR, por sus siglas en inglés) que es un mecanismo de adaptación que contribuye a

la tolerancia de estrés múltiple, su activación se ha descrito en la exposición de las células al estrés térmico en donde se evidenció un exceso de generación de especies reactivas de oxígeno (Kitichantaropas et al., 2016). Esta respuesta mantiene la función de las proteínas actuando como acompañantes o ayudando en el plegamiento de proteínas y participa en la degradación de proteínas malformadas o no funcionales (Brandt et al., 2021). El factor de choque térmico Hsf1 es una proteína esencial que participa tanto en la HSR como en la adaptación al estrés oxidativo y la falta de glucosa, además se ha informado la participación de genes para proteínas de choque térmico (Hsp) en la termotolerancia inducida por exposiciones previas a condiciones leves de estrés térmico (Saini et al., 2018). En el estudio de la respuesta al estrés ácido, también se predijeron varios genes de proteínas de choque térmico como potenciales genes reguladores (Dong et al., 2017).

En la respuesta tardía al frio fueron inducidos genes (*HSP12, HSP26, HSP42, HSP104, YRO2* y *SSE2*) que codifican miembros de la familia de proteínas de choque térmico, además fueron observados los genes que también se han inducido por el estrés oxidativo e implicados en los procesos de desintoxicación, como *GTT2* (glutatión transferasa), *HYR1* y *GPX1* (isoformas de glutatión peroxidasa), *TTR1* (glutatión reductasa) y *PRX1* (tiorredoxina peroxidasa) (Schade et al., 2004). Asimismo, la respuesta al estrés por bajas temperaturas ha mostrado un aumento en los niveles de transcripción de genes antioxidantes y la expresión de un conjunto de genes implicados en la respuesta al estrés oxidativo, así como una sobreexpresión de genes vinculados al metabolismo de carbohidratos además de la organización de la pared celular (García-Ríos et al., 2016; 2022). Estudios de la respuesta transcripcional al frío evidenció genes que desempeñan funciones importantes en la adaptación o tolerancia de las células de levadura a una condición de baja temperatura, así como a otras condiciones de estrés (Sahara et al., 2002). Otros datos que validan la tolerancia a estrés adquirida (o protección cruzada) fueron aportados al comparar la respuesta transcripcional tardía al frio y la respuesta a estrés ambiental en donde 111 genes mostraron una superposición significativa (Schade et al., 2004). Sin embargo, estos mecanismos de respuesta a diferentes factores de estrés pueden diferir de una especie a otra. Enjalbert y colaboradores (2003) estudiaron la respuesta transcripcional de *C. albicans* a diferentes factores de estrés, describiendo la ausencia tanto de la respuesta al estrés general como de la obtención de protección cruzada a

estrés, en contraste con los mecanismos descritos en levaduras modelos como *S. cerevisiae*. Adicionalmente, se ha demostrado que los genes necesarios para la resistencia basal y adquirida no se superponen en gran parte, lo que sugiere que los mecanismos subyacentes a la resistencia al estrés basal y adquirido son distintos (Stuecker et al., 2018).

Las dinámicas anteriormente mencionadas de las levaduras para adaptarse a las perturbaciones ambientales son variadas y específicas para cada microorganismo. Aunque se ha descrito en diferentes especies la conservación de las rutas y las subredes centrales del metabolismo, existe variación de las conexiones ascendentes y descendentes a otras redes celulares lo que conduce a diferencias específicas de resistencia al estrés en entornos adversos (Dragosits & Mattanovich, 2013). El interés por entender los mecanismos de muchos rasgos fisiológicos complejos para diferentes procesos industriales ha permitido el abordaje desde diferentes enfoques. Se ha descrito que la exposición prolongada de las células a estímulos no letales conduce posteriormente a la aclimatación, es decir, al establecimiento de un estado fisiológico en el que los mecanismos reguladores han resultado en una adaptación completa de la expresión del genoma a las condiciones ambientales (subóptimas), razón por lo que la implementación de estrategias de adaptación se han propuesto para desarrollar fenotipos de interés para la producción industrial de combustibles, productos químicos y materiales (Nielsen et al., 2015; Van Dijk et al., 2019). Durante la adaptación, los microorganismos utilizan diferentes mecanismos para mejorar la utilización de sustratos no preferidos y la tolerancia al estrés, mejorando así su capacidad de adaptación para el crecimiento y la supervivencia (Tan et al., 2022). La adaptación de corto plazo puede mejorar tanto la tolerancia microbiana a los inhibidores como el rendimiento fermentativo, afectando principalmente al metabolismo mediante cambios en la expresión génica (Tomás-Pejó & Olsson, 2015; Bianchini et al., 2022). Durante la adaptación a corto plazo, la aptitud puede estar relacionada con residuos de proteínas de larga duración, modificaciones epigenéticas y protección cruzada contra diferentes estreses (Tan et al., 2022). La integración de regímenes de cultivo diseñados a partir del conocimiento de la fisiología y la ecología de la levadura permiten cambios transcripcionales durante la adaptación y especialización en el experimento de laboratorio que pueden dar lugar a compensaciones o protección cruzada en entornos alternativos (Dragosits & Mattanovich, 2013; Mans et al., 2018).

En la actualidad el conocimiento acerca de las propiedades fisiológicas y respuesta fenotípicas al estrés en levaduras no-convencionales fermentadoras de D-xilosa es insuficiente para la selección de fenotipos particulares, y apropiados en la configuración de procesos biotecnológicos factibles para la transformación de la biomasa residual. En este trabajo a partir del estudio de la diversidad de levaduras transformadoras de D-xilosa asociadas a ecosistemas naturales no explorados y ambientes fermentativos de la caña de azúcar, se implementó una estrategia de cultivo para la preparación del inóculo como aporte a la descripción de los cambios fenotípicos asociados a factores de estrés (térmico, ácido y oxidativo) y su evaluación como alternativa para la selección de rasgos benéficos para las condiciones de fermentación en hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la respuesta fenotípica de la diversidad de levaduras transformadoras de D-xilosa, aisladas en ambientes naturales y fermentativos de Colombia, a condiciones de estrés en hidrolizados hemicelulósicos de bagazo de caña de azúcar aplicando un proceso de adaptación a corto plazo.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Describir la diversidad de levaduras aisladas en bosques de robles en los Andes Colombianos y su potencial para la transformación de la D-xilosa.

2. Seleccionar levaduras transformadoras de D-xilosa aisladas en ambientes naturales y fermentativos, tolerantes a las condiciones del hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar, basado en parámetros de crecimiento y productividad.

3. Comparar los parámetros de crecimiento y productividad en las levaduras seleccionadas, mediante una estrategia de adaptación en condiciones de estrés ácido, térmico y oxidativo.

CAPITULO 2: Diversidad de levaduras transformadoras de D-xilosa asociadas a bosques de robles en la región central de la cordillera oriental de los Andes Colombianos

Las levaduras son hongos unicelulares que participan en procesos importantes para la regulación de los ecosistemas y los ciclos biogeoquímicos a través de procesos de reciclaje de la materia orgánica. En estos ambientes naturales su adaptación y supervivencia también se encuentran relacionados con interacciones donde participan como mutualistas, competidores, parásitos y patógenos de plantas, animales, hongos y otros microorganismos presentes en estos nichos (Yurkov & Lachance, 2017). Estos microorganismos predominantemente ubicuos se han asociados a varios sustratos como frutos, madera, insectos, flores, agua, suelo entre otros (Kurtzman et al., 2011). El estudio de la diversidad de levaduras en diferentes ecosistemas naturales ha permitido establecer un alto potencial de la microbiota para su uso en la producción de bebidas, alimentos, ácidos orgánicos, enzimas, proteínas, biocombustibles, lípidos, pigmentos entre otros productos de valor (Kwak et al., 2019; Bergmann et al., 2019, Boekhout et al., 2021a).

Los azúcares de cinco carbonos (pentosas) están muy extendidos en la naturaleza y se encuentran principalmente formando matrices complejas, razón por lo que solo algunas levaduras presentan la maquinaria metabólica necesaria para utilizar esta fuente de carbono. La D-xilosa es el segundo monosacárido más abundante en la biomasa vegetal y su transformación hace parte del metabolismo de compuestos exógenos que normalmente no son constituyentes de las células de levadura (Ruchala & Sibirny, 2021). Se ha descrito que las levaduras que metabolizan la D-xilosa se aíslan como simbiontes de los intestinos de los escarabajos que se alimentan de lignocelulosa, asimismo, se han descrito asociadas a sustratos lignícolas exhibiendo además actividad de xilanasa (Cadete & Rosa, 2018; Morais et al., 2020; Nwaefuna et al., 2021). La diversidad metabólica de las levaduras ha sido relacionada a la evolución de propiedades biológicas en asociación con el entorno que, en una combinación de muchos factores, seleccionan conjuntos de rasgos o síndromes de rasgos que son compatibles con el nicho específico (Opulente et al., 2018).

El interés por la ecología microbiana de ambientes naturales y la contribución del desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación a los análisis filogenéticos ha permitido un aumento en las últimas décadas del número de especies descritas. Sin embargo, algunas estimaciones sugieren que solo conocemos el 1% del total de especies de levaduras que podrían existir (Boekhout et al., 2021a), lo que evidencia la necesidad de aumentar los esfuerzos en el estudio de ecosistemas aún no explorados para la descripción de microrganismos y en particular para levaduras. Estos organismos unicelulares se encuentran en un amplio rango geográfico y habitan en diferentes entornos lo que ha llevado a proponer su dispersión a través de distintos vectores, además pueden tener una distribución más restringida, ya sea geográficamente o por hábitats (Péter et al., 2017). En América del Sur, Brasil, Argentina y Ecuador han llevado a cabo importantes investigaciones para descubrir el potencial de la biodiversidad local de levaduras, no obstante, muchos hábitats inclusive algunos amenazados, siguen sin muestrearse y muchas otras partes solo se estudian superficialmente (Boekhout et al., 2021a).

Alrededor del mundo, 36 áreas califican como *hotspots* que son ecosistemas con alto endemismo y diversidad, sus hábitats intactos representan solo el 2.5% de la superficie terrestre, pero sustentan a más de la mitad de las especies de plantas del mundo como endémicas (CI, 2022). De acuerdo con el Fondo de Alianzas para los Ecosistemas Críticos (CEPF por sus siglas en inglés) el *hotspot* más diverso del mundo, por riqueza de especies y endemismo, son los Andes tropicales que comprende las montañas de los Andes de Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y las porciones tropicales del norte dentro de Argentina y Chile. Los ecosistemas andinos aportaron notablemente a lo largo de las escalas de tiempo a la rica diversidad de plantas de la Amazonía y América Central (Pérez-Escobar et al., 2022).

En el territorio colombiano se tiene el mayor número de plantas andinas, relacionado esto con un mayor número de eventos de dispersión biogeográfica desde otras regiones neotropicales hacia los sistemas montañosos andinos, en donde los bosques de niebla mostraron más intercambios de plantas vasculares que cualquier otra región andina (Pérez-Escobar et al., 2022). En esta importante región geográfica del mundo se encuentra de manera predominante el roble, un árbol perteneciente a la familia Fagaceae con dos especies reportadas *Quercus humboldtii* y *Colombobalanus*

excelsa (especie endémica), alcanzando su límite sur en las cordilleras andinas de Colombia (Pulido et al., 2006). Colombia ocupa en el mundo el cuarto lugar en riqueza de especies de plantas, el quinto lugar en mamíferos, el primer lugar en aves, el tercero en reptiles y el segundo en anfibios, peces de agua dulce y mariposas, razón por la que se considera un país megadiverso y en su territorio más de 1000 especies están amenazadas por acciones antrópicas (Rodríguez-Zapata & Ruiz-Agudelo, 2021). Esta riqueza es relevante para el estudio de levaduras si se consideran los dos sistemas ecológicos propuestos por Lachance (2006), levaduras-insectos florícolas y levaduras-flujos de plantas, para estimar el número total de especies existentes. Sumado a esto, la mayoría de las especies descritas en las últimas dos décadas se encontraron en material vegetal (41,6%) o en asociación con insectos (17,1%) (Boekhout et al., 2021a). Sin embargo, la información de levaduras asociadas a ambientes naturales aún se encuentra poco estudiada en el país.

2.1 Materiales y Métodos

2.1.1 Muestreo

Para la selección de las levaduras cultivables estudiadas en este trabajo, se realizó un muestreo por transectos (distancia media 8 m) en dos reservas naturales ubicadas en la región central de la cordillera oriental de los Andes en Colombia. Las muestras ambientales (58 muestras, Figura 7) de corteza de robles (*Quercus humboldtii*) (20), corteza de árboles (7), madera en descomposición de roble (*Q. humboldtii*) (10) y madera en descomposición de vegetación asociada al ecosistema (21), fueron colectadas en bolsas de plástico estériles (aproximadamente 5 g) y transportadas con refrigeración (4 °C) hasta el laboratorio donde fueron procesadas dentro de las siguientes 24 h al muestreo, en medios selectivos de cultivo.

Parque Natural Chicaque

Es una reserva natural privada que se constituye de 300 ha de selva subandina o "Bosque de Niebla" en un gradiente altitudinal desde 2.000 a 2.700 m, con transición al piso o selva andinos. Presenta un régimen de precipitaciones de tipo bimodal aproximadamente 2000 mm de precipitación. Las máximas precipitaciones se presentan en marzo-abril-mayo y otro pico de lluvias en octubre-noviembre. Los meses más secos son junio-julio y diciembre-enero. La humedad relativa fluctúa entre el 75 y 86%. Se estima una temperatura media mensual entre 14.6 °C y 15.3 °C. Dentro de la vegetación presente en este ecosistema se encuentra el bosque denso de robles con *Quercus humboldtii*. Los fragmentos de robledal presentan buen potencial de regeneración en plántulas y juveniles. En el dosel el dominante absoluto es el roble, algunos individuos alcanzan alturas de 30-45 m, diámetros de tallo de hasta 1.5 m con potentes raíces tabloides (Rivera & Córdoba, 1998).

Parque Natural Cerro de Quinini

La reserva cerro del Quininí hace parte del distrito biogeográfico de selvas nubladas, occidentales de la cordillera oriental, tiene una extensión de 1947 ha. Pertenece a la provincia norandina, se localiza al sur occidente del departamento de Cundinamarca, entre los municipios de Tibacuy, Viota y Nilo. Se encuentra entre los 1500 y 2100 m.s.n.m, su temperatura fluctúa entre 16 °C y 26 °C y una humedad relativa media de 79%. La precipitación anual tiene un rango entre 800 y 1000 mm (Salamanca & Escobar, 2016). Este parque natural presenta una diferencia en la estructura y composición al interior del bosque, marcada por robledales maduros, zonas de

sucesión temprana e intermedia y la presencia de un posible bosque mixto de lauráceas (Peña-Torres, 2016).

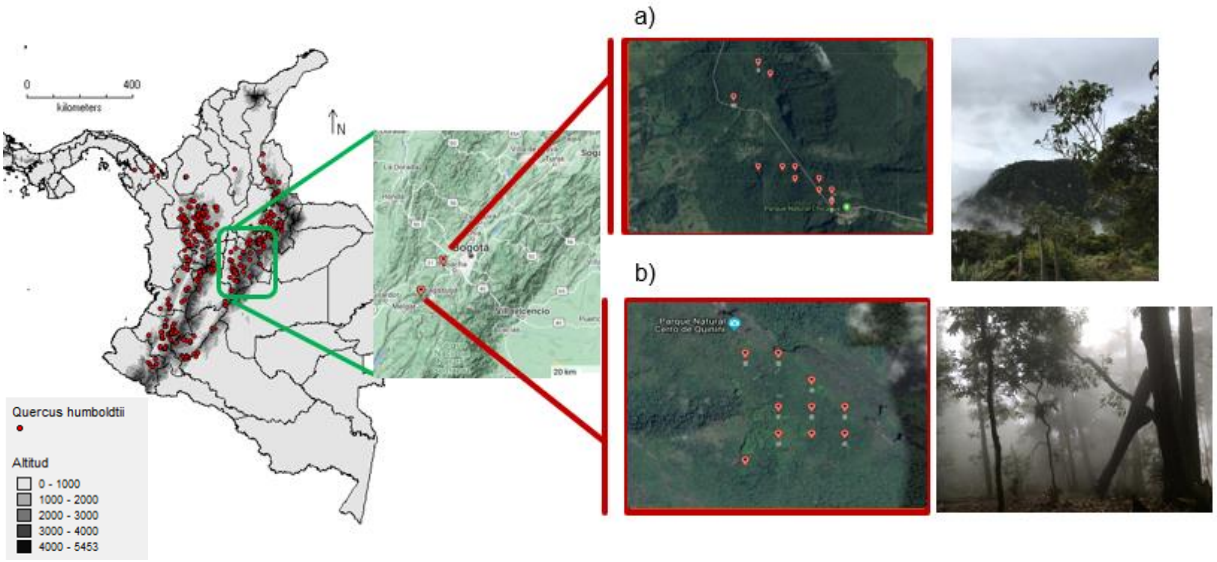


Figura 7. Georreferenciación de puntos de colecta por transectos. a) Colecta de 28 muestras en Parque Natural Chicaque. b) Colecta de 30 muestras en Parque Natural Cerro de Quínini. (adaptado de Palacio-Mejía, 2013)

2.1.2 Medio y condiciones de cultivo para aislamiento

Para el aislamiento un gramo (1 g) de cada muestra se añadió por separado a tubos Falcón que contenían 20 mL de medio YNB-xilano (xilano 1%, yeast nitrogen base-YNB 0.67%, cloranfenicol 0.02%, pH 5.0 ± 0.2) o 20 ml del medio YNB-D-xilosa (D-xilosa 1%, YNB 0.67%, cloranfenicol 0.02%). Los tubos se incubaron en un agitador orbital digital (Daihan Labtech CO., ModelLSI-1) a 150 rpm y 25 °C durante 3 a 30 días. De los tubos Falcón que presentaban turbidez del medio y crecimiento en el fondo, una alícuota de 0.5 mL fue transferida a tubos conteniendo 5 mL del medio con xilano o D-xilosa. Los tubos fueron incubados bajo las condiciones anteriormente descritas y de los tubos que presentaron crecimiento, una azada fue sembrada separadamente en placas que contenían 2% de agar y el medio con xilano o D-xilosa como fuente de carbono (Cadete et al., 2012). Las placas fueron incubadas a 25 °C hasta la observación del desarrollo de colonias.

Una colonia de cada morfotipo fue sistemáticamente purificada por medio de siembras sucesivas en placa con medio YM (que contiene glucosa 1%, extracto de levadura 0.3%, extracto de malta 0.3%, peptona bacteriológica 0.5%, agar 2% y pH

5.5). Las levaduras aisladas fueron preservadas en medio liquido GYMP (que contiene glucosa 2%, extracto de levadura 0.5%, extracto de malta 1%, NaH_2PO_4 0.2%) con 20 % de glicerol a – 80 ºC.

2.1.3 Caracterización molecular de levaduras aisladas de bosques de robles en la región central de la cordillera oriental de Colombia

Las levaduras obtenidas en los aislamientos fueron agrupadas morfológicamente de acuerdo con las características microscópicas y macroscópicas. Para todos los aislados fue realizada la extracción de ADN total.

Extracción de ADN total

Colonias puras de las levaduras fueron previamente crecidas en medio sólido YM a 28 °C por 48 h. Biomasa de cada levadura fue suspendida en 100 µL de tampón de lisis (5% de solución de Tris 1M + HCl; 1% de solución de EDTA 0.5M; 2% de solución de NaCl 5M; 10% de solución de SDS a 10% y 82% de agua destilada) en microtubo. Se realizó homogenización en vortex e incubación en baño seco a 65 °C por 30 min. En seguida, fueron adicionados 200 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), homogenizando por inversión y centrifugando a 7000 x g por 10 min. Después el sobrenadante fue retirado usando una micropipeta y transferido para otro microtubo, con adición de isopropanol v/v (~ 80 µL). El microtubo fue dejado en reposo a temperatura ambiente por 15 min, para precipitación del ADN. Después de este tiempo fue centrifugado a 7000 x g por 10 min y el sobrenadante fue descartado por inversión. En seguida fueron adicionados al microtubo 200 µL de etanol 70% y nuevamente se centrifugó a 7000 x g por 10 min el etanol fue retirado por inversión. Los microtubos se conservaron abiertos en temperatura ambiente *overnight*, para la total evaporación del etanol. Posteriormente, el *pellet* de ADN fue suspendido en 50 µL de tampón TE pH 8.0 (0.5 M EDTA en buffer 1M Tris-Cl, pH 8.0) en. El ADN fue cuantificado en espectrofotómetro (NanoDrop 1000®) y almacenado a -20 °C.

PCR de las regiones de microsatélites $(GTG)_5$

Cada grupo de levaduras con características morfológicas similares fueron sometidos a agrupamiento molecular mediante PCR de las regiones de microsatélites con el iniciador $(GTG)_5$ (5’- GTGGTGGTGGTGGTG -3’) (Meyer et al., 1993). La reacción de

PCR (del inglés, *polymerase chain reaction*) se realizó usando 2,5 µL de tampón 10X, 1,5 µL de $MgCl_2$ (25 mM), 1 µL de dNTP 10 mM (2,5 mM cada uno), 2,0 µL de iniciador $(GTG)_5$ a 10 pmol/µL, 1,0 µL de ADN (300 - 500 ng/µL), 0,2 µL de Taq ADN polimerasa (5 U/µL), y agua ultrapura hasta completar un volumen final de 25 µL. La amplificación fue realizada con denaturación inicial a 94 °C por 3 min, seguido de 40 ciclos de 20 s con denaturación a 93 °C, 1 min de anillamiento del iniciador a 50 °C y 20 s de extensión a 72 °C, finalizando por 6 min a 72 °C. La amplificación por PCR fue verificada mediante electroforesis con gel de agarosa 1.5% a 90 mV por 50 min en tampón TBE 0.5 X (1 mM de EDTA en buffer 45 mM Tris-borato, pH 8.0). Los productos de PCR fueron cargados al gel adicionando una solución de GelRed™ y tampón de corrida 6X (1:1); para la visualización del ADN amplificado, se usó luz ultravioleta (312 nm) en un sistema de fotodocumentación (Vilber Lourmat, France). De acuerdo con los perfiles de bandas observadas los asilados fueron agrupados para la identificación taxonómica.

Amplificación de los marcadores moleculares (D1/D2, ITS, 18S)

Para un aislado de cada grupo de acuerdo con el perfil de bandas obtenido con el iniciador $(GTG)_5$, fue secuenciada la región D1/D2 de la subunidad mayor de rADN. La amplificación, fue realizada usando los iniciadores NL-1 (5′-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3’) y NL4 (5’-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3’) (Lachance et al., 1999; Kurtzman & Robnett, 2003). Para la región ITS (del inglés, *Internal transcribed spacer*) fueron utilizados los primers ITS-1 (5’-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’) y ITS-4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’) de acuerdo con White *et al*. (1990). La amplificación fue realizada con denaturación inicial a 95 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 15 s con denaturación a 95 °C, 25 s de anillamiento del iniciador a 54 °C e 20 s de extensión a 72 °C, finalizando por 5 min a 72 °C. Los amplicones que comprenden la región del gen 18S del ARNr se obtuvieron de acuerdo con Kurtzman & Robnett, (2003) NS-1 (5′-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3’), NS-3 (5′-GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC-3’), NS-4(5′-CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3’), NS-5B (5′-GGGTTCTGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGC-3’), NS-7A (5′-CTGGGCCGCACGCGCGCTACACTGAC-3’) y NS-8 (5′-TCCGCAGGTTCACCTACGGA-3’). La amplificación fue realizada durante 36 ciclos de PCR con desnaturalización a 94 °C durante 1 min, hibridación a 52 °C y extensión

a 72 °C durante 2 min, con la extensión final durante 10 min. Las reacciones de PCR para todas las regiones fueron realizadas en un volumen final de 50 µL conteniendo 5 µL de tampón de PCR 10X, 3,0 µL de $MgCl_2$ (25 mM), 2,0 µL de dNTP 10 mM (2,5 mM cada uno), 1,0 µL de cada uno de los iniciadores ITS1 y NL4 a 10 pmol/µL, 1,0 µL do ADN (150 ng/µL), 0,2 µL de Taq ADN polimerasa (5 $U.\mu L^{-1}$), y completando con agua ultrapura hasta un volumen final de 50 µL. La verificación de los productos de PCR fue realizada mediante electroforesis con gel de agarosa 1 % a 120mV por 20min en tampón TBE 0,5 X. Los productos de PCR fueron cargados al gel adicionando una solución de GelRed™ y tampón de corrida 6X (1:1); para la visualización del ADN amplificado se usó luz ultravioleta (312 nm) en un sistema de fotodocumentación (Vilber Lourmat, France).

Amplificación de las regiones codificantes (RPB1, XYL1)

Para especies cripticas en donde las regiones D1/D2 e ITS no permitieron la discriminación a nivel de especie, fue secuenciada la región codificante *RPB1* (*RNA polymerase II large subunit*) y *XYL1* (*xylose reductase*). La amplificación, fue realizada usando los iniciadores RPB1-Af (5'-GARTGYCCDGGDCAYTTYGG-3') (Stiller & Hall, 1997) y RPB1-Cr (5'-CCNGCDATNTCRTTRTCCATRTA-3') (Matheny et al., 2002); para el fragmento del gen XYL1, se usaron primers degenerados XYL1-forward (5'-GGTYTTYGGMTGYTGGAARSTC-3') y XYL1-reverse (5'-AAWGATTGWGGWCCRAAWGAWGA-3') (Urbina & Blackwell, 2012). El programa de amplificación por PCR para estas dos regiones se realizó según lo descrito por Urbina y Blackwell (2012). La reacción de PCR fue realizada en un volumen final de 50 µL conteniendo 5 µL de tampón de PCR 10X, 3,0 µL de $MgCl_2$ (25 mM), 2,0 µL de dNTP 10 mM (2,5 mM cada uno), 1,0 µL de cada uno de los iniciadores a 10 pmol/µL, 1,0 µL do ADN (150 ng/µL), 0,2 µL de Taq ADN polimerasa (5 U/µL), y completando con agua ultrapura esterilizada hasta un volumen final de 50 µL. La verificación de los productos de PCR fue realizada mediante electroforesis con gel de agarosa 1% a 120mV por 20min en tampón TBE 0,5 X. Los productos de PCR fueron cargados al gel adicionando una solución de GelRed™ y tampón de corrida 6X (1:1); para la visualización del ADN amplificado se usó luz ultravioleta (312 nm) en un sistema de fotodocumentación (Vilber Lourmat, France).

Purificación de los productos de PCR

Los productos de la amplificación de PCR fueron purificados por adición de 11,25 µL de EDTA (125 mM) y 141 µL de etanol absoluto a 47 µL del amplicón de interés. Esta solución fue homogeneizada por inversión y dejada en reposo a temperatura ambiente por 15 minutos, para la precipitación del ADN. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada a 7000 x g por 25 min y el sobrenadante fue descartado invirtiendo el microtubo. Fueron adicionados 120 µL de etanol 70% frio para lavar el ADN, se homogenizó por inversión y se realizó centrifugación 7000 x g por 15 minutos. El sobrenadante fue descartado y los microtubos fueron conservados a temperatura ambiente *overnight* para la evaporación total del etanol. Después, el ADN fue rehidratado en 10 µL de agua ultrapura esterilizada y el producto fue incubado a 37°C por 30 min. Posteriormente, el ADN fue cuantificado en espectrofotómetro (NanoDrop 1000®).

Reacción de secuenciación

Las reacciones de secuenciación fueron preparadas utilizando 1 µL de ADN purificado (entre 5 a 20 ng/ µL), 1 µL Big Dye V3.1 (Applied Biosystems, Forter City, CA), 1 µL de tampón 5X (Applied Biosystems, Forter City, CA), 1 µL de primer (5 pM) y 6µL de agua ultrapura, para un volumen final de 10 µL. Las reacciones fueron sometidas a 96 ºC por 1 min; 35 ciclos: denaturación: 96 ºC por 15 s; hibridización: 50 ºC por 15 s; etapa de extensión: 60 ºC por 4 min; bajando finalmente hasta 4 ºC. Después de la reacción, fue adicionado en cada pozo de la placa 1 µL de EDTA 125mM, 1 µL de acetato de sodio 3M y 50 µL de etanol absoluto, la placa fue sellada, llevada al vórtex por 10 a 15 s y dejada en reposo por 15 min. Luego la placa fue centrifugada por 45 min a 7000 x g a temperatura de 4 ºC. Posteriormente es retirado el sellante y se adicionó 100 µL de etanol al 70 %. Nuevamente la placa fue sellada y centrifugada por 15 minutos a 7000 x g a temperatura de 4 °C. El contenido de la placa fue retirado por inversión y fue realizado un spin con la placa abierta e invertida sobre papel. Después de esta etapa, la placa fue dejada abierta y cubierta con papel de aluminio durante 15 min para evaporación del etanol restante; la placa fue nuevamente sellada y llevada para el Laboratorio de Parasitología Celular y Molecular del Instituto René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, BH-MG Brasil) para la realización de la secuenciación usando el equipo automático ABI Prism 3130® (AppliedBiosystem) empleando el polímero POP7, de la FIOCRUZ.

Análisis de diversidad en bosques de robledales

Para el análisis de riqueza se realizaron curvas de acumulación de diversidad para cada uno de los parques naturales muestreados. Se calcularon curvas integradas de rarefacción/extrapolación basada en el tamaño de la muestra y en cobertura, con base en los números de Hill (qD) que incorporan la abundancia relativa y la riqueza de especies (Chao et al., 2012; Chao et al., 2014). Se realizaron extrapolaciones, con valores no mayores a 2 veces el tamaño real de la muestra. La comparación de los patrones del estimador entre particiones se realizó utilizando el intervalo de confianza de Hill del método de Bootstrap, como la media de 999 repeticiones. Las estimaciones se obtuvieron utilizando el paquete R "iNEXT" (Hsieh et al., 2019). Para comparar la riqueza de los dos locales de colecta y las diferentes fuentes de carbono implementadas en los medios de aislamientos fueron construidos diagramas de Venn.

2.1.4 Tamizaje de levaduras transformadoras de D-xilosa

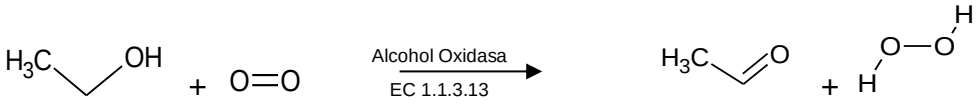
Condiciones del ensayo de fermentación

Las levaduras fueron crecidas en placa con medio YM a 28°C durante 48h. Para la preparación del inóculo una colonia de cada levadura fue crecida en medio liquido YPX-2% (el cual contiene extracto de levadura 1%; peptona 2 %; D-xilosa 2%, pH 5.5) por duplicado. El crecimiento se realizó en tubo de ensayo con tapón de algodón a 28 °C, 180 rpm por 48h. Las células de las levaduras fueron recuperadas por centrifugación a 7000 x g durante 15 minutos, lavadas dos veces con NaCl (0.85%) y se ajustó el inóculo hasta obtener una $OD_{600nm} \approx 0.2 \pm 0.02$. La fermentación se realizó en medio YPX-4% (el cual contiene extracto de levadura 1%; peptona 2 %; D-xilosa 4%, pH 5.5) con 10% de inóculo usando como unidad experimental microtubos (capacidad 5 mL) con volumen final de trabajo de 3 mL y sellado con Parafilm. La incubación fue realizada a 30°C, con agitación continua a 200 rpm por 72h.

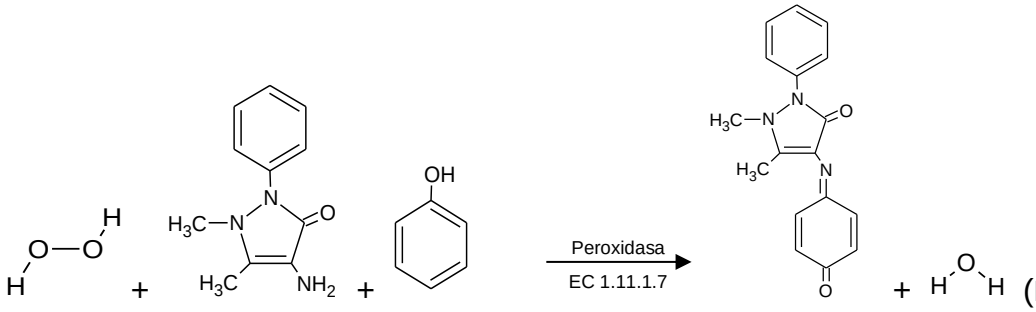
Métodos analíticos para la determinación de etanol y xilitol

La determinación de producción de etanol en el sobrenadante de la fermentación se realizó mediante el ensayo de doble enzima acoplada (oxidasa – peroxidasa) (Salgado et al., 2000; Rodionov et al., 2002; Qi et al., 2011), mediante la formación de un

compuesto coloreado como la quinoneimina (ecuación 1 y 2). La intensidad del color formado en presencia de etanol permitió realizar mediciones en lector de microplacas (TecanInfinite M200) a 505 nm (Abs_{505nm}), como parámetro de comparación debido a la especificidad del método, el cual no presenta contribución a la respuesta instrumental por la presencia de otros metabolitos del proceso fermentativo como ácidos orgánicos o alcoholes secundarios (Garcia-Acero et al., 2017).



(Ecuación 1)



(Ecuación 2)

La reacción enzimática se realizó en microplaca de 96 pozos mediante la adición de 100 µl solución RI (que contiene fenol 60 mM y EDTA 0.257 mM), seguido de 100 µl de la solución RII (que contiene peroxidasa 700 U/L, oxidasa 950 U/L y 4-aminoantipirina 14mM) y finalmente el sobrenadante de fermentación (10 µl), homogenizando la mezcla con la punta de la pipeta. Se realizó seguimiento de la formación de color durante 1 hora a 30°C.

Las muestras de sobrenadante donde no se evidenció presencia de etanol por el ensayo enzimático, fue analizado para la determinación de xilitol mediante HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) usando una columna de elución SUPELCOGEL C-610H HPLC 30cmx 7,8mm (Sigma-Aldrich) a 45 °C, con volumen de carga 20 µL, fase móvil H_2SO_4 5mM, velocidad de flujo de 0.6 mL/min y un detector de índice de refracción.

2.2 Resultados y Discusión

2.2.1 Aislamiento de levaduras asociadas a bosques de robles en la región central de la cordillera oriental de Los Andes de Colombia

Un total de 246 aislados fueron obtenidos con los medios empleados y las diferentes muestras ambientales de los dos lugares de colecta (Figura 8). Un total de 140 aislados fueron recuperados a partir del medio YNB con xilano como fuente de carbono y 106 crecieron en medio YNB con D-xilosa.

En el parque natural Cerro de Quínini fueron aislados el 46.7% de las levaduras totales recuperadas en este estudio. De otro lado el mayor número de aislados se obtuvieron de las muestras del parque natural Chicaque con un 53.3%. De los aislados recuperados en el parque natural Cerro de Quínini el 55.6% provienen de muestras de *Q. humboldtii*, así la corteza de roble y la madera en descomposición de roble fueron los sustratos con mayor aislados recuperados para este local de colecta con 31 y 30 levaduras respectivamente.

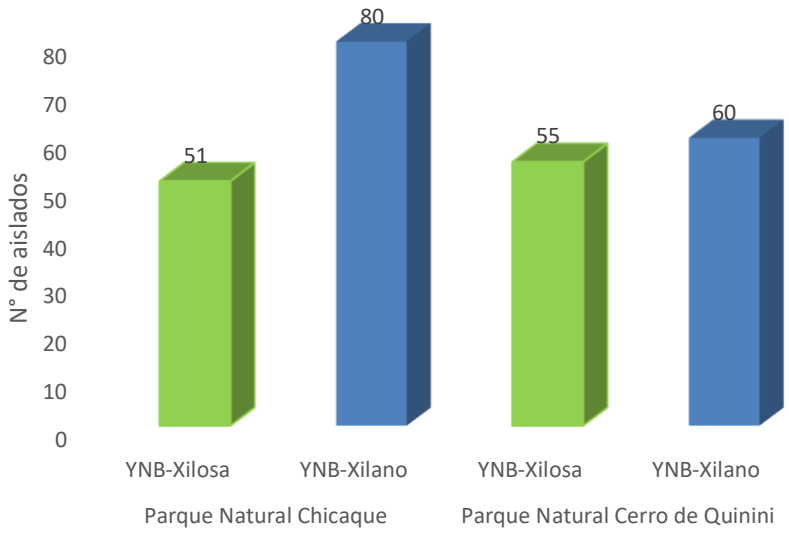


Figura 8. Número de asilados de levaduras obtenidos en los diferentes medios de aislamiento.

La madera en descomposición de vegetación asociada al bosque de robles fue el sustrato con mayor número de aislados en el Parque Natural Chicaque con un 46.6% de los microorganismos obtenidos. En la corteza de roble en esta misma reserva 48 levaduras fueron aisladas y el sustrato con menor número de aislados fue la madera en descomposición de roble con un valor de 24.

2.2.2 Caracterización molecular de la diversidad de levaduras asociadas a ecosistemas de bosques de robles en los Andes Colombianos

El agrupamiento molecular por medio de microsatélites permitió identificar 71 aislados como clones en el total de levaduras aisladas (Anexo A). El análisis de los datos de secuenciación, de varias regiones del ADN, permitió identificar los 175 aislados restantes. En las condiciones de aislamiento implementadas el 96.7% de las levaduras identificadas pertenecen a la división *Ascomycota* representados en 46 especies y solo el 3.3% se encuentran en la división *Basidiomycota* pertenecientes a 4 especies. La identificación taxonómicamente clasificó los aislados en 20 géneros (Figura 9), siendo el más representativo *Scheffersomyces* con 7 especies, seguido de *Candida* con 6 especies.

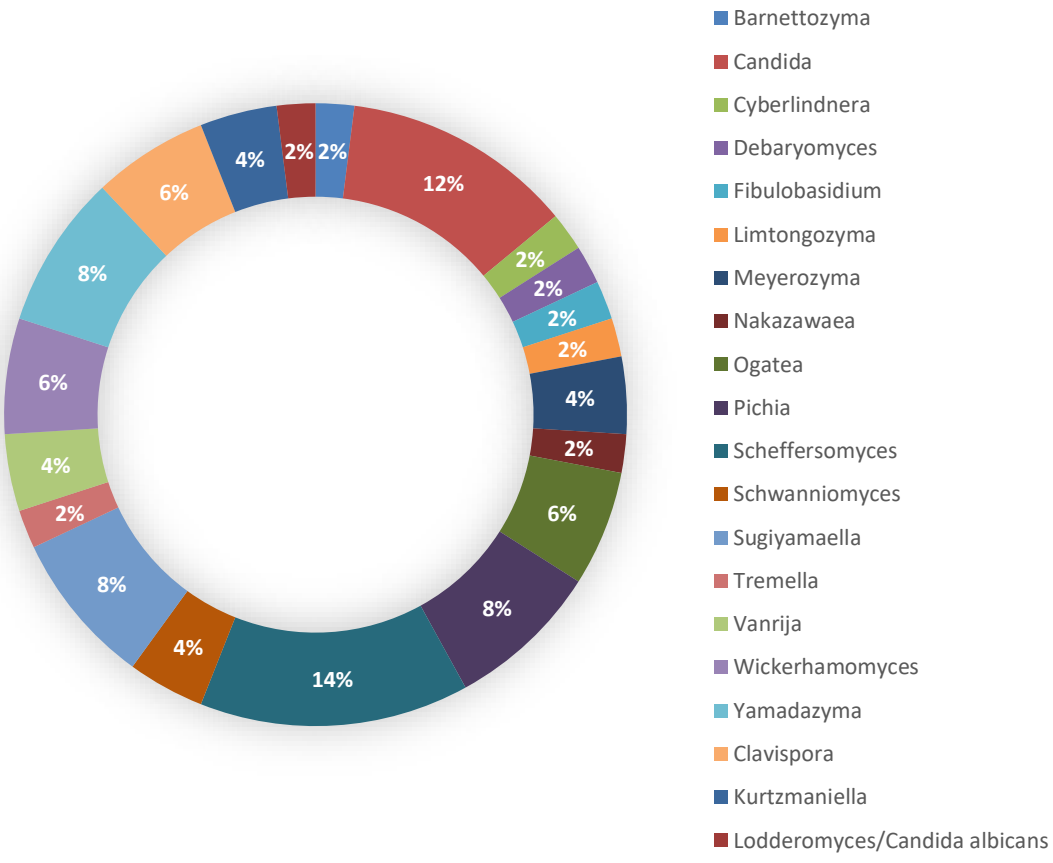


Figura 9. Porcentaje de especies pertenecientes a los géneros identificados para las levaduras aisladas en ecosistemas de bosques de robles.

El análisis de diversidad utilizando la curva de rarefacción (interpolación) y predicción (extrapolación) se evidenció una mayor cobertura en el PN Chicaque con 88 % de cobertura de acuerdo con el número de individuos obtenidos (Figura 10a),

para el PN Cerro de Quínini solo se alcanzó el 82%. Esto indica que se debe realizar un mayor esfuerzo en el muestreo para alcanzar la diversidad estimada por la prueba estadística para estos dos ecosistemas.

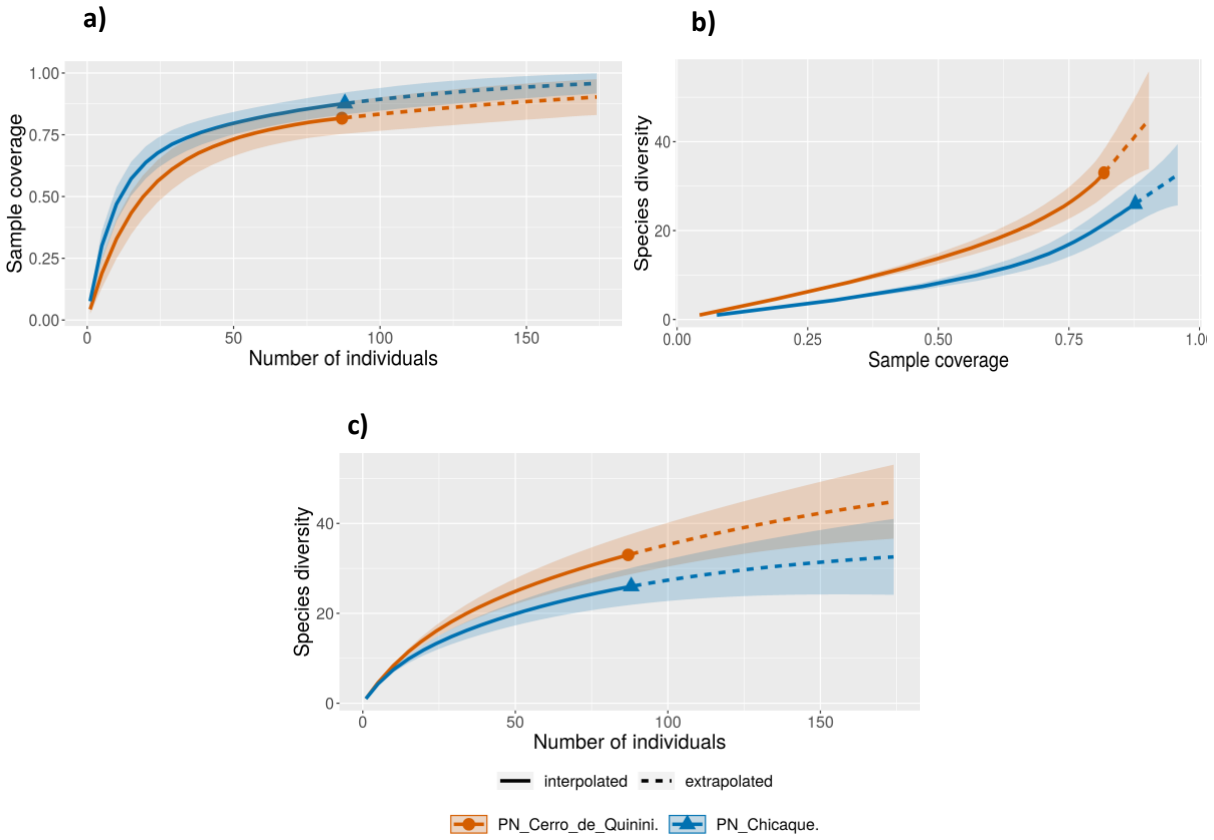


Figura 10. Comparación de rarefacción basada en el tamaño de la muestra (línea continua) y extrapolación (línea discontinua, el doble del tamaño de la muestra) para un orden q=0 de la riqueza de especies en dos reservas naturales de bosques de robles (PN Cerro de Quínini y PN Chicaque). El área sombreada representa los intervalos de confianza del 95% obtenidos mediante el método bootstrap sobre la base de 999 repeticiones.

El análisis de diversidad de especies por cobertura, en la curva de rarefacción basada en el muestreo (Figura 10b), señaló diferencia para los dos ecosistemas de robledales puesto que los intervalos de confianza no se sobreponen, siendo el PN Cerro de Quínini el que presentó una mayor diversidad de especies con una menor cobertura respecto al PN Chicaque. La diversidad de especies para los dos parques naturales aumentó continuamente con el incremento del número de individuos (abundancia) (Figura 10c) siendo considerablemente mayor el crecimiento en la parte inicial, contrario al efecto de la cobertura en la diversidad de especies.

Estos resultados de acumulación de diversidad se corresponden a las características de impacto de la actividad humana sobre estos ecosistemas. En el PN Cerro de Quínini el bosque de robledales es un relicto de bosque nativo (CAR, 2016) que presentó una mayor diversidad de especies con un número similar de individuos al del PN Chicaque, esta reserva presenta una baja intervención antrópica en el ecosistema, debido a que el área de muestreo para este estudio se sitúo en las zonas más altas de la reserva en donde no existen condiciones favorables para actividades agropecuarias (Peña-Torres, 2016). Por el contrario, el PN Chicaque es una reserva de carácter privado que ha sido impactada anteriormente por actividades humanas agropecuarias y la explotación y comercialización de maderas (García & Vanegas, 2021) ocasionando el cambio de la composición florística y fitosociológica a la cual están asociadas estos microorganismos, acciones que modifican el equilibrio ecológico y alteran los patrones de diversidad.

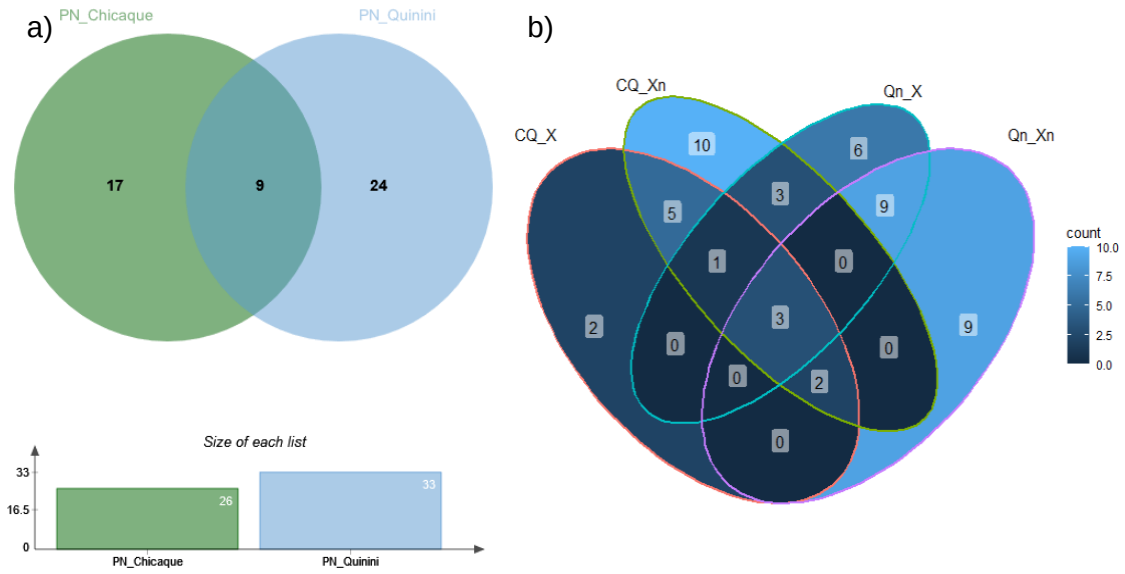


Figura 11. Distribución de especies aisladas en dos ecosistemas de bosques de robles (a) por localidad de muestreo y (b) fuente de carbono (CQ= PN. Chicaque; Qn= PN. Cerro de Quínini; X= D-xilosa; Xn= xilano)

Los resultados de identificación taxonómica evidenciaron la presencia de 50 especies de levaduras en estos ecosistemas de las cuales solo comparten el 18% de las especies entre los dos parques naturales (Figura 11a). El 48 % de las especies identificadas fueron halladas exclusivamente del PN Cerro de Quínini lo que se correlaciona con una mayor riqueza para este local en comparación con el PN

Chicaque donde el 34% de las especies fueron aisladas exclusivamente de este local. El 44% de las especies fueron aisladas como singletes (un único aislado), encontrando 10 especies en PN Chicaque y 12 especies en el PN Cerro de Quínini.

El medio de aislamiento con xilano como fuente de carbono, fue donde se obtuvo el mayor número de especies exclusivas para PN Cerro de Quínini y PN Chicaque siendo 18 y 15 especies, respectivamente (Figura 11b). Solo 3 especies fueron aisladas en todos los medios y los dos locales *Scheffersomyces illinoinensis*, *Scheffersomyces cryptocercus*/*Sc. virginianus* y *Sugiyamaella boreocaroliniensis*. En contraste, en el medio con D-xilosa como fuente de carbono el número de aislados únicos para cada uno de los ecosistemas de muestreo fue menor.

En el total de especies identificadas solo 19 especies de levaduras fueron aisladas en xilano, 23 especies fueron recuperadas tanto de medios con xilano como con D-xilosa y 8 especies solo en D-xilosa. La capacidad del 84 % de las especies de levaduras para metabolizar xilano puede estar relacionado con la adaptación metabólica de estas comunidades a los ecosistemas de bosques de robles, en donde este polisacárido representa del 10 al 35 % del peso seco total en maderas duras como el roble (Sharma et al., 2020), pudiendo servir de sustrato por descomposición y liberación de fuentes de carbono o por la asociación con insectos que habitan estos ambientes (Cadete et al., 2017a; Malassigné et al., 2021).

La implementación de secuencias del ADNr y otros genes han permitido la identificación taxonómica de levaduras gracias a la correlación relativamente buena entre el concepto de especies biológicas y la divergencia de secuencias (Boekhout et al., 2021b). Frente al uso de la región D1/D2 (aprox. 600pb) Kurtzman y colaboradores (2011) definieron que los congéneres pueden diferir en hasta tres sustituciones de nucleótidos y las especies difieren en seis o más sustituciones. Otro código de barras del ADN ampliamente utilizado para la diferenciación de especies es la región del ITS como un primer diagnóstico. De las cincuenta especies identificadas en este trabajo (Tabla 1) 35 de ellas coincidieron en el alineamiento de las secuencias, de especies que anteriormente han sido reportadas y depositadas en el banco de datos (GenBank). Otras 15 especies presentaron más de tres diferencias nucleotídicas en la región de LSU e ITS con la especie más próxima cuando se realizó la comparación en la base de datos del GenBank, lo que sugiere que posiblemente son especies

nuevas pertenecientes a los géneros *Candida, Ogatea, Pichia, Wickerhamomyces*, *Scheffersomyces, Sugiyamaella, Fibulobasidium* y *Tremella* (Tabla 2). Sin embargo, para algunas especies los marcadores de códigos de barras como el ITS presentan variación intraespecífica e intragenómica lo cual no proporciona suficiente precisión (Lücking et al., 2020). Desde la medida de distancia genética como herramienta para detectar y delimitar potenciales especies nuevas se han implementado el análisis de otras regiones del ADN para la interpretación filogenética desde el análisis de secuencia de múltiples locus (Boekhout et al., 2021b).

Tabla 1. Identificación molecular de levaduras y frecuencia de aislados por muestra y local de colecta.

Especie de levadura	**Parque Natural Chicaque**		**Parque Natural Cerro de Quínini**		**Total**
	YNB-D-xilosa	***YNB-Xilano***	***YNB-D-xilosa***	***YNB-Xilano***	
Barnettozyma californica	1	4			5
Candida sp. 1 (próxima *Candida galis)*			1		1
Candida sp. 2 *(*próxima *Candida californica/Pichia Clade)*			1		1
Candida sp. 3		1			1
Candida sp. 4			1	1	2
Candida akabanensis (Clavispora)		1			1
Candida blattae (Clavispora)			2	1	3
Candida boidinii (Ogataea)		2	1		3
Candida boleticola (Kurtzmaniella)		2			2
Candida insectorum (Yamadazyma)			3	3	6
Candida intermedia (Clavispora)		2			2
Candida khao-thaluensis (Yamadazyma)				1	1
Candida melibiosica				5	5
Candida oleophila (Kurtzmaniella)		1			1

Especie de levadura	Parque Natural Chicaque		Parque Natural Cerro de Quínini		Total
	YNB-D-xilosa	***YNB-Xilano***	***YNB-D-xilosa***	***YNB-Xilano***	
Candida palmioleophila (Candida glaebosa)		1			1
Candida palmyrensis	1	2			3
Candida tammaniensis (Yamadazyma)				1	1
Candida tropicalis (Candida albicans/Lodderomyces)	1				1
Cyberlindnera maritima		1			1
Debaryomyces nepalensis				1	1
Fibulobasidium sp. (próxima *Fibulobasidium inconspicuum)*				1	1
Limtongozyma cylindracea				1	1
Meyerozyma elateridarum		3	1		4
Meyerozyma guilliermondii	1				1
Nakazawaea sp. (próxima *Nakazawaea holstii)*	4	5	5		14
Ogataea sp. 2 (próxima *Candida nanaspora)*			1	2	3
Ogatea sp. 1 (próxima *Ogataea histrianica)*		1			1
Pichia kluyveri	1	1			2
Pichia membranifaciens	7	2		1	10
Pichia sp. (próxima *Pichia membranifaciens)*		1			1
Scheffersomyces amazonensis			2		2
Scheffersomyces coipomensis	3	4			7
Scheffersomyces sp. 1 (Próxima *Scheffersomyces coipomensis)*			1	1	2

Especie de levadura	Parque Natural Chicaque		Parque Natural Cerro de Quínini		Total
	YNB-D-xilosa	***YNB-Xilano***	***YNB-D-xilosa***	***YNB-Xilano***	
Scheffersomyces sp. 2 (Próxima *Scheffersomyces queiroziae)*				1	1
Scheffersomyces sp. 3 (Próxima *Scheffersomyces titanus)*				1	1
Scheffersomyces illinoinensis	1	1	4	4	10
Scheffersomyces cryptocercus/virginianus	7	10	5	5	27
Schwanniomyces polymorphus var. africanus	1	2		1	4
Sugiyamaella boreocaroliniensis	5	4	5	2	16
Sugiyamaella carassensis			1		1
Sugiyamaella smithiae			1	4	5
Sugiyamaella sp. (Próxima *Sugiyamaella valdiviana)*			1	2	3
Tremella sp. (próxima *Tremella fuciformis)*			2		2
Vanrija humicola			1	1	2
Vanrija pseudolonga		1			1
Wickerhamomyces arborarius				1	1
Wickerhamomyces hampshirensis	1	1			2
Wickerhamomyces lynferdii			1		1
Wickerhamomyces sp. (próxima *Candida quercuum)*		1	3		4
Yamadazyma tenuis			1	2	3
				Total	**175**

Cuatro especies ya descritas pertenecientes al género *Scheffersomyces* fueron identificadas en este estudio. Este género fue propuesto a partir del análisis

concatenado del conjunto de datos de ARNr de LSU (D1/D2) + SSU. En este clado se ubicaron especies con un amplio espectro de fermentación de azúcares, donde *Sc. stipitis* (anteriormente *Pichia stipitis*) fue denominada especie tipo (Kurtzman & Suzuki, 2010). Sin embargo, más recientemente para este grupo taxonómico la diferenciación filogenética de especies cripticas ha sido propuesto a partir del análisis multilocus de la región variable D1/D2 de LSU, región ITS y los genes *RPB1* y *XYL1* (Urbina & Blackwell, 2012). *Scheffersomyces amazonensis* (anteriormente *C. amazonensis)*, fue aislada exclusivamente en el PN Cerro de Quínini y solamente de madera en descomposición, que corresponde al sustrato reportado anteriormente para esta especie en la Amazonia de Brasil (Cadete et al., 2016). *Scheffersomyces coipomensis* (anteriormente *C. coipomensis)* fue una especie exclusiva del PN Chicaque, asociada a madera en descomposición de roble y vegetación asociada al ecosistema, así como en la corteza de roble. Este microorganismo fue previamente reportado en Chile asociado a madera podrida (Ramírez & González, 1984; Valdes et al., 2020). *Scheffersomyces illinoinensis* fue aislada en los dos locales muestreados en este estudio, pero solo asociada a *Q. humboldtii* tanto en corteza como en madera en descomposición del árbol, en su descripción Urbina y Blackwell (2012) identificaron esta levadura asociada a madera parcialmente podrida de otras especies de robles en Estados Unidos. La especie en este género con mayor ocurrencia (número de aislados) aún no ha sido identificada hasta nivel de especie con las regiones hasta ahora secuenciadas (ITS, D1/D2 y *RPB1*) dada la alta identidad entre estas dos especies crípticas *Scheffersomyces cryptocercus* y *Scheffersomyces virginianus.* La separación de *Scheffersomyces cryptocercus* como especie única fue determinada por la reconstrucción filogenética multilocus usando el gen *XYL1* (Urbina et al., 2013) que no ha sido posible amplificar en estos aislados. Esta especie fue abundante en los dos parques naturales asociada con madera en descomposición de roble y vegetación asociada y la corteza del roble, sustratos que están asociados con insectos lignícolas de los cuales se han aislado varias levaduras fermentadoras de D-xilosa (Urbina et al., 2013, Blackwell, 2017). Tres posibles especies nuevas relacionadas con este taxón han sido aisladas en estos ecosistemas. *Scheffersomyces* sp.1 fue aislada exclusivamente del PN Cerro de Quínini en muestras de madera en descomposición y corteza de roble. Esta levadura difiere de la especie más próxima *Sc. coipomensis* en la región concatenada de ITS y LSU del gen ARNr por 16 nucleótidos, en la región del gen RPB1 presenta 67 nucleótidos de diferencia y 3 gaps y del gen XYL1 difiere

en 23 nucleótidos. *Scheffersomyces* sp.2 fue aislada como singlete de madera en descomposición en el PN Cerro de Quínini y presenta una diferencia de 12 nucleótidos en la región concatenada de la región ITS y LSU del gen ARNr con la especie más próxima *Sc. queiroziae* y 75 nucleótidos en la región del gen *RPB*1 con 3 gaps. *Scheffersomyces* sp.3 fue asilada como singlete de madera en descomposición de *Q. humboldtii* en el PN Cerro de Quínini, difiere de la especie más próxima *Sc. titanus* en la región del LSU por 3 nucleótidos y en la región ITS por 7 nucleótidos y 1 gap. Otras regiones están siendo secuenciadas para su completo delineamiento filogenético. Los resultados de dominancia de este género en estos ecosistemas abarcan el 28.6% de los aislados totales, y se correlaciona con los sustratos anteriormente citados en la literatura para especies descritas en este taxón y su caracterización como fuertes fermentadoras de D-xilosa (Jia et al., 2020).

El segundo género más encontrado fue *Candida* que es altamente polifilético y contiene más de 30 clados filogenéticos en donde se distribuyen aproximadamente 300 especies (Boekhout, et al., 2021a). Dos especies ya descritas y aún designadas en este taxón fueron identificadas, además de cuatro posibles especies nuevas. En el PN Chicaque se aisló de manera exclusiva *Candida palmyrensis* a partir de muestras de corteza de *Q. humboldtii* y madera en descomposición, previamente esta especie ya se había aislado de la superficie corporal y galerías del escarabajo *Xyloterinus politus* en roble negro en Estados Unidos (Suh, & Zhou, 2010). En contraste en el PN Cerro de Quínini fue aislada exclusivamente la especie de *C. melibiosica* principalmente de corteza del roble, esta levadura ya ha sido aislada en agua de mar, lagos, suelo y muestras clínicas (Loureiro et al., 2005; Medeiros et al., 2012; Monteiro Moreira & Martins do Vale, 2020). *Candida* sp.1 fue aislada en el PN Cerro de Quínini de corteza de roble está relacionada con *C. galis* con quien presenta una diferencia en la región LSU de 41 nucleótidos y 10 gaps y en la secuencia del ITS presenta una cobertura de 61% para esta región. *Candida* sp.2 fue aislada en PN Cerro de Quínini de madera en descomposición de *Q. humboldtii* y se encuentra relacionada con la especie *C. californica* (Clado *Pichia*) con la que presenta en la región LSU 20 nucleótidos de diferencia y 4 gaps, para la región ITS solo presenta el 78% de cobertura. *Candida* sp. 3 fue aislada como singlete de la corteza de roble en el PN Chicaque, presenta una baja cobertura con cepas tipo de levaduras ya descritas, para la región LSU la cobertura fue de 59% con la especie *Metschnikowia corniflorae* y en

la región ITS 46% con la especie *Saprochaete ingens*. Sin embargo, la cobertura aumenta al 99% con el aislado *Candida* A1179; una levadura aún no descrita aislada en Estados Unidos del escarabajo perforador de madera *Monarthrum mali*. En la región LSU presenta 6 nucleótidos de diferencia con 1 gap y en la región ITS presenta una diferencia de 7 nucleótidos de diferencia con 2 gaps, la identidad es del 99 % y 98 % para estas dos regiones, respectivamente. Estos resultados sugieren la posibilidad de que represente un nuevo género. *Candida* sp. 4 fue aislado en el PN Cerro de Quínini asociado a una muestra de exudado en una lesión sobre la corteza de *Q. humboldtii* que son síntomas característicos de la enfermedad producida por hongos fitopatógenos (Conrad et al., 2019). Esta posible especie nueva presenta en la región LSU una diferencia de 16 nucleótidos con la especie *Wickerhamomyces alni* y en el análisis de la región del gen *RPB1* la especie con mayor identidad es *W. ciferrii* con un 82%. Otras regiones deben ser secuenciadas para su correcto delineamiento filogenético.

Mediante análisis multigénicos especies asociadas al género *Candida* forman clados filogenéticos bien delimitados que han sido asignados como nuevos taxones (Daniel et al., 2014). En este trabajo fueron identificadas tres especies, *C. akabanensis*, *C. blattae* y *C. intermedia* que basados en el análisis multilgenico se ha sugerido que podrían asignarse en el taxón *Clavispora* perteneciente a la familia Metschnikowiaceae (Daniel et al., 2014). *C. akabanensis* y *C. blattae* fueron descritas asociadas a excrementos e intestinos de insectos, respectivamente (Nakase et al., 1994; Nguyen et al., 2007) y también fueron aislados como singletes de madera en descomposición en parques naturales de selva atlántica brasilera (Minas Gerais y Paraná) (Morais et al., 2020). Especies del clado *Yamadazyma* también hacen parte de la comunidad de levaduras en los robledales como *Y. tenuis* (antes *C. tenuis*) un microorganismo ampliamente estudiado para la fermentación de D-xilosa principalmente en la caracterización estructural y funcional de la enzima D-xilosa reductasa (Haase et al., 2017). Otras especies también relacionadas en este clado fueron obtenidas en este trabajo, *C. insectorum, C. khao-thaluensis* y *C. tammaniensis*, son especies que han sido reportadas en distintos sustratos como agua, plantas, animales, madera en descomposición e intestino de insectos y se ha relatado su potencial para la fermentación de diferentes azúcares y la producción de β-glucosidasa (Groenewald et al., 2011; Lopes et al., 2018; Endoh et al., 2020). Las

especies de la familia Debaryomycetaceae y clasificadas dentro del género *Kurtzmaniella* como *C. boleticola* y *C. oleophila* fueron aisladas exclusivamente en el PN Chicaque, los aislados de la primera especie se encontraron asociados a sustrato de *Q. humboldtii* como su corteza y la madera en descomposición, esto se relaciona con los primeros reportes de *C. boleticola* donde fueron asociados a cuerpos fructíferos de hongos implicados en la descomposición de árboles (Nakase, 1971). La segunda especie de este clado fue aislada de madera en descomposición de la vegetación asociada a este ecosistema, sustrato que ya había sido reportado por Morais y colaboradores (2020). En esta misma familia se encuentran levaduras que han sido propuesta como nuevas combinaciones trasfiriendo especies como *Meyerozyma elateridarum* (Yurkov et al., 2017b) y *Schwanniomyces polymorphus var. africanus* (Kurtzman & Suzuki, 2010) desde el género de *Candida* y *Debaryomyces,* respectivamente. Estas especies fueron recuperadas en los dos locales de muestreo asociadas a madera en descomposición en el caso de *M. elateridarum* y corteza del roble para *S. polymorphus var. africanus*. Otras especies de este grupo polifilético como *C. palmioleophila* (clado *C. glaebosa*) y *C. tropicalis* (*C. albicans*/*Lodderomyces*) fueron aisladas como singletes exclusivamente del PN Chicaque de la madera en descomposición del roble. *C. palmioleophila* y *C. tropicalis* son dos especies que se encuentran distribuidas en una amplia variedad de muestras ambientales y clínicas, presentan linajes relacionados como patógenos oportunista en fungemias en humanos y otros animales (Datta et al., 2015; Wang et al., 2021a; Khalifa et al., 2022) y también se encuentran linajes que han sido ampliamente estudiados en procesos biotecnológicos, para *C. palmioleophila* se ha caracterizado su potencial lipolítico y *C. tropicalis* se ha denominado una potencial especie productora de xilitol (Rincón et al., 2018; West, 2021).

El género *Ogataea* ha sido propuesto para albergar un grupo de levaduras metilotróficas y taxones estrechamente relacionados. Soportado en análisis multigénicos y con el creciente descubrimiento de nuevas especies pertenecientes al clado se ha realizado el reconocimiento de especies antes identificadas como *Candida* (Lu et al., 2017). De este taxón la especie *C. boidinii* fue identificada en los dos bosques de robledales asociadas a madera en descomposición de vegetación asociada al ecosistema. Morais y colaboradores (2020) reportaron la producción de etanol a partir de D-xilosa por linajes de *C. boidinii*, asociados a madera en

descomposición implementando como medio de aislamiento hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido. Una especie nueva *Ogatea* sp. 1 aislada como singlete en el PN Chicaque de madera en descomposición, esta presentó 96% de identidad con *O. neixiangensis* en la región ITS, y en la región LSU presenta diferencia de 35 nucleótidos y 11 gaps con *C. nanaspora*. En el PN Cerro de Quínini se aisló de corteza de árbol (*Anacardiaceae*) otra especie nueva *Ogatea* sp. 2. Esta especie evidenció estar estrechamente relacionada en las regiones ITS, LSU y 18S con el linaje *Ogataea* sp. UFMG-CA48.1 (acceso GenBank, KC832477, OL598077 y ON263220) aislada anteriormente de madera en descomposición usando medio YNB-xilano en la selva Atlántica de Brasil, lo cual indica que son linajes de la misma especie próximas a *C. nanaspora*.

Las levaduras del género *Wickerhamomyces* están ampliamente distribuidas en áreas tropicales, subtropicales, templadas y subpolares de todo el mundo (Nundaeng *et al*., 2021). Como en otros géneros varias de sus especies han sido transferidas desde el género *Candida* soportado en análisis multi locus. Linajes de cuatro especies pertenecientes a este taxón fueron identificados en este trabajo, solo *W. arborarius* fue aislado del PN Cerro de Quínini. Otras dos especies ya descritas *W. hampshirensis* y *W. lynferdii* fueron encontrados en el PN Chicaque. En este local también fue identificada una especie nueva *Wickerhamomyces* sp. que para la región LSU presenta una cobertura de 95 % con la especie *C. quercuum (*Clado *Wickerhamomyces)* con un 94 % de identidad y en la región ITS la cobertura fue del 100% con la especie *W. spegazzinii* con una identidad del 99 %. Especies de este género presentan capacidad para metabolizar una amplia variedad de sustratos lo que ha permitido estudiarlas para diversas aplicaciones biotecnológicas, aunque también se tienen registros de linajes con capacidad como patógeno oportunista (Nundaeng *et al*., 2021)

Sugiyamaella boreocaroliniensis fue la segunda especie con mayor ocurrencia presente en los dos lugares de colecta. Linajes de esta especie aislados de madera en descomposición en la selva Atlántica de Brasil mostraron capacidad para producir xilanasa (Morais et al., 2013); también ha sido aislada de excrementos de *Coleoptera* en Estados Unidos (Kurtzman,2007). *Sugiyamaella carassensis* y *Su. smithiae* fueron especies halladas exclusivamente en el PN Cerro de Quínini de sustratos asociados a *Q. humboldtii*, estas especies también fueron aisladas en Brasil de material

lignocelulósico y evidenciaron capacidad de asimilar la D-xilosa y presentar actividad xilanolítica (Lara et al., 2014; Sena et al. 2017). La especie *Sugiyamaella* sp. fue aislada en el PN Cerro de Quínini de madera de roble en descomposición y de corteza de árbol, y se relacionó en las regiones ITS y LSU con *Sugiyamaella* sp. UFMG-CM-Y610 aislado anteriormente de madera en descomposición usando medio YNB-celobiosa en la selva Atlántica de Brasil. Esta especie presentó una cobertura de 95% en la región ITS con 17 nucleótidos de diferencia y 12 gaps con la especie *Su. valdiviana* y una diferencia de 7 nucleótidos en la región LSU.

El clado *Pichia* alberga especies con capacidades muy diversas para fermentación de azúcares, así como algunas asimiladoras de metanol y se ha planteado la relación de otras especies de *Candida* con este género a partir del análisis filogenético multigénico (Daniel et al., 2014). La mayoría de aislados pertenecientes a este taxón fueron identificadas como *P. membranifaciens* y se asociaron con muestras de madera en descomposición principalmente, solo un asilado fue encontrado en la reserva de Cerro de Quínini aislado de corteza de roble (*Q. humboldtii*). Esta especie es considerada como un microorganismo de deterioro de los alimentos y bebidas pues se encuentra comúnmente en las frutas podridas y en las bebidas fermentadas (Kurtzman et al., 2011) y se ha descrito la capacidad de producir una 1,4-β-xilosidasa tolerante a etanol, pH y temperatura (Romero, et al., 2012). También se reconoce en algunos linajes un amplio espectro antibacteriano (Zhang et al., 2020). En el PN Chicaque también fueron identificados asilados de la especie *P. kluyveri* y una posible especie nueva aislada como singlete. *Pichia* sp. se encontró asociada a corteza de roble y presentó una diferencia de 15 nucleótidos y 12 gaps en la región LSU con la especie *P. membranifaciens* que solo presentó una cobertura de la región ITS del 77%.

Las especies *Barnettozyma californica, Meyerozyma guilliermondii* y *Cyberlindnera marítima* solo fueron aisladas en el PN Chicaque. Las dos primeras caracterizadas como buenas acumuladoras de lípidos y con actividades hemicelulolíticas y celulolíticas para *M. guilliermondii* (Ali et al., 2020) y producción de α-amilasa reportada para *B. californica* (Yan et al., 2021). *Cy. maritima* es una nueva combinación del clado *Cyberlindnera* propuesta recientemente para transferir *C. maritima* (Brysch-Herzberg et al., 2021). Esta especie ha sido recuperada de varias fuentes similares a las evaluadas en este estudio, como sustratos leñosos que se

pudren debido a la acción de los escarabajos y de las larvas de estos (Verkleij, 2020). También han sido reportados linajes de suelo de Los Andes patagónicos que fueron caracterizados como potenciales solubilizadores de fosfatos (Mestre et al., 2016). *Limtongozyma cylindracea* y *D. nepalensis* en contraste fueron recuperadas exclusivamente en el PN Cerro de Quínini de madera en descomposición y corteza de árbol respectivamente. *Limtongozyma* es un género propuesto recientemente en donde se transfirió la levadura lipolítica *C. cylindracea* soportado en el análisis filogenético basado en secuencias concatenadas del gen SSU rRNA, la región ITS y el gen LSU rRNA (Boontham et al., 2020). Linajes de *D. nepalensis* han sido asociados a muestras de suelo, madera podrida, fermentación del tabaco, sake y muestras relacionadas con manzana podrida (Kurtzman et al., 2011; Guamán-Burneo et al., 2015; Pappu & Gummadi 2016), como otras especies de la familia Debaryomycetaceae es una especie fermentadora de D-xilosa.

Los aislados identificados como *Nakazawaea* sp. fueron los de mayor ocurrencia entre las especies nuevas observadas en este trabajo (14 aislados). Estos fueron recuperados en los dos locales de colecta de corteza de roble (*Q. humboldtii*) y un solo linaje de madera en descomposición. Linajes de este género han sido aislados en ecosistemas forestales de sustratos asociados con insectos descomponedores de madera (Kurtzman et al., 2011) y la mayoría de las especies son descritas como asimiladores de D-xilosa (Polburee et al., 2017). *Nakazawaea* sp. presenta una identidad en la región LSU del 99 % con las secuencias de aislados identificados como *N. molendinolei*. Sin embargo, en el alineamiento con la cepa tipo de esta especie presenta una diferencia de 9 nucleótidos y 4 gaps en esta región (acceso GenBank JN688665.1) y tan solo el 90% de identidad en la región ITS (acceso GenBank NR_172220.1), por lo que se considera una especie aún no descrita que se encuentra próxima a *N. holstii*.

Un menor número de especies identificadas en este estudio pertenecen al grupo de basidiomicetos. Dos especies ya descritas fueron aisladas. La levadura oleaginosa, *Vanrija humícola* (antes designada como *Cryptococcus humicola*) fue recuperada exclusivamente en el PN Cerro de Quínini de muestras de madera en descomposición y corteza de árbol, para esta especie ya se ha descrito como sustrato el suelo y el intestino de termita (*Reticulitermes chinenesis*) que se alimenta de madera (Ali et al., 2021). *Vanrija pseudolonga* (sinónimo homotípico de *Cr. pseudolongus*) (Liu

et al., 2015) fue aislado como singlete en el PN Chicaque de madera en descomposición, especie que ha sido reportada de fuentes ambientales como árbol muerto y ambientes clínicos como las superficies dentro de la unidad de cuidados intensivos neonatales (Takashima et al., 2001; Heisel et al., 2019). Dos posibles especies nuevas del orden *Tremellales* fueron aisladas en el PN Cerro de Quínini de corteza de árboles asociados al ecosistema de robledales. *Fibulobasidium* sp. presenta una diferencia de 29 nucleótidos de diferencia y 12 gaps en la región ITS con la especie *Fi. inconspicuum* otras regiones deben ser secuenciadas para el delineamiento de la especie. Del género polifilético *Tremella*, donde se reconocen varias especies caracterizadas por ser parásito o asociado con otros hongos o líquenes (Fan et al., 2021), fue relacionada una posible nueva especie *Tremella* sp. que difiere en la región LSU con el hongo dimórfico *T. fuciformis* por 12 nucleótidos y en la región ITS por 18 nucleótidos y 8 gaps.

Tabla 2. Identificación de nuevas especies aisladas en bosques de robles en la región central de la cordillera oriental de los Andes Colombianos.

Especie/ Código colecta	Código UFMG	Código IBUN-UNAL	Especie más próxima/ Región secuenciada	Identidad (GenBank)	Gaps	Deposito GenBank
Wickerhamomyces sp. CQ16.3Xn; Qn10.1bX; Qn12.1X; Qn17.1X	UFMG-CM-Y7051	IBUN-03950	*Wickerhamomyces anomalus* (ITS/LSU)	864/988 (87%) (MH545921.1)	35	ON276360
Candida sp. 1 Qn14.3X	UFMG-CM-Y7052	IBUN-04084	*Candida galis* (LSU)	540/581 (93%) (NG_058980.1)	10	ON264698
			Candida galis (ITS)	244/269 (91%) (NR_151797.1)	5	ON311286
Candida sp. 2 Qn26.1X	UFMG-CM-Y7053	IBUN-04100	*Candida californica* (LSU)	519/539 (96%) (KY106378.1)	4	ON303734
			Candida californica (ITS)	299/321 (93%) (DQ104728.1)	13	ON303735
Ogataea sp. 1 CQ25.2Yn	UFMG-CM-Y7054	IBUN-03977	*Ogataea histrianica* (ITS/LSU)	956/1083 (88%) (HE799677.2)	40	ON303737
Ogataea sp. 2 Qn6.1Xn; Qn7.2.2Xn	UFMG-CM-Y7055	IBUN-04015	*Candida nanaspora* (LSU)	495/503(98%) (KY106595.1)	2	OR818024
			Candida nanaspora (ITS)	567/601 (94%) (NR_155574.1)	3	OR818029
			Candida nitratophila (SSU)	1679/1707 (98%) (NG_063498.1)	3	OR818030
Pichia sp. CQ23.1.1Xn	UFMG-CM-Y7056	IBUN-03963	*Pichia membranifaciens* (ITS/LSU)	627/642 (98%) (MK394163.1)	12	ON304001

Especie/ Código colecta	Código UFMG	Código IBUN-UNAL	Especie más próxima/ Región secuenciada	Identidad (GenBank)	Gaps	Deposito GenBank
Sugiyamaella sp.	UFMG-CM-Y7057	IBUN-04034	*Sugiyamaella valdiviana* (LSU)	407/414(98%) (KY106859.1)	0	
Qn15.4Xn; Qn26.2Xn; Qn1.2X			*Sugiyamaella lignohabitans* (ITS/LSU)	774/850(91%) (CP014503.1)	15	
Scheffersomyces sp. 1	UFMG-CM-Y7049	IBUN-04102	*Scheffersomyces coipomensis* (ITS/LSU)	1068/1084(99%) (LC120359.1)	0	ON306380
Qn27.3X; Qn9.4Xn			*Scheffersomyces coipomensis* (RPB1)	526/593 (89%) (KC507420.1)	3	
			Scheffersomyces coipomensis (XYL1)	460/483 (95%) (KC479705.1)	0	
Scheffersomyces sp. 2	UFMG-CM-Y7058	IBUN-04601	*Scheffersomyces queiroziae* (ITS/LSU)	1041/1053 (99%) (HM566445.1)	0	
Qn30.2.1Xn			*Scheffersomyces queiroziae* (RPB1)*	478/562(85%)	3	
Nakazawaea sp. CQ18.3X; CQ4.1Xn; CQ17.2Xn; CQ23.3Xn; CQ24.1Xn; CQ20.2X; CQ21.1X; Qn13.2X; Qn14.4X; Qn16.1X; Qn19.1X; Qn23.1X;	UFMG-CM-Y7059	IBUN-03998	*Nakazawaea holstii* (LSU)	431/439 (98%) (KY108638.1)	0	
			Nakazawaea ambrosiae (ITS/LSU)	976/1057 (92%) (MK508963.1)	23	ON306382
Tremella sp.	UFMG-CM-Y7060	IBUN-04064	*Tremella fuciformis* (LSU)	617/629 (98%) (NG_057910.1)	0	
Qn2,1X; Qn3,2X			*Tremella fuciformis* (ITS)	450/468 (96%) (NR_155936.1)	8	ON306398 (ITS/LSU)

Especie/ Código colecta	Código UFMG	Código IBUN-UNAL	Especie más próxima/ Región secuenciada	Identidad (GenBank)	Gaps	Deposito GenBank
Candida sp. 3 CQ23.2Xn		IBUN-03966	*Saprochaete ingens* (ITS/LSU)	341/399 (85%) (MK834541)	12	
Fibulobasidium sp. Qn7.2.1Xn		IBUN-04022	*Fibulobasidium inconspicuum* (ITS)	365/394 (93%) (NR_154599.1)	12	
Scheffersomyces sp. 3 Qn15.1Xn		IBUN-04032	*Scheffersomyces titanus* (LSU)	400/403(99%) (KP054262.1)	0	
			Scheffersomyces titanus (ITS)	443/452(98%) (NR_173253.1)	1	
Candida sp. 4 Qn12.2Xn		IBUN-04030	*Wickerhamomyces alni* (LSU)	414/430(96%) (KY110065.1)	1	
			Wickerhamomyces ciferrii (*RPB1*)	514/624(82%) (XM_011275251.1)	13	

* Región secuenciada en este trabajo

2.2.3 Tamizaje de levaduras con potencial para la conversión de D-xilosa

Todas las levaduras aisladas fueron evaluadas para la conversión de D-xilosa y clasificadas en tres grupos (productoras de etanol, productoras de xilitol y asimiladoras de D-xilosa) de acuerdo con su capacidad metabólica en las condiciones evaluadas.

Levaduras productoras de etanol

El metabolismo fermentativo de la D-xilosa hasta su conversión a etanol en las levaduras principalmente está relacionada con la vía bioquímica de las pentosas fosfato iniciando su transformación mediante la ruta metabólica de oxidorreducción D-xilosa reductasa/xilitol deshidrogenasa (XR/XDH) (Barros et al., 2020). Levaduras productoras de etanol fueron clasificadas en rangos de concentración (Figura 12) por comparación con la regresión lineal obtenida en el ensayo enzimático utilizando las soluciones patrón (Anexo B).

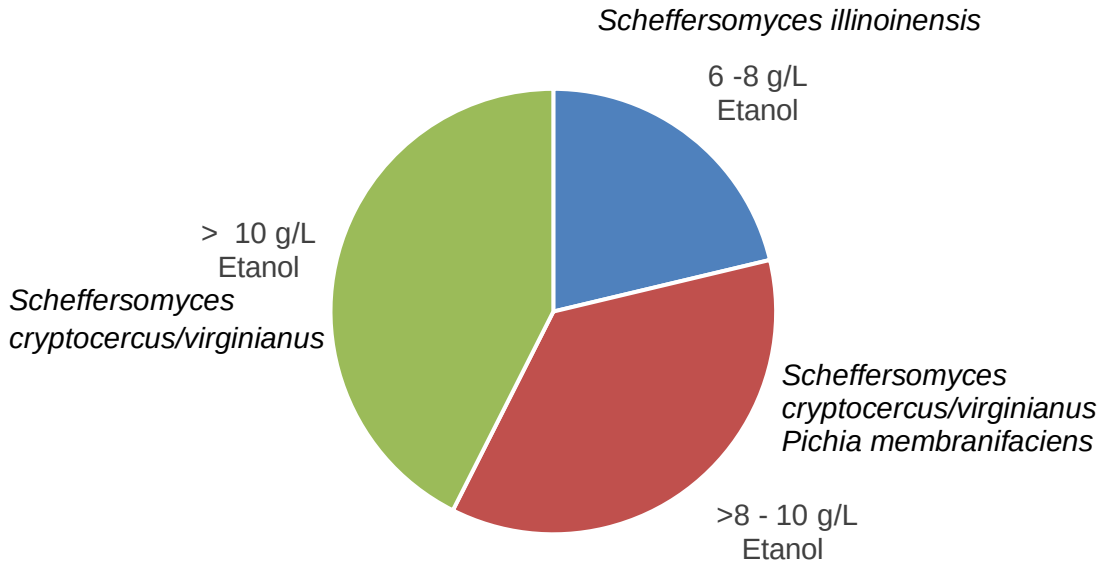


Figura 12. Especies de levaduras productoras de etanol a partir de la fermentación en medio YPX-4%. Concentración de etanol determinada a partir del ensayo enzimático.

La evaluación enzimática del sobrenadante para determinar la producción de etanol evidenció que 26.8% de los aislados producen más de 6 g/L en las condiciones implementadas en el ensayo. *Spathaspora passalidarum* UFMG-CM-Y469 fue usado como control positivo para la producción etanol obteniendo una concentración de etanol mayor a 10 g/L. Los 47 aislados fermentadores de D-xilosa pertenecen a dos

géneros (*Scheffersomyces* y *Pichia*) y tres especies. *Scheffersomyces illinoinensis* es una especie que se ubica en el subclado de levaduras fermentadoras de D-xilosa y está estrechamente relacionado con *Sc. stipitis* (Urbina & Blackwell, 2012). En este mismo taxón se relacionaron 27 aislados que presentan identidad con las especies crípticas *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* y evidenciaron ser potenciales productores de etanol a partir de D-xilosa dentro de un amplio rango de concentraciones. *Pichia membranifaciens* es una especie que ha sido asociada a ambientes fermentativos. Linajes de *P. membranifaciens* se han estudiado como elicitor para el control biológico de la descomposición poscosecha en frutos, además de su contribución en procesos de fermentación de la sidra y la producción de vinos (Wang et al., 2020; Gschaedler et al., 2021; Zhang et al., 2021).

Levaduras productoras de xilitol

La producción de xilitol a partir de la D-xilosa por levaduras es una ruta metabólica directamente relacionada con la enzima D-xilosa reductasa (XR) y su secreción esta influenciada por el balance de los cofactores redox (Granström et al., 2001). La cuantificación de la producción de xilitol, en el proceso de fermentación permitió clasificar potenciales linajes productores de xilitol en tres grupos (Figura 13)

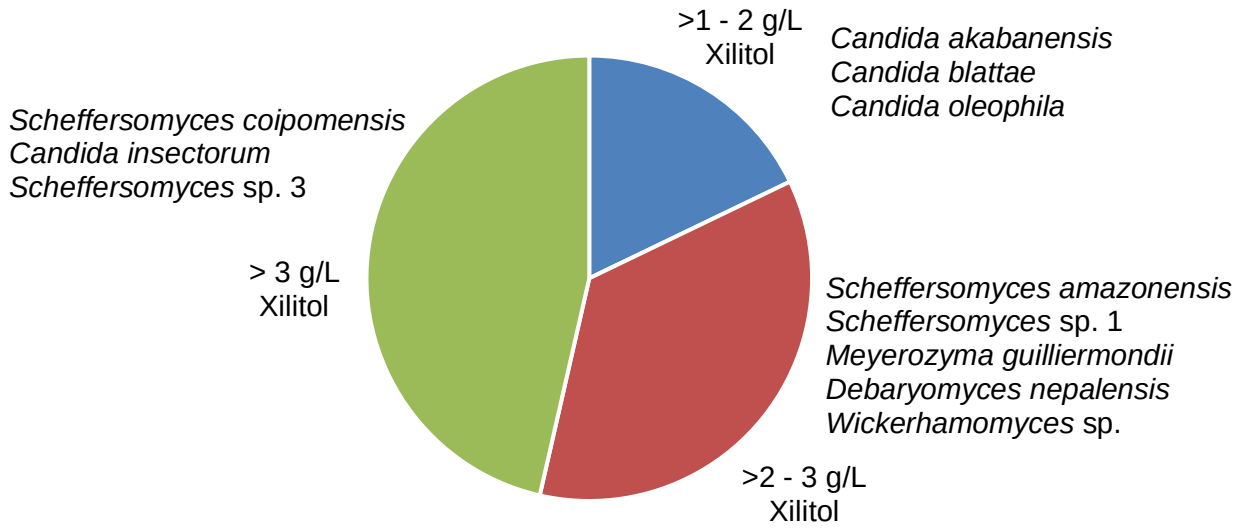


Figura 13. Especies de levaduras productoras de xilitol a partir de la fermentación en medio YPX-4%. Concentración de xilitol determinada a partir de HPLC.

El análisis del sobrenadante mediante HPLC permitió determinar que el 16% de los aislados producen más de 1 g/L en las condiciones implementadas en el ensayo. Los 28 aislados de levaduras transformadoras de D-xilosa pertenecen a 11 especies. Esto evidencia que hay mayor diversidad de especies en las levaduras aisladas que producen este metabolito. Cuatro especies pertenecen al género *Scheffersomyces*, dos de ellas especies nuevas. *Scheffersomyces* sp.1 es cercana a *Sc. coipomensis* especie de la cual también se evaluaron aislados. De la especie *Sc*. *coipomensis* no se tiene conocimiento de estudios previos de la capacidad de fermentación de D-xilosa, sin embargo, se ha reportado linajes con la capacidad de producir una baja concentración de etanol y acumular lípidos a partir de hidrolizados con mezcla de azúcares reductores (Dourou et al., 2021). *Scheffersomyces amazonensis* ha sido reportada como una potencial especie productora de xilitol en medio YPX y en hidrolizados de cascarilla de arroz (Cadete et al., 2016). La especie nueva *Scheffersomyces* sp.3 aunque está relacionada filogenéticamente con *Sc. titanus*, difiere en el metabolismo fermentativo de la D-xilosa generando xilitol como producto principal en contraste con la producción de etanol reportado para *Sc. titanus* (Liu et al., 2016).

Linajes de las especies *M. guilliermondii* y *D. nepalensis* han sido ampliamente estudiados por el potencial en la producción de xilitol a partir de D-xilosa (Kumar & Gummadi, 2011; Yan et al., 2021). Para *C. oleophila* (clado *Kurtzmaniella*) fue reportada una baja producción de etanol a partir de D-xilosa, mediante ensayo enzimático como método de cuantificación (Morais et al., 2020). En la fermentación de la D-xilosa un linaje de *C. akabanensis* (clado *Clavispora*) fue reportada como productora de etanol (Valinhas et al., 2018), sin embargo, la producción de xilitol a través de la fermentación no fue evaluada. Para la especie *C. insectorum* (clado *Yamadazyma*) *y C. blattae* (clado *Clavispora*) no se encontraron estudios de la capacidad de transformar la pentosa hasta xilitol. Sin embargo, *C. insectorum* ha sido relacionada en un proceso patentado de cocultivo para la producción de etanol (Calleja et al., 1990). Linajes relacionados con el género *Wickerhamomyces* han sido descritos como productores altamente eficientes de xilitol (Carneiro et al., 2019; Morais et al., 2020) lo que es coherente con los resultados obtenidos para la nueva especie de *Wickerhamomyces* sp. identificada en este estudio.

Levaduras asimiladoras de D-xilosa

En el grupo restante de aislados que representa el 57.1% no se determinó una producción de etanol o xilitol considerable, en las condiciones evaluadas en este trabajo. Sin embargo, se evidenció la capacidad de asimilar y crecer en este sustrato.

2.3 Conclusiones

Este primer estudio sobre la diversidad de levaduras transformadoras de D-xilosa asociadas a sustratos lignícolas en bosques de robles en el sistema montañoso de Los Andes Colombianos evidenció la riqueza presente en los bosques de niebla, con la descripción de 50 especies pertenecientes a 20 géneros con predominancia de levaduras ascomicetas, esto confirma los servicios ecosistemas no maderables que pueden aportar estos ambientes estratégicos.

Los robledales en Colombia son ecosistemas poco explorados, siendo reservorios importantes de la diversidad de levaduras, así como un ambiente propicio para la investigación y descripción de posibles nuevas especies con un 30% de levaduras aisladas antes no reportadas, pertenecientes a 8 géneros que representan el 40% de los géneros identificados en este estudio para estos biomas.

La diferencia en la acumulación de diversidad de un área menos intervenida por la actividad humana como el PN Cerro de Quínini, donde el número de especies no descritas aisladas (12 especies) fue mayor en comparación al PN Chicaque (5 especies), evidencia la importancia de la conservación de este ecosistema subandino único en Suramérica como *hotspots* de biodiversidad microbiana.

El alto potencial biotecnológico para la transformación de la D-xilosa de las levaduras aisladas e identificadas en estos ecosistemas con 42.9 % de aislados con capacidad para la conversión de la pentosa hasta productos de valor agregado como el etanol y el xilitol, resalta la necesidad del promover estudios de bioprospección en estos ecosistemas como hábitat de microbiota potencial para su uso sustentable en bioprocesos.

Las especies pertenecientes al género *Scheffersomyces* aisladas en los dos ecosistemas de robledales, evidenciaron una amplia diversidad en el metabolismo para la conversión de la D-xilosa siendo el género con mayor potencial biotecnológico.

CAPITULO 3: Potencial de levaduras aisladas en Colombia para producción de etanol o xilitol a partir de D-xilosa proveniente de hidrolizados hemicelulósicos de bagazo de caña de azúcar

Las levaduras son microorganismos con alto potencial para ser implementados en el desarrollo de sistemas de producción de base biológica, porque no tienen requerimientos nutricionales particularmente altos, exhiben altas tasas de crecimiento y su cultivo no depende de condiciones geográficas y ambientales (Kieliszek et al., 2017). Se ha descrito que el metabolismo de la D-xilosa en las levaduras induce el flujo metabólico del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA, por sus siglas en inglés), la vía de las pentosas fosfato (PPP, por sus siglas en inglés) y la biosíntesis de acetil-CoA (Kwak et al., 2019), rutas que pueden suministrar precursores para la generación de bioproductos (Zha, et al., 2021). Este metabolismo ha sido ampliamente estudiado en las últimas décadas en función del aprovechamiento de los azúcares lignocelulolíticos para la producción de diferentes sustancias químicas de importancia industrial (Chandel et al., 2018).

La capacidad de las levaduras de sobrevivir en ciertos hábitats requiere conjuntos de rasgos metabólicos que pueden ser afectados por factores extrínsecos, relacionados con los ambientes que pueden ejercer una presión selectiva adicional sobre los genes, lo que conlleva a una mayor adaptación (Opulente et al., 2018). Se ha descrito que los ambientes naturales presentan hábitats altamente selectivos, que suelen ser colonizados por algunas levaduras especializadas (Boekhout et al., 2021a). Por ejemplo, algunas levaduras en sus entornos naturales pueden intervenir directamente en la descomposición de la fruta madura y participar en el proceso de fermentación, presentando la capacidad de colonizar ambientes fermentativos industriales o espontáneos en donde pueden ser consideradas como contaminantes (Maicas et al., 2020). Así como en los ambientes naturales las levaduras enfrentan cambios continuos que determinan las capacidades biológicas, en los ambientes de fermentación las levaduras también se exponen a tensiones no naturales que pueden dar lugar a un rendimiento del proceso deficiente y no competitivo (Dragosits & Mattanovich, 2013), como la acumulación de producto, la concentración y composición de sustrato y gradientes de temperatura (Saini et al., 2018), factores que

intervienen en la selección de la comunidad de levaduras capaz de tolerar estas condiciones.

En el estudio de levaduras en ambientes naturales, presenta una predominancia el enfoque de descripción de biodiversidad sobre la investigación del potencial biotecnológico de levaduras y las aplicaciones que utilizan aislados recién muestreados (Boekhout et al., 2021a). No obstante, linajes con capacidad de convertir D-xilosa en productos de valor como el xilitol y etanol, han sido estudiadas principalmente en los géneros *Spathaspora*, *Scheffersomyces*, *Meyerozyma Debaryomyces*, *Kluyveromyces* y *Candida* (Lopes et al., 2016; López-Linares et al., 2018; Bergmann et al., 2019).

Los hidrolizados de biomasa lignocelulósica sirven como materia prima de bajo costo para la generación de productos de base biológica, como el xilitol y etanol, a partir de procesos de fermentación con levaduras. La producción de xilitol por fermentación se ha convertido en una alternativa atractiva debido a las desventajas en el método químico, asociados a los costos y el impacto ambiental, como su alto consumo de energía, y el uso de catalizador (Rao et al., 2016). Este alcohol de azúcar presenta en comparación con la sacarosa, un 40 % menos de calorías y tiene un índice glucémico significativamente más bajo (Kieliszek et al., 2017), lo que ha llevado a un aumento en la demanda sobre este producto. De otro lado, el etanol producido a partir de biomasa lignocelulósica o bioetanol de segunda generación es una tecnología para el remplazo de combustibles fósiles más respetuosa con el ambiente, en términos de optimización del uso del suelo y la seguridad alimentaria. De acuerdo con lo reportado por la asociación de combustibles renovables (RFA, del inglés *Renewable Fuels Association*) la producción mundial de bioetanol en las últimas décadas sigue en aumento, con excepción del año 2020 como consecuencia de la emergencia sanitaria por la COVID-19 (RFA, 2022). Aunque el proceso de transformación de hidrolizados lignocelulósicos usando las levaduras como biocatalizador es prometedor, existen desventajas técnicas y económicas en su aplicación para la producción a gran escala. La formación de compuestos tóxicos (ácidos orgánicos, derivados de furano y compuestos fenólicos) para los microorganismos fermentadores no solo impacta en la productividad del proceso, sino que también aumenta los costos operativos al introducir métodos para mitigar los efectos nocivos (Barros et al., 2020).

Los compuestos inhibidores presentes en los hidrolizados interfieren en el metabolismo de los microorganismos fermentadores por diversos mecanismos. Los principales ácidos orgánicos presentes como el acético y el fórmico, causan despolarización de la membrana y pérdida del gradiente de protones transmembrana, acidificación del citoplasma y apoptosis. Al igual que los ácidos alifáticos, los aldehídos de furano como el furfural y el 5-hidroximetil-furfural (HMF) causan estrés oxidativo a través de la formación y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS); estos compuestos pueden generar daño del citoesqueleto, daño de la mitocondria y de la vacuola, daño del ADN, desnaturalización y daño de las proteínas, y muerte celular programada; por último, los compuestos fenólicos se han asociado con una mayor fluidez de la membrana, mayor fuga celular, transporte alterado de iones y azúcares, daño en el ADN y alteración de la integridad de la membrana biológica (Brandt et al., 2021).

Las levaduras presentan una variedad de mecanismos que les permiten reconocer, responder, modificar y restablecer funciones metabólicas en relación con los factores externos para garantizar la supervivencia. La respuesta se puede obtener hasta que no se produzcan condiciones adversas a un nivel tal que se vuelva letal para la célula (Saini et al., 2018). Una compleja red de regulación ha sido descrita relacionando interacción de múltiples genes/vías para la respuesta inducida por el estrés y los mecanismos de regulación endógenos, lo que sugiere que la regulación positiva de un solo gen puede ser incapaz de hacer frente a las alteraciones a nivel celular, para mantener el rendimiento de la fermentación y la tolerabilidad de los inhibidores (Li et al., 2022).

Las respuestas a estrés celular han sido estudiadas en mayor medida en el microorganismo modelo *S. cerevisiae* principalmente usando glucosa y en menor medida en linajes genéticamente modificados para el consumo de la D-xilosa. Los trabajos sobre las respuestas a condiciones de estrés en levaduras naturalmente fermentadoras de D-xilosa son limitados. La respuesta fenotípica mediada por el potencial genético de las levaduras no-convencionales de ambientes naturales y de ambientes fermentativos, para responder a diferentes condiciones de estrés en el proceso de bioconversión de la D-xilosa proveniente de hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña azúcar, pueden representar un potencial para el desarrollo de sistemas de producción de xilitol y etanol.

3.1 Materiales y Métodos

3.1.1 Ensayo de fermentación de D-xilosa en medio nutritivo por levaduras aisladas en bosques de robles

Aislados de las especies seleccionadas como productoras de etanol y xilitol en el tamizaje de fermentación (numeral 2.2.3), fueron evaluados para la transformación de la D-xilosa a escala de laboratorio (Erlenmeyer).

Preparación de inóculo

Las levaduras fueron crecidas en placa con medio YM (que contiene glucosa 1%, extracto de levadura 0.3%, extracto de malta 0.3%, peptona bacteriológica 0.5%, agar 2% y pH 5.5), a 28°C durante 48h. Una colonia de cada levadura fue crecida en 20mL de medio liquido YPX-2% (el cual contiene extracto de levadura 1%; peptona 2 %; D-xilosa 2%, pH 5.5). El crecimiento se realizó en tubo Falcón de 50mL de capacidad a 28°C, 180rpm por 48h. Las células de las levaduras que presentaron crecimiento fueron recuperadas por centrifugación a 6000 x g durante 15 minutos, lavadas dos veces con NaCl (0.85%) y se ajustó el inóculo hasta obtener una $OD_{600nm} \approx 0.2 \pm 0.02$.

Condiciones de fermentación

La fermentación fue realizada en Erlenmeyer (100mL de capacidad) con tapón de algodón, el volumen de trabajo fue de 40mL y el medio de fermentación fue YPX-5% (el cual contiene extracto de levadura 1%; peptona 2 %; D-xilosa 5%, pH 5.5) con 10% de inóculo. La incubación fue realizada a 200rpm, 30 °C durante 72h tomando alícuotas cada 24h.

Métodos analíticos

El seguimiento de la biomasa fue realizado por lectura de absorbancia a 600nm en espectrofotómetro (Thermoscientific, Genesys 10), en una dilución 1:10 del cultivo. El sobrenadante de cultivo líquido fue analizado en un equipo de HPLC (Hitachi Elite LaChrom), utilizando una columna Biorad Aminex HPX-87H (300x7.8mm), con volumen de carga 20µL, utilizando H_2SO_4 como fase móvil (5 mmol/L), con un flujo de 0.6 ml/min, temperatura de la columna de 60°C, y temperatura del detector de índice

de refracción en 40°C. El pH final de la fermentación fue determinado en el sobrenadante usando pHmetro calibrado (Thermo Scientific Orion 4Star).

3.1.2 Fenotipaje de tolerancia a hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar (HHBA) diluido (50%)

La tolerancia de las levaduras transformadoras de D-xilosa al hidrolizado de bagazo de caña de azúcar se determinó mediante la relación de las tasas de crecimiento específico máximas en medio YPX-2% y HHBA (50%) (composición Anexo C). La preparación del inóculo para cada levadura se realizó tomando una colonia de las levaduras para incubarlas en 5mL de medio líquido YPX-2% por triplicado, en tubos Falcón (de 15mL de capacidad) a 28°C con agitación continua a 180rpm durante 24h. Las células se recuperaron por centrifugación a 6000 x g durante 20 minutos, fueron lavadas dos veces con NaCl (0.85%) y se ajustó el inóculo hasta obtener una OD_{600nm} ≈ 0.2 ± 0.02. Posteriormente se realizaron curvas de crecimiento en microplaca de 96 pozos en medio YPX-2% y HHBA (50%). El medio con hidrolizado fue suplementado con fuentes de nitrógeno (extracto de levadura 1% y peptona 2%), toda vez, que el crecimiento celular fue influenciado por la presencia de estos compuestos (Anexo D). El volumen final de trabajo fue de 170µL usando 10% de inóculo, incubando a 30°C. La densidad óptica (OD) se midió en un lector de microplaca (Tecan Infinite M200) cada hora a 600nm implementando agitación orbital 15 min antes de cada lectura. El hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar fue proveído por el laboratorio del Dr. Silvio Silvério da Silva de Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo y producido de acuerdo con lo descrito por Cadete y colaboradores (2017b). El hidrolizado se ajustó a pH de 5.5 añadiendo óxido de calcio y se filtró al vacío. El mismo lote fue usado en todo el experimento. Se implementó un control negativo (medios sin inocular) y control positivo *Candida tropicalis* (antes *Candida guilliermondii* FTI 20037). Los parámetros de crecimiento se determinaron basados en el modelo de Monod. Las tasas de crecimiento específico máximas (μ_{max}) durante la fase de crecimiento exponencial (Anexo D) se calcularon encontrando la diferencia máxima entre los valores logarítmicos (ln) de dos mediciones de OD_{600nm} y dividiendo por el tiempo transcurrido durante la porción lineal de la gráfica (Cheng et al., 2015).

3.1.3 Ensayo de fermentación de D-xilosa en hidrolizado hemicelulósico de bagazo de azúcar (HHBA, 50% v/v) por levaduras aisladas en bosques de robles

Linajes de las especies que presentaron un menor efecto negativo en la tasa de crecimiento específico máxima en el ensayo en microplaca con HHBA (50%), fueron evaluadas mediante análisis multivariado en el desempeño fermentativo del hidrolizado diluido a escala de laboratorio (Erlenmeyer).

Condiciones de fermentación en hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar (50%)

El inóculo fue preparado de acuerdo con lo citado en el numeral 3.1.1. La fermentación fue realizada en triplicado en Erlenmeyer (100mL de capacidad) con tapón de algodón, el volumen de trabajo fue de 40 mL, los medios de fermentación fueron YPX-2% y HHBA (50%) usando 10% de inóculo. La incubación fue realizada a 200 rpm, 30°C durante 48h, tomando alícuotas en 14, 24, 38, y 48 horas. El seguimiento a la fermentación fue realizado de acuerdo con los métodos analíticos del numeral 3.1.1.

Diseño experimental

Se implemento un diseño experimental completamente al azar para comparar el crecimiento en dos tratamientos (YPX y HHBA (50%)) para cada levadura. Para cada grupo de datos a analizar fueron evaluados los principios de normalidad y homocedasticidad implementado la prueba de Shapiro–Wilk y la prueba de Levene respectivamente. Grupos con el cumplimiento de los supuestos fueron analizados mediante el método paramétrico de Anova one way usando como prueba *post hoc* la prueba de Tukey. La prueba no paramétrica Kruskal-Wallis fue implementando cuando el grupo de datos no atendía el principio de normalidad, pero si el de homocedasticidad como prueba *post hoc* fue implementado la prueba de Dunn. Los análisis fueron realizados a un nivel de significancia α=0.05, empleando *software*s como Minitab, OriginLab y paquetes en R studio.

Selección por métodos multivariados de levaduras tolerantes a hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido HHBA (50%)

El análisis de los parámetros fue realizado mediante análisis de componentes principales (PCA, del inglés *Principal Component Análisis*) teniendo en cuenta la tasa

de crecimiento específica máxima (μ_{max}, definida como (ln (OD2) -ln (OD1)) / (T2-T1)), OD_{600nm} máxima, producción, rendimiento y productividad volumétrica. El análisis de correlación para los parámetros evaluados también se realizó mediante análisis de conglomerados jerarquizados (HCA, del inglés *Hierarchical Cluster Analysis*) utilizando el software libre Rstudio.

3.1.4 Ensayo de fermentación de D-xilosa en medio nutritivo por levaduras asociadas a ambientes fermentativos de Colombia

Fueron seleccionadas cincuenta levaduras de la colección del Banco de Cepas y Genes del Instituto de Biotecnología (IBUN) de la UNAL, aisladas previamente en diferentes ambientes fermentativos de sustratos asociados a la caña de azúcar (bagazo, jugo, fragmento de caña, cachaza) de un ingenio ubicado en Puerto López (Meta) y bebida tradicional fermentada (guarapo) en Paipa (Boyacá), que se encontraban caracterizados molecularmente mediante el análisis del gen ITS (*Intergenic Transcribed Spacer*) como especies relacionadas a los géneros *Pichia, Meyerozyma* y *Candida*, así como otras no identificadas. *Candida tropicalis* FTI 20037 fue utilizada como control positivo para la producción de xilitol a partir de D-xilosa.

El inóculo fue preparado de acuerdo con lo descrito en el numeral 3.1.1. Las levaduras que mostraron un crecimiento abundante en medio de propagación (YPX-2%) se ensayaron para determinar la fermentación de D-xilosa. La fermentación fue realizada en Erlenmeyer (125mL de capacidad) con tapón de algodón, el volumen de trabajo fue de 50mL y el medio de fermentación fue YPX-4% con 10% de inóculo. La incubación fue realizada a 180 rpm, 30 °C, tomando alícuotas hasta las 113h de fermentación. Se implementaron los métodos analíticos descritos en el numeral 3.1.1.

La identificación taxonómica de levaduras con potencial para la transformación de la D-xilosa fue confirmada mediante la extracción del ADN, seguido de la amplificación y análisis de los marcadores moleculares D1/D2 e ITS de acuerdo con lo descrito en el numeral 2.1.3. Además, para las levaduras más promisorias fue realizado el ensayo de tolerancia HHBA (50%) en microplaca siguiendo la metodología del numeral 3.1.2.

Diseño experimental

Se implemento un diseño experimental completamente al azar para comparar todos los linajes implementando como variable respuesta parámetros fermentativos (Anexo G) (rendimiento $Y_{p/s}$ y productividad volumétrica Qp). Para cada grupo de datos a analizar fueron evaluados los principios de normalidad y homocedasticidad implementado la prueba de Shapiro–Wilk y la prueba de Levene respectivamente. Los datos fueron analizados mediante el método paramétrico de Anova one way usando como prueba *post hoc* la prueba de Tukey. Los análisis fueron realizados empleando *software*s como Minitab, OriginLab y paquetes en R studio.

3.2 Resultados y Discusión

3.2.1 Fermentación de D-xilosa por levaduras aisladas en bosques de robles en la cordillera oriental de los Andes Colombianos

Se determinaron los parámetros de fermentación de la D-xilosa (Tabla 3) para linajes de las especies identificadas como productoras de etanol o xilitol en los ensayos de tamizaje para determinar su potencial biotecnológico.

Tabla 3. Parámetros de fermentación de levaduras aisladas en bosques de robles y *Sp. passalidarum* (NRRL-Y 27907) en medio YPX-5%.

Especie	Linaje	Etanol (g/L)	Xilitol (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/L.h)	η (%)	Tiemp. (h)
Sc. cryptocercus/ Sc. virginianus	Qn15.3Xn	20.25±2.14	0.84±0.19	0.43[a]	0.42 [a]	83%	48
	Qn30.1Xn	18.78±1.79	2.23±0.15	0.39 [a]	0.39 [a]	77%	48
	Qn8.1X	19.09±1.64	1.20±0.29	0.40 [a]	0.40 [a]	79%	48
	CQ3.1Xn	19.00±1.49	1.38±0.17	0.40 [a]	0.40 [a]	78%	48
	CQ8.2Xn	17.99±2.40	2.43±0.58	0.38 [a]	0.37 [a]	74%	48
	CQ7.1Xn	17.64±1.78	4.06±0.30	0.37 [a]	0.37 [a]	73%	48
	CQ5.1X	17.2±2.13	2.80±.12	0.38 [a]	0.36 [a]	75%	48
	CQ22.2Xn	17.14±1.37	2.37±.40	0.38 [a]	0.36 [a]	74%	48
Sc. illinoinensis	Qn26.2X	15.36±2.32	2.69±0.55	0.32 [a]	0.32 [a]	63%	48
	Qn27.1X	13.85±2.26	2.50±0.34	0.29 [a]	0.29 [a]	58%	48
	CQ6.1Xn	17.97±2.41	1.90±0.16	0.38 [a]	0.37 [a]	74 %	48
P. membranifaciens	CQ7.1X	17.69±2.92	1.98±0.32	0.37 [a]	0.37 [a]	73%	48
	Qn23.1Xn	17.64±1,85	2.03±0.25	0.37 [a]	0.37 [a]	73%	48
Sc. coipomensis	CQ13.1Xn	4.01±0.17	29.52±2.07	0.62[b]	0.61 [b]	68%	48
	CQ16.2Xn	3.34±0.20	30.23±2.55	0.64 [b]	0.63 [b]	70%	48
	CQ25.2X	3.59±0.20	30.48±2.35	0.64 [b]	0.64 [b]	70%	48
C. insectorum	Qn18.1Xn	0.00	20.57±1.81	0.50 [b]	0.43 [b]	47%	48

Especie	Linaje	Etanol (g/L)	Xilitol (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/L.h)	η (%)	Tiemp. (h)
	Qn22.3X	0.00	20.1±2.23	0.44 [b]	0.44 [b]	48%	48
	Qn29.1Xn	0.00	21.79±1.13	0.48 [b]	0.45 [b]	52 %	48
Scheffersomyces sp.3	Qn15.1Xn	0.00	27.27±1.15	0.73 [b]	0.57 [b]	79%	48
Sc. amazonensis	Qn22.1X	6.09±0.85	23.14±1.50	0.49 [b]	0.48 [b]	53%	48
	Qn30.1bX	7.02±0.54	24.47±1.36	0.51 [b]	0.51 [b]	56%	48
Scheffersomyces sp.1	Qn27.3X	2.84±0.44	20.56±1.45	0.49 [b]	0.43 [b]	53%	48
	Qn9.4Xn	3.32±0.60	18.26±0.90	0.57 [b]	0.38 [b]	62%	48
M. guilliermondii	CQ1.2X	0.00	26.17±2.03	0.67 [b]	0.36 [b]	73%	72
D. nepalensis	Qn6.3Xn	0.00	24.38±2.09	0.71 [b]	0.34 [b]	78%	72
Wickerhamomyces sp.	Qn17.1X	0.00	24.69±1.46	0.74 [b]	0.34 [b]	81%	72
C. oleophila	CQ19.2Xn	0.34 ±0.03	31.32±0.74	0.75 [b]	0.44 [b]	82%	72
C. akabanensi	CQ10.3Xn	0.00	30.76±2.53	0.67 [b]	0.43 [b]	73%	72
C. blattae	Qn3.3X	0.33±0.07	31.09±2.90	0.70 [b]	0.43 [b]	76%	72
W. arborarius	Qn11.3Xn	0.00	11.38±0.89	0.32 [b]	0.15 [b]	35%	72
Candida sp.3	CQ23.1Xn	0.00	19.88±1.85	0.64 [b]	0.28 [b]	70%	72
Ogatea sp. 1	CQ25.2Yn	0.38±0.09	17.81±1.30	0.63 [b]	0.25 [b]	69%	72
Nakazawaea sp.	CQ23.3Xn	0.00	16.55±1.95	0.66 [b]	0.23 [b]	72%	72
	CQ18.3X	0.00	14.61±2.05	0.63 [b]	0.20 [b]	69%	72
Scheffersomyces sp.2	Qn30.2.1Xn	0.9±0.03	7.4±1.05	0.30[b]	0.10[b]	33%	72
B. californica	CQ28.2Xn	0.26±0.06	14.62±2.63	0.56 [b]	0.20 [b]	62%	72
V. humicola	Qn17.1Xn	0.00	6.21±1.30	0.31 [b]	0.09 [b]	34%	72
Control positivo							
Sp. passalidarum	NRRL-Y 27907	17.62 ±1.26	1.63 ±0.14	0.37 [a]	0.73 [a]	73%	24

[a] Parámetros calculados para la producción de etanol

[b] Parámetros calculados para la producción de xilitol

Todas las levaduras fermentadoras de D-xilosa hasta etanol presentaron su máxima producción a las 48 horas con una eficiencia por encima del 58%. Dos especies del género *Scheffersomyces* evidenciaron su capacidad fermentativa de la D-xilosa; característica que ha sido reportada para varias especies pertenecientes a este género, siendo *Sc. stipitis* la especie que ha sido ampliamente estudiada por la capacidad de sus linajes de transformar la D-xilosa hasta etanol (Cadete et al., 2012; Eliodório et al., 2019). El mayor rendimiento fue evidenciado en linajes de *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* con eficiencias superiores a 73%. Estas especies fueron relacionadas en el delineamiento filogenético al clado de levaduras fermentadoras de D-xilosa, presentando como especie más cercana a *Sc. shehatae* que ha demostrado potencial para la producción de etanol a partir de D-xilosa en diferentes condiciones y medios de fermentación (Hickert et al., 2013; Yuvadetkun et al., 2018). Hasta el presente no se encuentran reportes del desempeño fermentativo de D-xilosa para estas especies. Los linajes de *Sc. illinoinensis* presentaron variabilidad en la producción de etanol con un menor rango de eficiencia en la transformación de D-xilosa alcanzando solo el 74%. Esta variabilidad en la capacidad fermentativa de diferentes linajes de *Sc. illinoinensis* ha sido reportado previamente con producciones máximas de etanol entre las 24 y 48 horas, con producción máxima de etanol de 14.15 g/L (Cadete et al., 2017b), lo que evidencia una mayor eficiencia en la mayoría de los linajes de esta especie evaluados en este trabajo, que alcanzaron una producción máxima de etanol de hasta 17.97 g/L. Los linajes de *P. membranifaciens* no presentaron variabilidad intraespecie en los parámetros fermentativos de rendimiento, productividad y eficiencia. La capacidad fermentativa de la D-xilosa está poco caracterizada para esta especie. Rao y colaboradores (2008) reportaron para un linaje de *P. membranifaciens* aislado de la fruta asiática de mangostino, un rendimiento de 0.16 g/g en condiciones diferentes a las evaluadas en este trabajo. Sin embargo, se han realizado para linajes de esta especie evaluaciones en la producción de exo-enzimas para la hidrolisis del xilano como la 1,4-β-D-xilosidasa enzima caracterizada como tolerante a etanol (Romero et al., 2012). También se evidenció la producción de concentraciones bajas de xilitol para los 13 linajes de las tres especies evaluadas, lo que contribuye a la disminución en la eficiencia para la producción de etanol, esta acumulación de xilitol puede atribuirse a la limitación de oxidación de NADH generando un desequilibrio de cofactores (Leonel et al., 2021)

La producción de xilitol ha estado asociado al desequilibrio redox generado por la utilización preferentemente del NADPH como cofactor de la reductasa, mientras que las deshidrogenasas prefieren NAD^+ (Kieliszek, et al., 2017). Los 25 linajes que evidenciaron la producción de xilitol en la fermentación de la D-xilosa pertenecen a 18 especies. Cuatro especies del género *Scheffersomyces* al igual que *C. insectorum* evidenciaron su máxima producción de xilitol a las 48 horas, donde *Sc. coipomensis* y *Scheffersomyces* sp. 3 presentaron eficiencias mayores a 68% siendo los linajes de *Sc. coipomensis* los que presentaron el mayor rango de productividad con valores entre 0.61 –0.64 g/L.h. Producción de bajas concentraciones de etanol 3.6 g/L por *Sc. coipomensis* han sido reportados en la fermentación de hidrolizado de granada con un contenido de azúcares reductores de 21.5 g/L a pH bajo 2.6 (Dourou et al., 2021). Sin embargo, la producción de xilitol a partir de D-xilosa para linajes de esta especie aún no ha sido descrita. *Sc. amazonensis* una especie estrechamente relacionada con *Sc. coipomensis* ha sido caracterizada como una eficiente productora de xilitol, Cadete y colaboradores (2012) reportaron para esta especie datos similares para la producción de xilitol a los obtenidos en este estudio, con menor producción de etanol. En contraste *Scheffersomyces* sp. 3 que presentó el mayor rendimiento de xilitol 0.73 g/g a las 48h, está relacionada filogenéticamente con especies fermentadoras de D-xilosa hasta etanol, como la especie tipo de este género *Sc. stipitis*, una especie de interés para la producción de bioetanol (Eliodório et al., 2019), y otras especies próximas como *Sc. illinoinensis, Sc. shehatae* y *Sc. titanus* caracterizadas como eficientes productoras de etanol (Liu et al., 2016; Yuvadetkun et al., 2018). Estos resultados podrían sugerir nuevas características metabólicas para este subclado. La productividad volumétrica de xilitol de los linajes C*. insectorum* fueron superiores a 0.43 g/L.h. En las condiciones implementadas en este estudio no se detectó concentración de etanol en el sobrenadante de fermentación, en contraste con la producción de etanol en co-cultivo en condiciones deficientes de oxígeno reportada por Calleja y colaboradores (1990).

El 56% de las especies productoras de xilitol obtuvieron su máxima producción a las 72 horas. Linajes de las especies *M. guilliermondii, D. nepalensis, Wickerhamomyces* sp., *C. oleophila*, *C. blattae* y *C. akabanensi* presentaron un rango de productividad con valores de 0.34 – 0.44 g/L.h. El potencial de la capacidad de transformación de D-xilosa hasta xilitol en las especies *C. akabanensi, C. oleophila* y

C. blattae aún no se encuentra caracterizado. Sin embargo, su capacidad metabólica para la utilización de D-xilosa se ha descrito anteriormente, para *C. akabanensi* se reporta una producción de 5.12 g/L de etanol con una baja productividad (0.07g/L.h) (Valinhas et al., 2018), capacidad que no se evidencia en el linaje evaluado en las condiciones de este estudio. *C. oleophila* también fue reportada para la producción de menos de 2 g/L de etanol, metabolito detectado mediante ensayo enzimático (Morais et al., 2020), resultado que se corresponde con los bajos valores de etanol obtenidos en este trabajo para *C. oleophila* y *C. blattae* como únicas especies de este grupo de levaduras productoras de xilitol que evidenciaron etanol como subproducto en el proceso de fermentación. Yalçın y colaboradores (2021) reportaron la producción de xilanasa para un asilado identificado como *C. blattae* evidenciando su capacidad en el metabolismo de la pentosa. Levaduras ampliamente estudiadas como *M. guilliermondii* y *D. nepalensis* para la producción de xilitol por vía biotecnológica también hacen parte de este grupo. Kumar y Gummadi (2011) reportaron para un linaje de *D. nepalensis* (NCYC 3413) un rendimiento de 0.34 g/g en condiciones nutricionales diferentes a los implementados en este estudio, pero con la misma concentración de la pentosa, también fue evaluada en concentración más alta de D-xilosa aumentando el rendimiento hasta 0.48 g/g sin producción de etanol (Pappu & Gummadi, 2018). Los resultados obtenidos en este trabajo fueron superiores a los reportados con un rendimiento de 0.71 g/g y no presenta formación de etanol similar a lo reportado. *M. guilliermondii* es considera como una eficiente levadura no-convecional en la producción de xilitol reportando para diferentes linajes productividades de 0.58 g/L.h hasta 0.85 g/L.h cuando las condiciones de oxigenación fueron modificadas (Yan et al., 2021). Esto porque las condiciones anaeróbicas en el uso de esta pentosa producen un desequilibrio redox de cofactores que puede resultar en un aumento en la producción de xilitol. El linaje de la especie nueva de *Wickerhamomyces* sp. evidenció una eficiente conversión de la D-xilosa en xilitol logrando un rendimiento de 0.74 g/g, valor que se aproxima a los reportados en diferentes condiciones de fermentación para otras especies de este género como *W. rabaulensis* y *W. anomalus* con valores de 0.63 g/g y 0.83 g/g, respectivamente (Palladino et al., 2021; Carneiro et al., 2019).

Otro grupo de levaduras como *W. arborarius, Candida* sp. 3, *Scheffersomyces* sp. 2, *Ogatea* sp. 1*, Nakazawaea* sp., *V. humícola* y *B. californica* presentaron una

lenta producción de xilitol lo que se evidencia en valores menores de 19.88 g/L. En este grupo 4 posibles especies nuevas fueron evaluadas evidenciando una baja productividad volumétrica en la transformación de la D-xilosa con un rango de 0.10 g/L.h a 0.28 g/L.h. El linaje de *B. californica* presentó una eficiencia de 62% con una productividad de 14.62g/L que es un valor más alto al reportado para varios linajes de la misma especie en una mezcla de D-xilosa y arabinosa produciendo hasta 3.99g/L de xilitol en 72h (Saha & Kennedy, 2020). Solo una especie de basidiomicetos fue evaluada *V. humícola* identificando su bajo potencial para la transformación de este monosacárido con productividad volumétrica de 0.09g/L.h; en condiciones aeróbicas y con una cantidad baja concentración de D-xilosa se reportó para un linaje de esta especie producción de xilitol como producto principal del metabolismo de la pentosa (Santiago Benítez, 2017).

3.2.2 Tolerancia de levaduras aisladas en bosques de robles a hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar (HHBA, 50%)

Las levaduras productoras de etanol y xilitol aisladas de los robledales en la región central de la cordillera oriental de Los Andes fueron expuestas a medios con hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (HHBA, 50%), como medio de evaluación de la tolerancia a la presencia de inhibidores. Estos factores de estrés afectan a los procesos celulares y existe un nivel crítico de concentración de factores de estrés para que la levadura inicie la respuesta al estrés, interfiera en su actividad óptima o induzca la apoptosis celular (Li et al., 2022). Las tasas máximas de crecimiento específica (μ_{max}) en el medio YPX-2% y el medio con hidrolizado (HHBA, 50%) para las especies fermentadoras de D-xilosa, fueron calculadas para la determinación de la inhibición del crecimiento en las condiciones estresantes del hidrolizado. La inhibición se determinó mediante la relación de la tasa de crecimiento especifica máxima en los dos medios ($\mu_{max\ Hidrolizado\ 50\%} / \mu_{max\ YPX}$), y se definió en el rango de 0 a 1; donde, 0 es totalmente inhibido y 1 no se evidencia inhibición. Valores superiores a 1 indican un aumento de la tasa máxima de crecimiento específica cuando el hidrolizado se encontraba presente en el medio.

Dentro de las levaduras productoras de etanol (Figura 14) los 8 linajes de la especie *Sc. illinoinensis* evidenciaron una mayor dispersión en el efecto de la inhibición de crecimiento por la presencia de hidrolizado hemicelulósico, respecto a

los 9 linajes de *P. membranifaciens* y los 22 linajes *de Sc. cryptocercus/Sc. virginianus.* El efecto de inhibición causado por los compuestos presentes en el hidrolizado lignocelulósico se ha asociado a la reducción de las actividades enzimáticas biológicas, daño del ADN, proteínas, orgánulos y la pared celular, reducción de la traducción e inducción de la apoptosis (Brandt, et al. 2019).

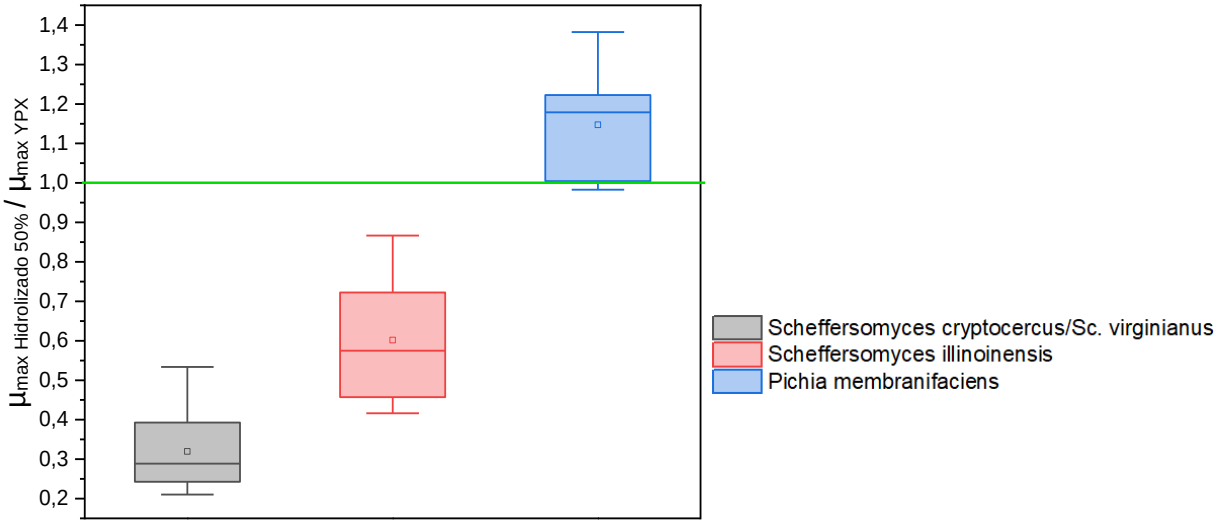


Figura 14. Inhibición en el crecimiento de linajes productores de etanol en medio con hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (50%). ($\mu_{max\ Hidrolizado\ 50\%}$ / $\mu_{max\ YPX}$)

Los resultados evidenciaron un aumento en la tasa máxima de crecimiento específica para los linajes de *P. membranifaciens* cuando se expuso al medio con hidrolizado diluido al 50%. Esta capacidad que presentan las levaduras de alterar la expresión genética y reconfigurar el metabolismo para adaptarse a nuevos entornos ha sido asociada con un programa de expresión global denominado respuesta de estrés ambiental (Gasch et al., 2000). Esta respuesta a los diferentes factores de estrés es específica de cada especie ya que dependen de una red compleja de vías de detección y transducción de señales que conducen a adaptaciones en el ciclo celular y ajustes en los perfiles de expresión génica y actividades metabólicas celulares (Li et al., 2022), lo que se relaciona con los resultados observados para *Sc. illinoinensis*, especie en el que el efecto del medio con hidrolizado en la tasa máxima de crecimiento fue menor que para *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus*, especie que presentó la mayor eficiencia de conversión de la D-xilosa hasta etanol en medio YPX-5% (Tabla 3).

Los linajes de las especies productoras de xilitol que presentaron la máxima producción en 48h y algunas con rendimientos superiores a 0.67 g/g en las 72h fueron evaluadas frente a la tolerancia de medio con hidrolizado al 50% (Figura 15). Las tasas máximas de crecimiento fueron calculadas para 5 linajes de la especie *Sc. coipomensis* y *C. insectorum,* 2 linajes de *Sc. amazonensis, Scheffersomyces* sp. 1 y *Wickerhamomyces* sp., y solo 1 linaje de las especies como *M. guilliermondii, Scheffersomyces* sp. 3, *D. nepalensis*, *C. akabanensis* y *C. oleophila.*

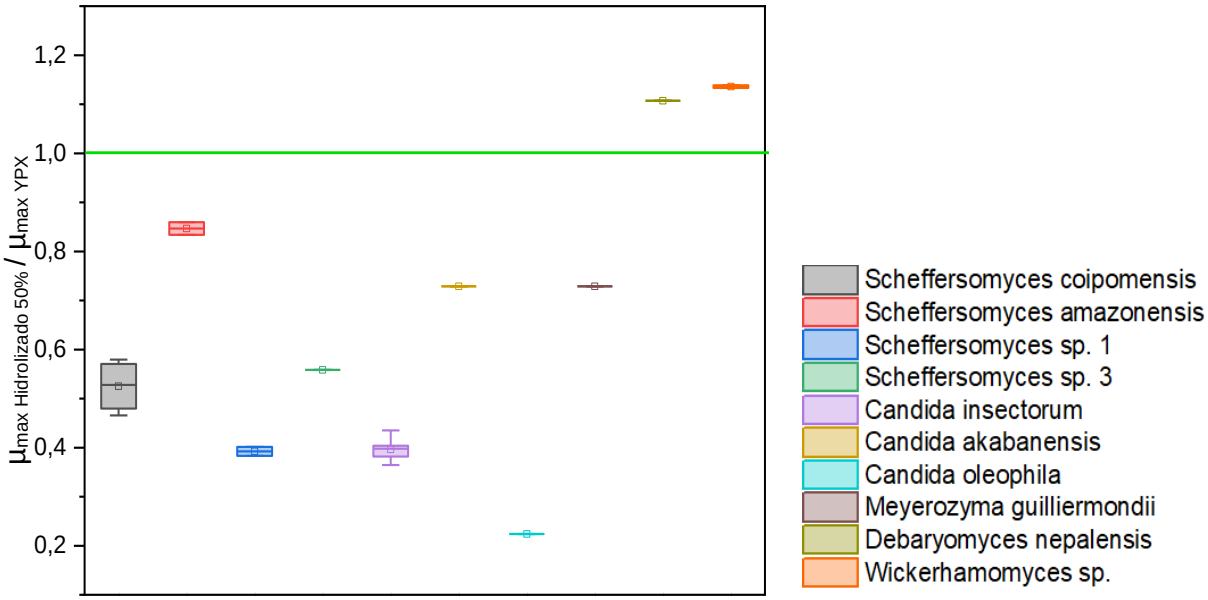


Figura 15. Inhibición en el crecimiento de linajes productores de xilitol en medio con hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (50%). ($\mu_{max\ Hidrolizado\ 50\%}$ / $\mu_{max\ YPX}$)

Las cuatro especies de *Scheffersomyces* productoras de xilitol evidenciaron inhibición en la presencia del hidrolizado. *Sc. amazonensis* fue la especie más tolerante en este género, con una menor disminución en la tasa máxima de crecimiento específica. *Sc. coipomensis*, la especie más productora de xilitol en medio YPX-5% (Tabla 3), presentó una reducción aproximada del 50% en la tasa de crecimiento específica máxima comportamiento que fue similar en la especie *Scheffersomyces* sp. 3. La especie más sensible de este género fue *Scheffersomyces* sp. 1.

La inhibición en el crecimiento de las levaduras también fue evidente en las especies de *C. insectorum* (clado *Yamadazyma*), *C. akabanensis* (clado *Clavispora*), *C. oleophila* (clado *Kurtzmaniella*) y *M. guilliermondii*. La especie más sensible a la

presencia de hidrolizado fue *C. oleophila*, mientras que *C. akabanensis* y *M. guilliermondii* presentaron un decrecimiento similar en la presencia de inhibidores. Las especies *D. nepalensis* y *Wickerhamomyces* sp., presentaron un aumento en la tasa máxima de crecimiento cuando el hidrolizado diluido (50%) estaba presente en el medio, lo que evidenció una mayor tolerancia a esta condición.

La presencia de HHBA (50%) en el medio de fermentación presentó un efecto negativo en la tasa de crecimiento específico máxima en el 77% de las especies de levaduras transformadoras de D-xilosa. Sin embargo, Li y colaboradores (2022) han enumerado posibles mecanismos de respuesta como la regulación de la membrana/pared celular, la regulación energética, la regulación de aminoácidos, la regulación transcripcional y traduccional y la regulación redox. Dos especies productoras de xilitol (*D. nepalensis* y *Wickerhamomyces* sp.) y una especie productora de etanol (*P. membranifaciens*) presentaron tolerancia frente al hidrolizado aumentando su tasa de crecimiento especifica máxima. Estas respuestas de protección involucran mecanismos de inducción y/o represión de un conjunto de genes que comúnmente promueven la adaptación y recuperación de las células frente al factor de estrés (Brown et al., 2020). Sin embargo, las respuestas a la presencia de inhibidores también dependen de factores como el estado fisiológico (perfil celular metabólico y energético) de la célula y las condiciones ambientales (Guaragnella & Bettiga, 2021).

Potencial de levaduras de ambientes naturales para la producción de etanol en HHBA (50%)

Levaduras productoras de etanol aisladas de los robledales en la región central de la cordillera oriental fueron expuestas en escala de laboratorio a medios con hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (50%) (Figura 16) como medio de evaluación de la tolerancia a la presencia de inhibidores. Linajes de las especies productoras de etanol *P. membranifaciens* (CQ7.1X), *Sc. illinoinensis* (CQ6.1Xn y Qn25.3Xn) y *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X) fueron evaluados en escala de laboratorio, utilizando *Sp. passalidarum* (NRRL-Y 27907) como control positivo.

En las primeras 14 horas de fermentación la producción de biomasa se ve disminuida para todas las levaduras, en el medio HHBA (50%) en comparación con

el medio nutritivo YPX-2% (Figura 16a y 16b), con un aumento en la tasa de crecimiento específica máxima en las siguientes 10 horas sin alcanzar los valores obtenidos para ese mismo tiempo (24h) en el medio YPX-2%. Se ha descrito como efecto a la exposición de inhibidores la disminución constante de los niveles de metabolitos relacionados con la glucólisis y el ciclo de ácidos tricarboxilicos (Ding et al., 2012) lo que implica una deficiencia energética para los procesos de duplicación (Kitanovic et al., 2012), lo que sugiere una fase de mantenimiento y reparación de los sistemas celulares en las primeras horas de la fermentación. Después de las 24 h los linajes de *Sc. illinoinensis* supera los valores de densidad óptica ($OD_{Abs600nm}$) obtenidos en el medio YPX-2% en contraste las demás especies no alcanzan la misma producción de biomasa.

La exposición a inhibidores presentes en los hidrolizados genera una disminución en la captación de la fuente de carbono favoreciendo condiciones de privación de nutrientes (Kitanovic et al., 2012), evidenciado esto en el decrecimiento de la velocidad del consumo de D-xilosa en medio con hidrolizado (Figura 16c y16d) para todas las levaduras, que al inicio de la fermentación también puede estar influenciada por represión catabólica de glucosa (Cadete et al., 2017b). En las primeras 14 h la reducción del consumo fue del 44.5 % para el linaje control *Sp. passalidarum* (NRRL-Y 27907), 38.7% para *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus,* 38.6% para *P. membranifaciens* y un rango de 50.6% y 31.8% en *Sc. illinoinensis*. Se observa, variación intraespecie en la respuesta al estrés de los linajes de *Sc. illinoinensis* en este parámetro, no obstante, la producción de etanol (Figura 16e y 16f) no demuestra una diferencia entre los dos linajes. Para linajes de *Sc. illinoinensis* se reportó previamente una reducción en la producción de etanol en un rango del 39.8% - 48.3% y un aumento de 24 h para alcanzar la máxima productividad cuando fueron evaluadas en hidrolizado hemicelulósico de bagazo de azúcar caña con concentraciones similares de ácido acético y mayor cantidad de D-xilosa (Cadete et al., 2017b). En las condiciones de este estudio se evidenció aumento de 14 h para consumir toda la pentosa cuando los linajes de esta especie estuvieron expuestos al HHBA (50%), tiempo en el que también se observó un aumento del 6.9 % al 13.5 % en comparación con la máxima concentración de etanol producida en medio YPX-2%, lo que se encuentra asociado por la capacidad de fermentar la glucosa presente en el medio.

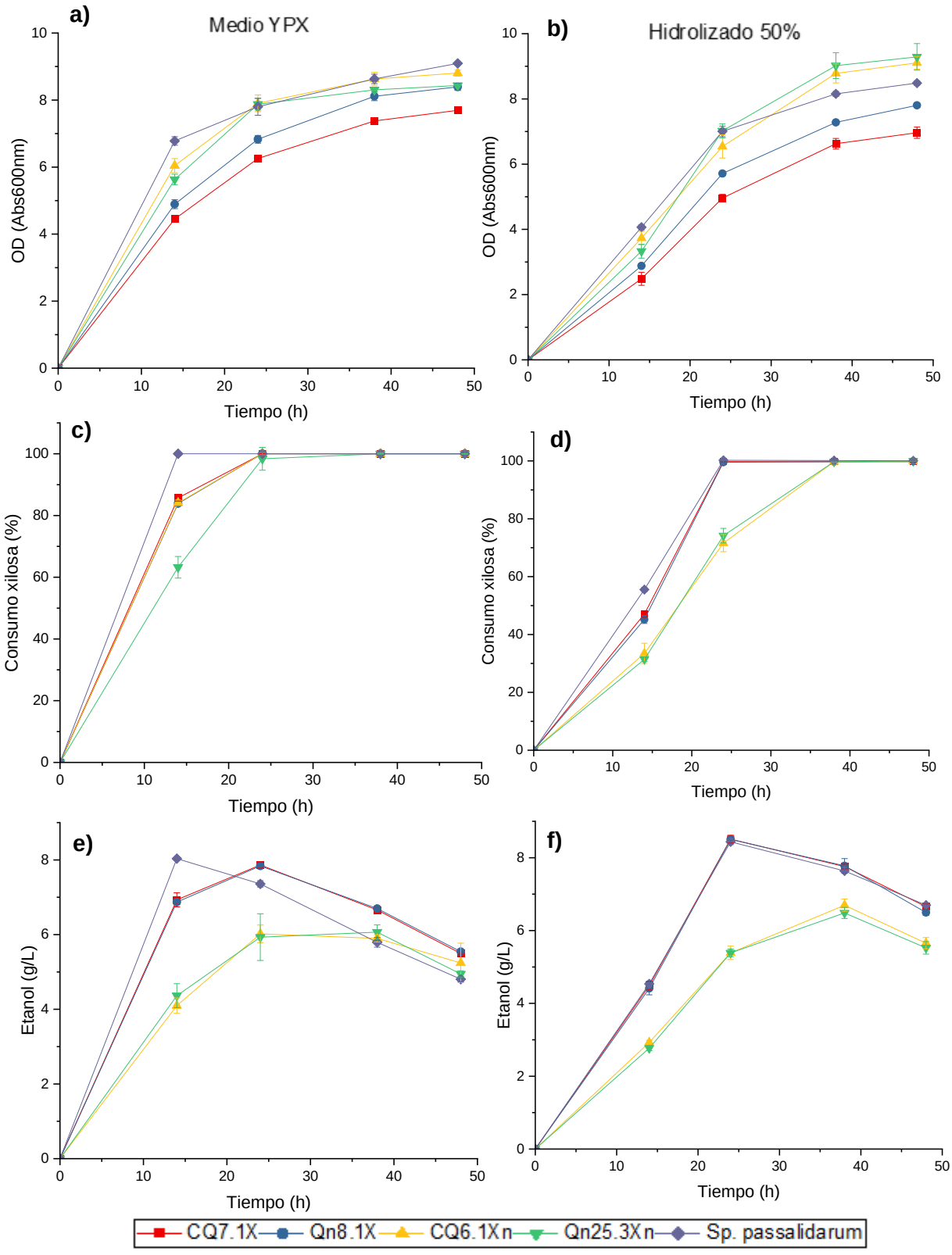


Figura 16. Producción de biomasa, consumo de D-xilosa y producción de etanol por especies fermentadoras de D-xilosa *P. membranifaciens* (CQ7.1X), *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X), *Sc. illinoinensis* (CQ6.1Xn; Qn25.3Xn) y *Sp. passaliadarum* (NRRL-Y 27907) en medio YPX-2% (a), (c) y (e) e de hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido 50% (b), (d) y (f).

Linajes de las especies *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus, P. membranifaciens* y *Sp. passalidarum* presentaron similar comportamiento en el desempeño fermentativo cuando se realizó la fermentación en el HHBA (50%), agotando la D-xilosa en las primeras 24 horas, tiempo en el que se obtuvo la máxima producción de etanol. Sin embargo, *Sp. passalidarum* aumento 10h en estos parámetros respecto a su desempeño en medio YPX-2%, evidenciando una mayor susceptibilidad a las condiciones de estrés. Soares y colaboradores (2020) describieron el efecto de los inhibidores presentes en los hidrolizados hemicelulósicos sobre el desempeño fermentativo de *Sp. passalidarum* NRRL-Y 27907, observando un mayor efecto de inhibición sobre esta especie en comparación con *Sc. stipitis*, siendo el ácido acético y el furfural los compuestos que tuvieron las influencias más fuertes en el metabolismo de la levadura.

Los compuestos tóxicos presentes en el hidrolizado tuvieron efectos negativos en la producción de etanol disminuyendo en las primeras 12h para todas las levaduras en el medio con presencia de hidrolizado (Figura 16e y 16f). En contraste, en las 24 h de fermentación las especies *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus, P. membranifaciens* y *Sp. passalidarum* aumentan la concentración de etanol producida en medio YPX. Igualmente, los linajes de la especie *Sc. illinoinensis* sobrepasan la máxima concentración, pero solo hasta las 36 h. Esto puede estar asociado con la presencia de glucosa en el hidrolizado diluido (50%) que se fermenta rápidamente en las primeras horas, efecto que se ha informado mejora la fermentación de D-xilosa por un aumento en el flujo del carbono, resultando en una mayor producción de etanol (Gonçalves, 2013).

Los parámetros de fermentación para estas dos condiciones fueron calculados (Tabla 4). Solo para los linajes evaluados de las especies *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* y *P. membranifaciens* se evidenció una diferencia significativa tanto en el rendimiento como en la productividad del medio con hidrolizado respecto al medio YPX-2%, lo que indica que presentan una mayor producción de etanol por gramo de azúcar consumido cuando se encuentra glucosa presente en el medio con hidrolizado (50%), esto se relaciona con el aumento de la eficiencia en la fermentación de la D-xilosa. Los valores observados en el rendimiento de etanol para *Sp. passalidarum* en los dos medios evaluados, fueron superiores a los reportados para este mismo linaje en medio sintético con concentración de 100 g/L de D-xilosa que presentó un

rendimiento de 0.313 g/g, con una viabilidad celular inferior al 30% cuando fue expuesta al hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar (Pacheco et al., 2021). Para las demás especies productoras de etanol solo se evidencio diferencia en la productividad volumétrica. Linajes de *Sc. illinoinensis* evaluadas en hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar en diferentes condiciones experimentales, mayor concentración de D-xilosa, suplementación con fuentes de nitrógeno y densidad celular reportaron rendimientos de 0.19 g/g y 0.23 g/g (Ferreira et al., 2011; Cadete et al., 2017b) valores más bajos que los observados en este estudio.

Tabla 4. Parámetros de fermentación de levaduras productoras de etanol aisladas en bosques de robles en medio YPX-2% y medio HHBA (50%) (D-xilosa 2 %, ácido acético 3 g/L)

Especie	Linaje	Medio	Etanol (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g) [§]	Q_P (g/L.h)	η (%)	Tiempo (h)
P. membranifaciens	CQ7.1X	YPX	7.86±0.08	0.40	0.33	78	24
		Hidrolizado (50%)	8.51±0.11	0.43*[a]	0.35*[a]	84	24
Sc. cryptocercus/ virginianus	Qn8.1X	YPX	7.84±0.02	0.39	0.33	77	24
		Hidrolizado (50%)	8.50±0.02	0.43*[b]	0.35*[b]	84	24
Sc. illinoinensis	CQ6.1Xn	YPX	6.03±0.21	0.32	0.25	63	24
		Hidrolizado (50%)	5.39±0.18	0.36[a]	0.22*[a]	71	24
	Qn25.3Xn	YPX	6.29±0.12	0.32	0.26	63	24
		Hidrolizado (50%)	5.39±0.11	0.35[a]	0.22*[a]	70	24
Sp. passalidarum	NRRL-Y 27907	YPX	8.03±0.01	0.40	0.57	79	14
		Hidrolizado (50%)	4.53±0.03	0.47[a]	0.32*[b]	92	14

[a] Análisis paramétrico ANOVA; [b] Análisis no paramétrico Kruskal-Wallis

*Datos con diferencia estadísticamente significativos

[§]El rendimiento en el hidrolizado fue calculado a partir de azúcares totales consumidos (xilosa y glucosa)

Contrario a otros parámetros de fermentación, la productividad volumétrica solo se vio aumentada en medio HHBA (50%) para las especies *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* y *P. membranifaciens* evidenciando un comportamiento similar en estas condiciones para las dos especies. La levadura control *Sp. passalidarum* fue la que presentó un mayor decrecimiento en este valor. Se ha descrito que en condiciones de estrés las células activan una variedad de mecanismos moleculares que les permiten reconocer y responder a las duras condiciones ambientales contribuyendo a la supervivencia y el mantenimiento de la aptitud celular (Saini et al., 2018).

Los valores de pH al final de la fermentación (Figura 17) evidenciaron que los linajes con mejor respuesta al medio con hidrolizado (50%) *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* y *P. membranifaciens* presentan un mayor aumento de pH cuando se encuentran en medio nutritivo YPX, lo que puede representar un mecanismo a favor de la levadura cuando se encuentra en el medio con hidrolizado, pues su esfuerzo metabólico podría ser menor a las otras tres especies evaluadas. El pH final en el medio con hidrolizado fue similar para todos los linajes. Se ha relacionado el aumento del pH como respuesta fisiológica que se asocia al metabolismo del nitrógeno y específicamente al aumento drástico de la mayoría de los aminoácidos en presencia de inhibidores, lo que sugiere un aumento en la degradación de proteínas (Ding et al., 2012)

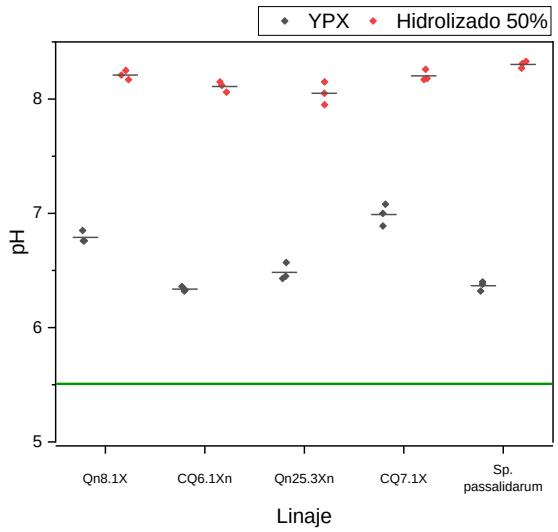


Figura 17. pH final en el proceso de fermentación de levaduras productoras de etanol, D-xilosa *P. membranifaciens* (CQ7.1X), *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X), *Sc. illinoinensis* (CQ6.1Xn; Qn25.3Xn) y *Sp. passaliadarum* (NRRL-Y 27907) en medio YPX y medio hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (50%). La línea verde es el valor de pH inicial del medio de fermentación.

Linajes de las especies *D. nepalensis* (Qn6.3Xn) y *Wickerhamomyces* sp. (CQ16.3Xn) que en los ensayos en microplaca evidenciaron un aumento en la tasa de crecimiento en la exposición al hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (50%), así como linajes de las especies *Sc. amazonensis* (Qn22.1X) y *Sc. coipomensis* (CQ10.2X) que presentaron una variación en la inhibición del crecimiento fueron evaluados en escala de laboratorio en los mismos medios del ensayo de tolerancia (Figura 18). *C. tropicalis* (FTI-20037) fue utilizada como control.

La presencia de HHBA (50%) en el medio de fermentación para las especies *Sc*. *amazonensis* y *Sc. coipomensis* evidenció un mayor decrecimiento en la producción de biomasa respecto al medio nutritivo YPX-2% (Figura 18a y 18b). Similar comportamiento presentó el consumo de D-xilosa (Figura 18c y 18d) para estas dos especies con decrecimientos del 32.4% y 28.9%, respectivamente. Cadete y colaboradores (2016) reportaron el efecto negativo de los inhibidores sobre estos parámetros cuando *Sc*. *amazonensis* fue expuesta a hidrolizado de cascarilla de arroz en concentración similar de la pentosa, evidenciando una relación en la respuesta con las condiciones de oxigenación. Para *Sc. coipomensis* no se tienen reportes de fermentación en presencia de inhibidores.

La especie *Wickerhamomyces* sp. mantuvo un crecimiento similar en los dos medios durante todo el tiempo de fermentación. En contraste, *D. nepalensis* durante las primeras 14 h mantuvo un crecimiento similar en los dos medios y en horas posteriores decreció la producción de biomasa en el medio con hidrolizado (50%) (Figura 18a y 18b). En el consumo de D-xilosa *Wickerhamomyces* sp. y *D. nepalensis* en las 24 h disminuyeron en un 14.9% y 15.9% respectivamente sin llegar al 100% del consumo en las 48 h de fermentación (Figura 18c y 18d). Comportamiento similar reportaron para el crecimiento de *D. nepalensis* en una mezcla de D-xilosa y glucosa retrasando el crecimiento celular cuando la glucosa se agota, respuesta relacionada con la represión catabólica de las enzimas responsables de la utilización de la D-xilosa o a la competencia por el transportador (Pappu & Gummadi, 2018). En otro estudio también se informó para *D. nepalensis* un consumo parcial de la pentosa en este tiempo de la fermentación de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar, logrando un consumo del 100 % de la D-xilosa hasta las 96 h (Paidimuddala & Gummadi, 2014).

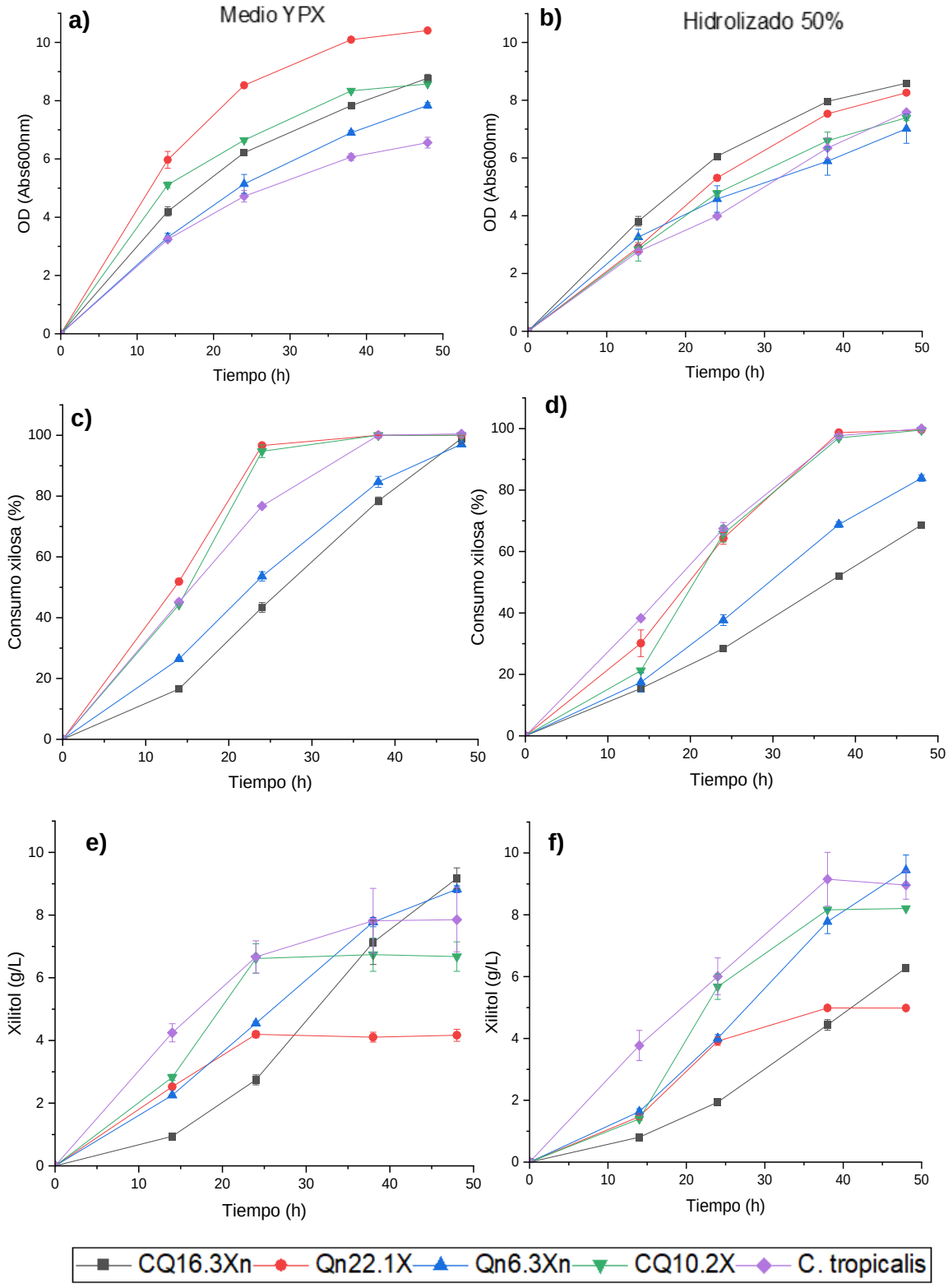


Figura 18. Producción de biomasa, consumo de D-xilosa y producción de xilitol por especies transformadoras de D-xilosa *Wickerhamomyces* sp. (CQ16.3Xn), *Sc. amazonensis* (Qn22.1X), *D. nepalensis* (Qn6.3Xn), *Sc. coipomensis* (CQ10.2X) y *C. tropicalis* (FTI-20037) en medio YPX-2% (a), (c) y (e) y hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (50%) (b), (d) y (f).

Para la levadura control *C. tropicalis* (FTI-20037) la producción de biomasa aumento después de las 24h en medio con hidrolizado (50%), alcanzando valores más altos en los tiempos posteriores de fermentación respecto al medio YPX-2%. El consumo de D-xilosa disminuyo 9.2% en las 24 h de fermentación. No obstante, similar al medio sin inhibidores la D-xilosa fue agotada a las 36 h (Figura 18c y 18d). El efecto de los compuestos inhibidores sobre el metabolismo de este linaje de *C. tropicalis* fueron descritos por Silva y Roberto (2001), cuando se realizó la fermentación en hidrolizado de cascarilla de arroz con alta concentración de D-xilosa (90 g/L), logrando consumir solo el 52% de la pentosa y reduciendo un 12% la producción de biomasa en 120 h de fermentación.

La producción de xilitol en las primeras 24 h evidenció una disminución en todos los linajes (Figura 18e y 18f) cuando el hidrolizado estuvo presente en el medio. Sin embargo, después de las 24 h para las especies *D. nepalensis, C. tropicalis, Sc. coipomensis* y *Sc. amazonensis* la producción de xilitol aumento en el medio con hidrolizado (50%) respecto a lo obtenido en el medio nutritivo YPX-2%. Es probable que la glucosa presente en el hidrolizado promueva un impacto positivo en la acumulación del xilitol actuando como fuente de carbono para satisfacer la demanda de intermediarios de carbono, regeneración de cofactores y energía (Pappu & Gummadi, 2018; Hernández-Pérez et al., 2020). La capacidad de disminuir la producción de biomasa y en consecuencia mejorar el rendimiento de xilitol en *Sc. amazonensis* había sido reportada en la fermentación de hidrolizados con condiciones de limitación de oxígeno severa (Cadete et al., 2016). En hidrolizados de bagazo de caña de azúcar con una concentración menor de ácido acético y una mayor concentración de inhibidores derivados de aldehídos, *C. tropicalis* FTI-20037 evidenció una fase de retraso en la producción de xilitol durante las primeras 10 h de fermentación, aumentando después de este tiempo su desempeño (Hernández-Pérez et al., 2016). Esta fase no fue evidenciada para este linaje en este trabajo, lo que puede sugerir en este linaje una susceptibilidad a los compuestos como el furfural e hidroximetilfurfural (5-HMF).

Estudios de las enzimas relacionadas con el metabolismo de las pentosas en *D. nepalensis* mostraron una actividad de XDH más elevada durante las primeras 12 h de fermentación para permitir la oxidación del xilitol hasta xilulosa dirigiendo el carbono hacia la vía respiratoria y generar la energía necesaria para procesos de

duplicación (Pappu & Gummadi, 2018). Lo que podría explicar la disminución observada de la acumulación de xilitol durante las primeras 24 horas de fermentación, que en condiciones de estrés en el medio HHBA (50%), prolongaría su actividad hasta lograr la regulación metabólica. En contraste a las demás especies evaluadas, *Wickerhamomyces* sp. disminuyo la producción de xilitol en todo el tiempo de fermentación en el medio con hidrolizado diluido, lo que evidencia la toxicidad del medio para las células, induciendo probablemente un cambio en el metabolismo para dirigir el carbono hacia la vía glucolítica, manteniendo la producción de biomasa y consecuentemente disminuyendo la acumulación de xilitol. Especies de interés biotecnológico para producción de xilitol pertenecientes al clado de *Wickerhamomyces* han demostrado capacidad para producir xilitol a partir de hidrolizados de bagazo de caña en diferentes condiciones de fermentación. *Wickerhamomyces anomalus* presentó una fase de adaptación en este sustrato durante las primeras 12 h, seguido de una alta producción de xilitol y consumo total de la D-xilosa (Carneiro et al., 2019). En contraste linajes de *Wickerhamomyces rabaulensis* evidenciaron una alta susceptibilidad a la presencia de los compuestos tóxicos disminuyendo considerablemente su desempeño fermentativo (Palladino et al., 2021).

Los parámetros de fermentación calculados en estas condiciones (Tabla 5) evidenciaron que el tiempo de máxima producción de xilitol en el medio con hidrolizado diluido (50%) para *Sc. amazonensis, Sc. coipomensis* y *C. tropicalis* es de 38 h, mientras que para *Wickerhamomyces* sp. y *D. nepalensis* es de 48 h. En la productividad se evidenció diferencia significativa entre los dos medios para las especies *Wickerhamomyces* sp. y *Sc. amazonensis* disminuyendo en la primera especie y aumentando en la segunda. Los linajes de las demás especies no presentaron diferencia significativa en este parámetro.

En el rendimiento las especies *Sc. amazonensis* y *D. nepalensis* presentaron un aumento significativo cuando transformaron la D-xilosa en el medio con hidrolizado diluido (50%). Este aumento en *Sc. amazonensis* podría relacionarse con una disminución del metabolismo respiratorio en presencia del hidrolizado, proceso que fue anteriormente reportado en la fermentación de hidrolizado de cascara de arroz en condiciones severas de limitación de oxígeno, evidenciando una mayor actividad enzimática de XR estrictamente dependiente de NADPH y una disminución en la

concentración de NAD^+, consecuentemente aumentando la producción de xilitol de 2.96g/L a 6.30g/L (Cadete et al., 2016). Contrario a lo observado en este trabajo para *D. nepalensis* estudios anteriores reportaron para un linaje de esta misma especie una leve disminución en el rendimiento del xilitol, cuando esta fue expuesta a la fermentación de hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar no detoxificado obteniendo un valor de 0.31g/g respecto al valor en un medio semisintético 0.35g/g para el mismo linaje (Kumar & Gummadi, 2011; Paidimuddala & Gummadi, 2014). Por el contrario, *Wickerhamomyces* sp. presentó una disminución significativa en el rendimiento del xilitol. Para el linaje control y en la especie *Sc. coipomensis* no existió un cambio significativo en este parámetro en la fermentación de los dos medios. *C. tropicalis* (FTI-20037) exhibió mayor tolerancia a los inhibidores presentes en el hidrolizado, resultados que ya han sido reportados para este linaje con hidrolizados de otras fuentes de biomasa y con diferentes condiciones de fermentación (López-Linares et al., 2018)

Tabla 5. Parámetros de fermentación de levaduras productoras de xilitol, aisladas en bosques de robles, en medio YPX-2% y medio HHBA (50%) (D-xilosa 2%; ácido acético 3 g/L).

Especie	Linaje	Medio	Xilitol (g/L)	$Y_{P/S}^{Xil}$ (g/g)	Q_P^{Xil} (g/L.h)	η^{Xil} (%)	Tiempo (h)
Wickerhamomyces sp.	CQ16.3Xn	YPX	9.17±0.33	0.49	0.19	53	48
		Hidrolizado (50%)	6.28±0.07	0.46* [a]	0.13* [b]	50	48
Sc. amazonensis	Qn22.1X	YPX	4.11±0.16	0.22	0.11	24	38
		Hidrolizado (50%)	4.99±0.08	0.25* [a]	0.13* [a]	28	38
D. nepalensis	Qn6.3Xn	YPX	8.83±0.11	0.50	0.18	54	48
		Hidrolizado (50%)	9.45±0.49	0.57* [a]	0.20 [a]	62	48
Sc. coipomensis	CQ10.2X	YPX	6.74±0.53	0.36	0.18	39	38
		Hidrolizado (50%)	8.16±0.03	0.42 [a]	0.21 [a]	46	38
	FTI-20037	YPX	7.82±1.03	0.41	0.21	45	38

Especie	Linaje	Medio	Xilitol (g/L)	$Y_{P/S}^{Xil}$ (g/g)	Q_P^{Xil} (g/L.h)	η^{Xil} (%)	Tiempo (h)
C. tropicalis (antes C. guilliermondii)		Hidrolizado (50%)	9.15±0.87	0.47 [a]	0.24 [a]	51	38

[a] Análisis paramétrico ANOVA; [b] Análisis no paramétrico Kruskal-Wallis
*Datos con diferencia estadísticamente significativos entre medios

La determinación del pH final de la fermentación (Figura 19) en los dos medios evidenció que *D. nepalensis* presentó los valores más bajos de pH tanto en el medio YPX-2% como en el medio con hidrolizado diluido (50%) y esta fue la especie que presentó los valores más altos de eficiencia. Mientras que *Sc. amazonensis* y *C. tropicalis* presentaron los valores más altos de pH para el medio con hidrolizado diluido (50%) siendo esta última la especie con los valores más altos en productividad. Los linajes de *Sc. coipomensis* y *Wickerhamomyces* sp. mostraron la menor diferencia en la alcalinización del medio nutritivo y el medio con hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (50%) con valores de 0.73 y 0.86, respectivamente.

En medios con presencia de ácido acético el pH juega un papel clave en la inhibición de los microrganismos fermentadores. Rodrigues y colaboradores (2003) estudiaron el efecto del pH en la fermentación de hidrolizado de bagazo de caña por *C. tropicalis* (FTI-20037) reportando una mayor producción de xilitol cuando el pH del medio fue de 5.5, de otro lado el aumento del pH hasta 7.5 mostró modificación en el flujo de carbono hacia procesos respiratorios consecuentemente con el aumento en la producción de biomasa, lo que se relaciona con la alta capacidad de alcalinizar el medio evidenciada en los resultados obtenidos en este trabajo. En contraste, *D. nepalensis* ha sido reportada como una levadura más adaptada a condiciones ácidas evidenciando la capacidad de mantener un pH cercano a la neutralidad (Kumar& Gummadi, 2008), resultados que también fueron observados en el linaje estudiado.

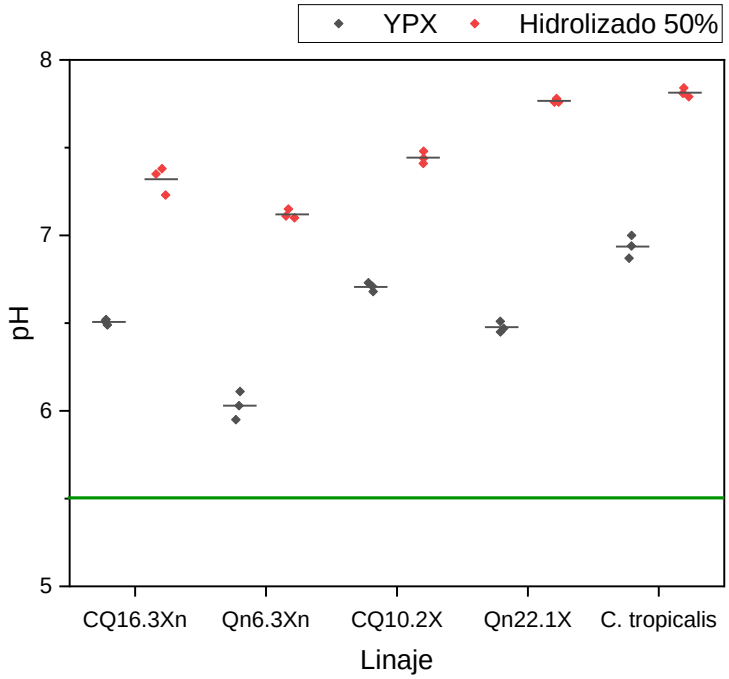


Figura 19. pH final en el proceso de fermentación de levaduras productoras de xilitol, *Wickerhamomyces* sp. (CQ16.3Xn), *Sc. amazonensis* (Qn22.1X), *D. nepalensis* (Qn6.3Xn), *Sc. coipomensis* (CQ10.2X) y *C. tropicalis* (FTI-20037) en medio YPX e hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (50%), n=3. Línea verde: pH inicial del medio.

3.2.3 Selección de linajes tolerantes a condiciones de estrés en hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar

Mediante el análisis de correlación de los parámetros evaluados (Figura 20) se evidenció diferencias entre las levaduras productoras de etanol (*P. membranifaciens* (CQ7.1X); *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X); *Sc. illinoinensis* (CQ6.1Xn; Qn25.3Xn) y *Sp. passaliadarum* (NRRL-Y 27907)) y los linajes productores de xilitol (*Wickerhamomyces* sp. (CQ16.3Xn); *Sc. amazonensis* (Qn22.1X); *D. nepalensis* (Qn6.3Xn); *Sc. coipomensis* (CQ10.2X) y *C. tropicalis* (FTI-20037)). En los linajes productores de etanol la tasa de crecimiento específica máxima (μ_{max}) evidenció una relación directa con el rendimiento y la eficiencia. En contraste, los linajes productores de xilitol no presentan relación entre los parámetros de fermentación con μ_{max}. Sin embargo, la densidad óptica máxima alcanzada presenta una relación inversa con todos los parámetros de fermentación, esta relación en los linajes productores de etanol es mucho más moderada. Estos resultados sugieren que se induce la actividad respiratoria en linajes productores de xilitol para producir biomasa, disminuyendo la

acumulación de xilitol (Zha et al., 2021). La relación directa entre la productividad y el rendimiento es más pronunciada en las levaduras productoras de xilitol que en las de etanol. Asimismo, la producción de xilitol evidencia mayor correlación directa con rendimiento y eficiencia en el proceso de producción de xilitol.

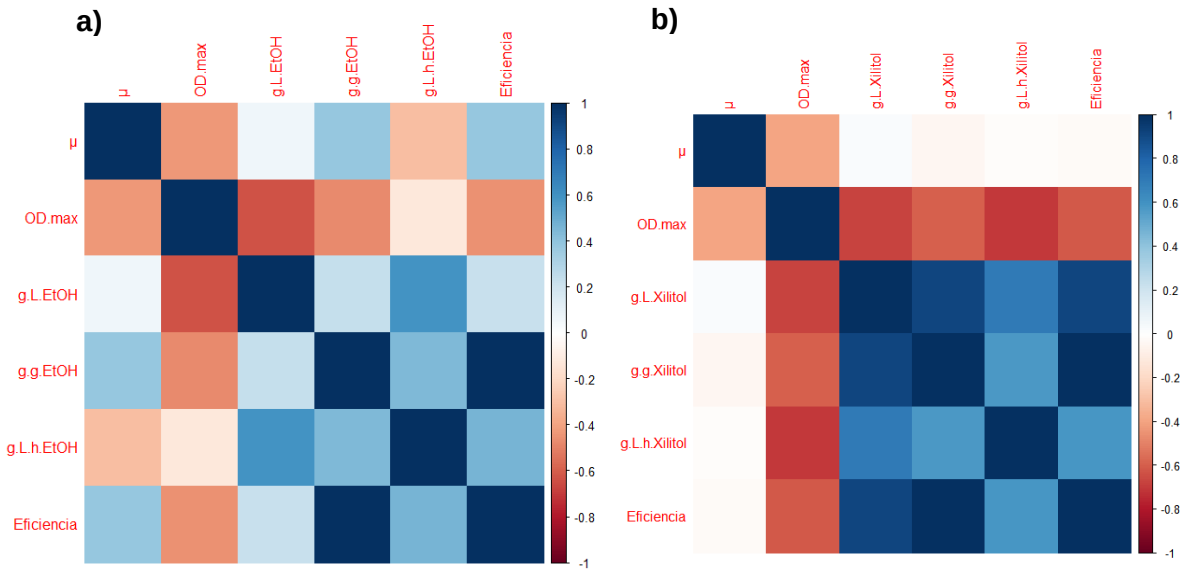


Figura 20. Matriz de correlación de los parámetros cinéticos de crecimiento y productividad de levaduras aisladas de bosques de robles productoras de (**a**) etanol y (**b**) xilitol

El análisis por componentes principales (PCA) fue realizado mediante la descomposición de la matriz de correlación de los parámetros de crecimiento y fermentación. Para las levaduras productoras de etanol la representación de los *scores* del componente 1 (Dim1) vs componente 2 (Dim2) (Figura 21) comprende el 75.1% del sistema. Se evidencia un agrupamiento por medio de fermentación implementado y se observa un mayor efecto del medio HHBA (50%) en los parámetros evaluados para la especie *Sp. passaliadarum.* Sin embargo, para el factor del medio YPX-2% todos los linajes se ubicaron en valores positivos de Dim2. Especies con mejores desempeños en esta condición se ubicaron hacia valores positivos del Dim1, siendo *Sp. passaliadarum* la especie con la más alta productividad volumétrica. La tendencia cuando los linajes estuvieron expuestos al medio con hidrolizado diluido (50%) fue hacia valores negativos del Dim2 y positivos del Dim1. Las variables eficiencia y rendimiento se representaron mejor en el componente 1, mientras que la productividad y producción en el componente 2.

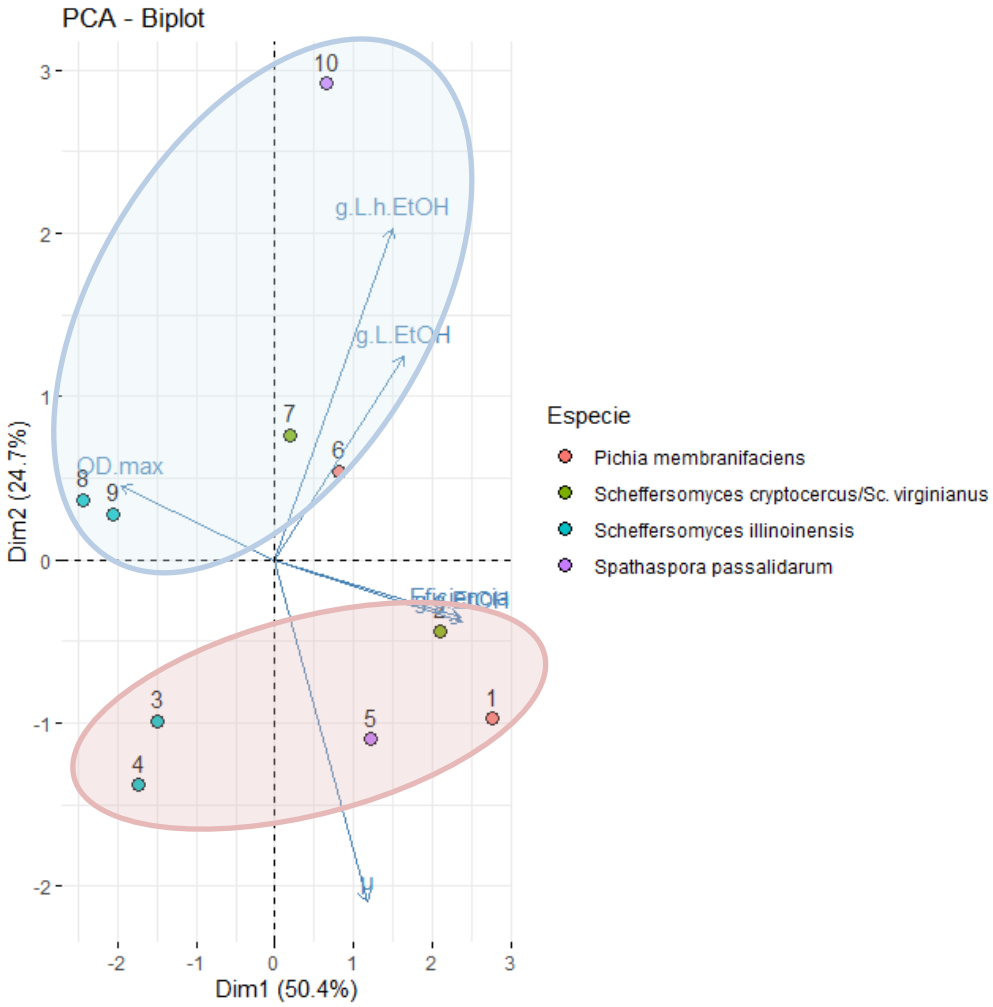


Figura 21. Biplot del análisis por componentes principales (PCA) de los parámetros y los linajes productores de etanol aislados en bosques de robles en HHBA (50%) (1-5) (elipse rosada) y medio YPX-2 % (6-10) (elipse azul).

Para las levaduras productoras de xilitol en el análisis por componentes principales (PCA) la representación de los *scores* del componente 1 (Dim1) vs componente 2(Dim2) (Figura 22) comprende el 85.5% del sistema. Se evidenció para el medio YPX-2% en la mayoría de las levaduras valores negativos en Dim2 excepto para *C. tropicalis*. El efecto a la exposición de hidrolizado diluido (50%) fue más pronunciado para las levaduras de las especies *Wickerhamomyces* sp. y *Sc. amazonensis*, Para *Sc. coipomensis* en medio HHBA (50%) los valores se correlacionaron con la tasa de crecimiento específica. En contraste con lo evidenciado para las levaduras productoras de etanol, en este conjunto de datos todos los parámetros de fermentación se encuentran más relacionados con el componente 1 hacia valores positivos en donde se ubicaron las especies de *D. nepalensis* y *C. tropicalis*.

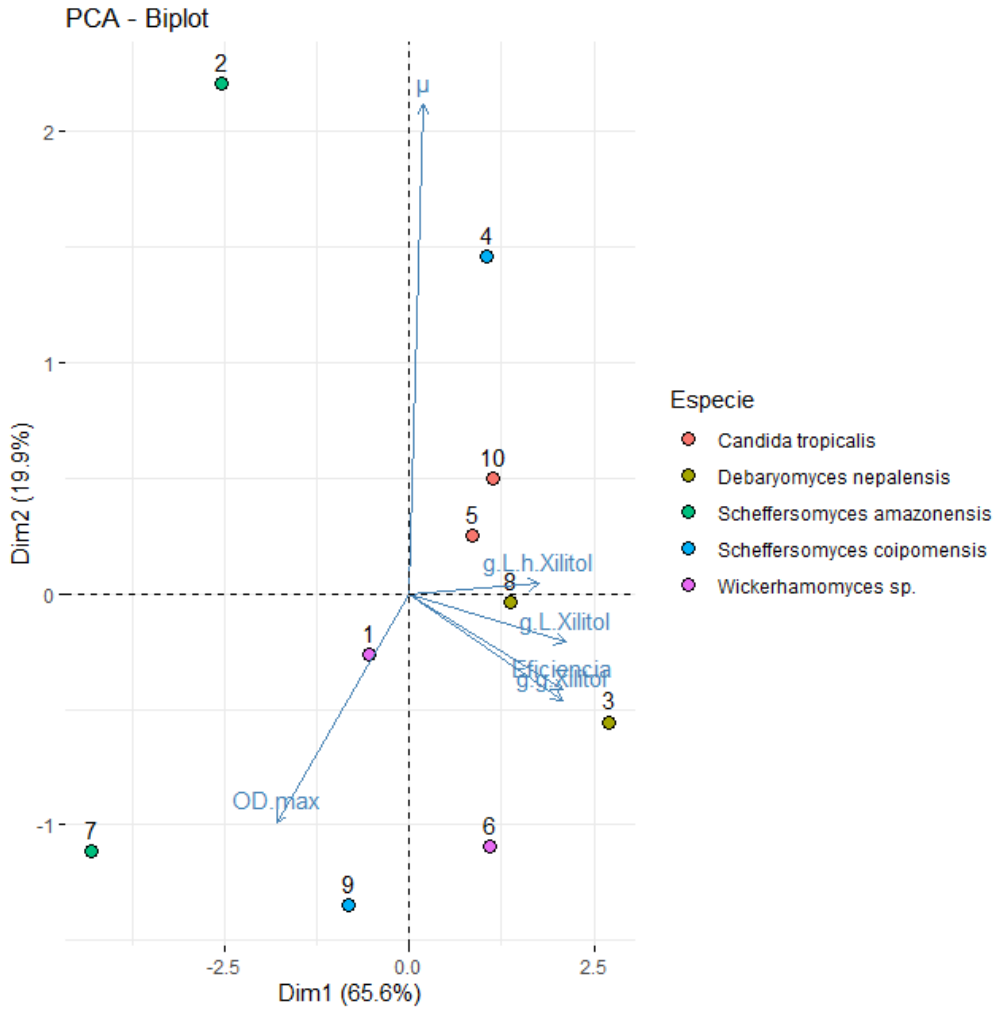


Figura 22. Biplot del análisis por componentes principales (PCA de los parámetros y los linajes productores de xilitol aislados en bosques de robles en medio con hidrolizado diluido (50%) (1-5) y medio YPX (6-10)

El estudio de correlaciones entre los linajes, en medio YPX-2% y medio con hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (50%), mediante el análisis de conglomerados jerarquizados (HCA del inglés *Hierarchical Cluster Analysis*) usando el método Ward.D (Figura 23) sugirió tres grupos como mejor opción de agrupamiento, tanto para los linajes productores de etanol como los de xilitol.

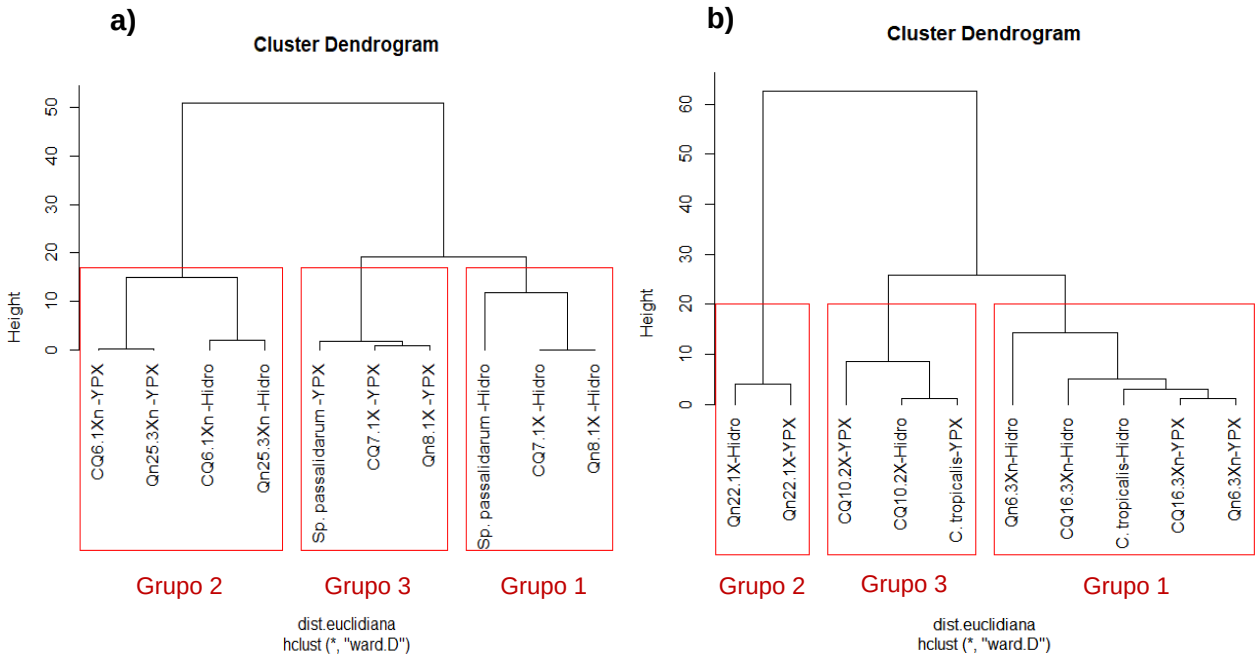


Figura 23. Dendograma de los linajes productores de (**a**) etanol (*P. membranifaciens* (CQ7.1X); *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X); *Sc. illinoinensis* (CQ6.1Xn; Qn25.3Xn) y *Sp. passaliadarum* (NRRL-Y 27907)) y (**b**) xilitol (*Wickerhamomyces* sp. (CQ16.3Xn); *Sc. amazonensis* (Qn22.1X); *D. nepalensis* (Qn6.3Xn); *Sc. coipomensis* (CQ10.2X) y *C. tropicalis* (FTI-20037)) en los medios de fermentación implementados (YPX, Hidro=medio con hidrolizado diluido (50%)), método Ward. D.

El análisis estadístico descriptivo de cada grupo de los linajes productores de etanol (Figura 24), permitió establecer que en el grupo 1 se encuentran los linajes que presentan un mejor desempeño en el medio HHBA (50%), caracterizados por mayor dispersión para valores de producción de etanol, esto relacionado a que se compone por tres diferentes especies de levaduras siendo *Sp. passaliadarum* (NRRL-Y 27907) la que presenta mayor susceptibilidad a la presencia de inhibidores. Asimismo, presenta valores de rendimiento y eficiencia mayores a los demás linajes evaluados y una moderada productividad. *Sp. passaliadarum* (NRRL-Y 27907) en medio YPX-2% presentó un valor alto en la productividad del grupo 2 lo que influye en la alta dispersión para este parámetro, confirmando su extraordinaria capacidad para metabolizar rápidamente la D-xilosa hasta etanol sin presencia de inhibidores. Este grupo presentó la agrupación del mayor número de linajes representado en todas las especies evaluadas, razón por la cual mostró una alta dispersión en el parámetro de producción. El grupo 2 se compone de dos linajes de la misma especie aislados de locales diferentes por lo que sus valores presentaron poca o nula dispersión.

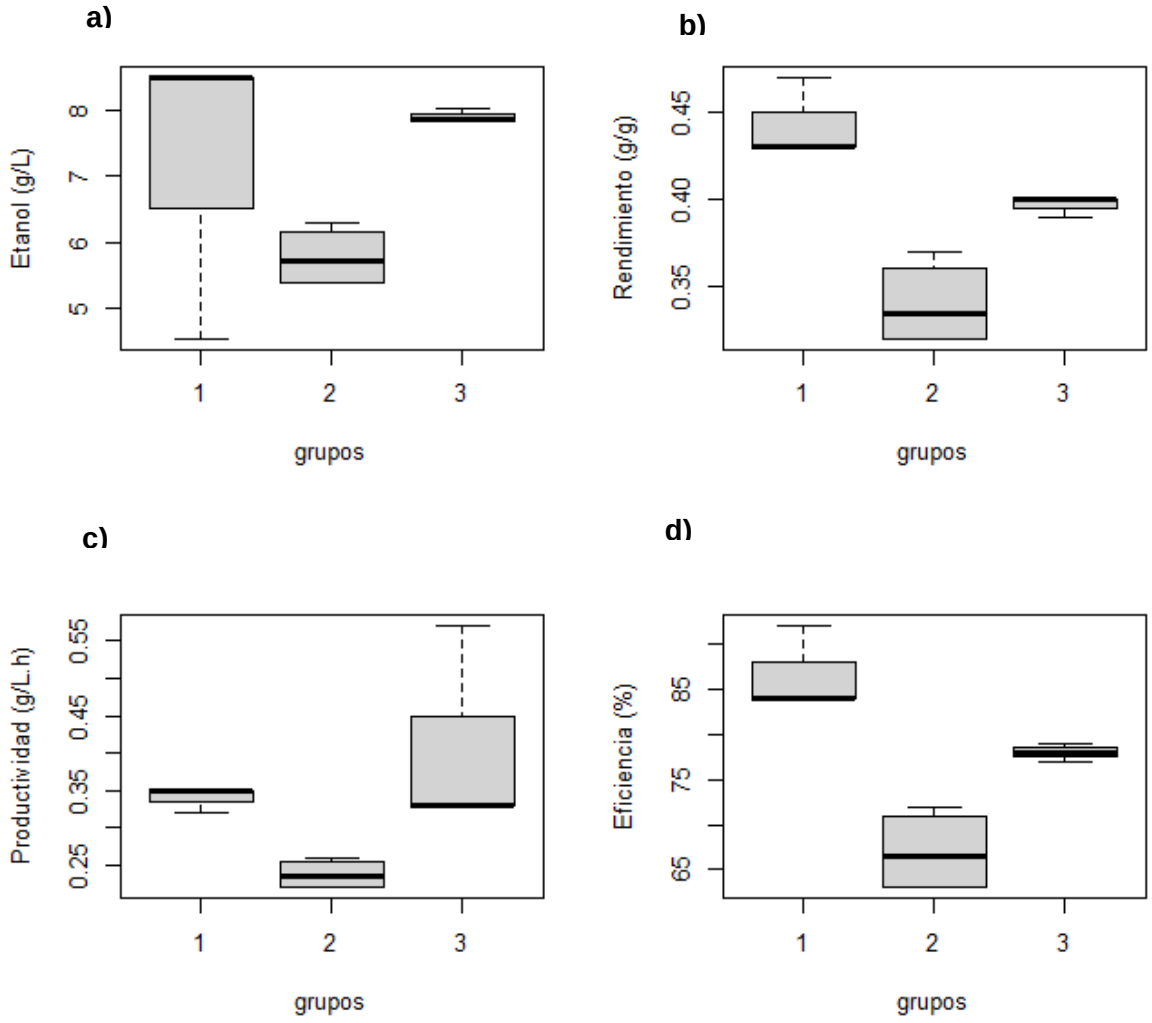


Figura 24. Boxplot para la descripción de cada grupo en el a) producción de etanol; b) rendimiento, c) productividad de etanol y d) Eficiencia.

Para el grupo de levaduras productoras de xilitol el análisis estadístico descriptivo (Figura 25), evidenció que en el grupo 1 se agrupan los linajes y condiciones con mejor desempeño, este grupo está representado con el mayor número de linajes pertenecientes a tres especies y diferentes medios de fermentación, lo que se relaciona con una mayor dispersión en el parámetro de productividad. Este grupo presenta los mayores valores de producción, rendimiento y eficiencia. Sin embargo, en la producción de xilitol se presenta un dato atípico que representa la susceptibilidad del linaje de *Wickerhamomyces* sp. en el medio con hidrolizado hemicelulósico diluido (50%) con valores más bajos. En el parámetro de rendimiento y eficiencia *D. nepalensis* evidenció datos atípicos periféricos con valores

más altos que los otros linajes del grupo. El linaje de *Sc. amazonensis* evidenció el desempeño más bajo de todo el conjunto, tanto en medio YPX como medio con hidrolizado hemicelulósico diluido (50%) que se ubicaron constituyendo el grupo 2. La distribución de las medidas centrales del grupo 2 obedecen al bajo número de levaduras en este grupo. El grupo 3 se caracterizó por una mayor uniformidad entre las dos especies que componen este grupo, *Sc. coipomensis* (en los dos medios de fermentación) y *C. tropicalis* (medio YPX) con valores moderados de producción, rendimiento y eficiencia y con valores superiores de productividad frente a los demás linajes productores de xilitol.

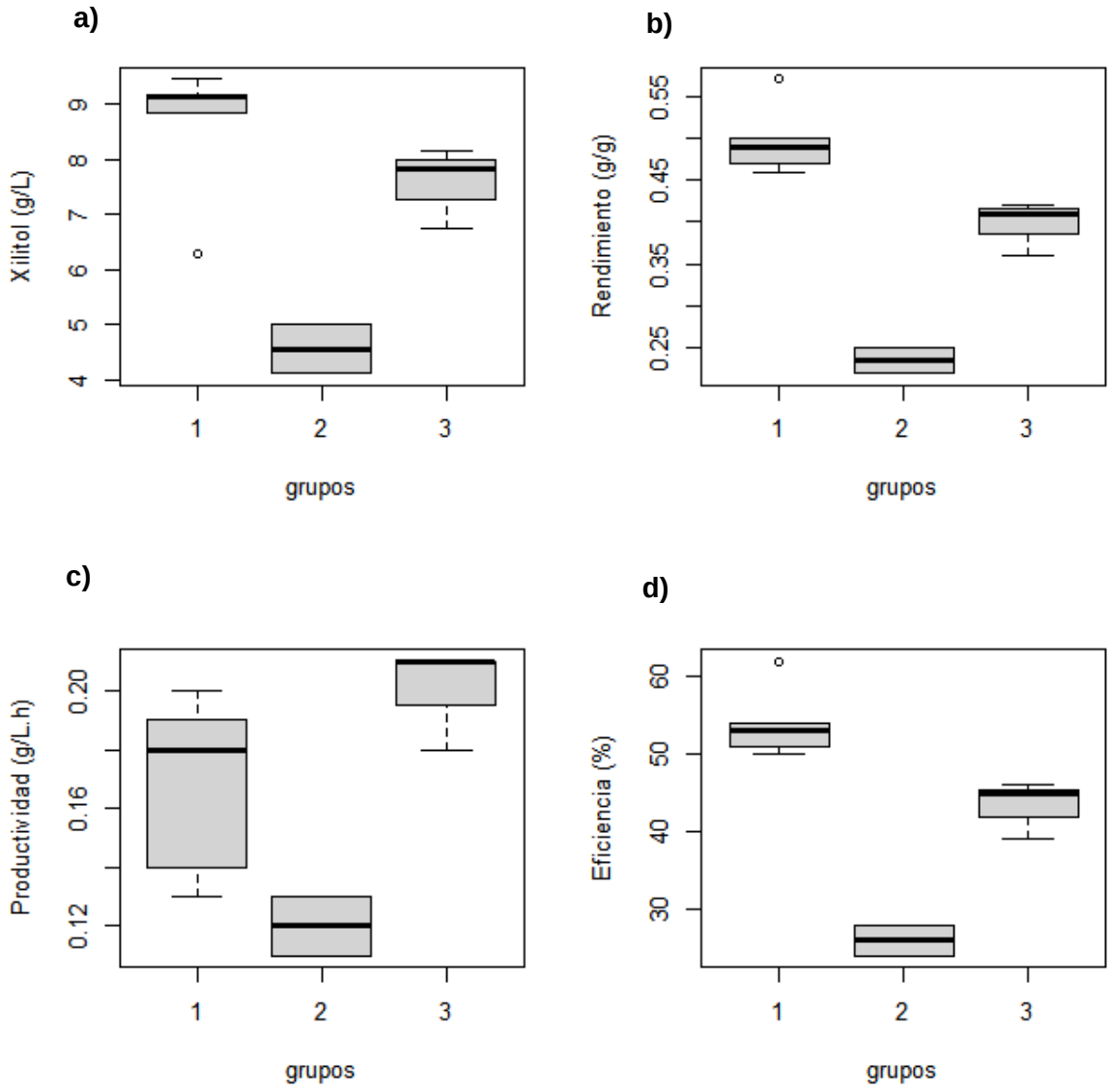


Figura 25. Boxplot para la descripción de caga grupo en el a) producción de xilitol; b) rendimiento, c) productividad de xilitol y d) Eficiencia.

3.2.4 Fermentación de D-xilosa por levaduras aisladas en ambientes fermentativos

Cincuenta linajes de levaduras aisladas en ambientes fermentativos fueron evaluados para la fermentación de D-xilosa, en donde el 28 % no mostró crecimiento en un medio sólido que contenía un 1 % de D-xilosa. Como resultado 36 linajes fueron cultivados en un medio líquido que contenía 2% de D-xilosa, pero solo 12 presentaron capacidad para asimilar y transformar la D-xilosa (Anexo E).

La Tabla 6 muestra los resultados de identificación de las doce levaduras asimiladoras de D-xilosa, el sustrato de aislamiento de cada especie y la temporada de muestreo. El mayor número de aislamientos evaluados pertenecen a la especie *Meyerozyma caribbica*, la cual fue aislada en las dos épocas del año y en seis sustratos diferentes muestreados en el trapiche y bebidas fermentadas. Todos los demás aislamientos se obtuvieron en época de lluvia, dos pertenecientes a la especie *Clavispora* sp. una posible especie nueva aislada de diferentes sustratos asociados a la caña de azúcar. *Clavispora* sp. (código deposito GenBank Access ON908680) presenta en la región LSU una diferencia de 4 nucleótidos y 3 gaps con *Candida pseudointermedia* y en la región ITS una diferencia de 15 nucleótidos y 5 gaps. Se aislaron dos linajes de la especie *Candida tropicalis* del bagazo de caña de azúcar y una cepa de *Wickerhamomyces anomalus* se aisló del guarapo, una bebida artesanal fermentada que puede presentar pH ácido, concentraciones de etanol entre 0.50% y 6.94% e incluye en su composición química ácido orgánico, sales, polisacáridos, proteínas, minerales y otros compuestos (Chaves-López et al., 2014; Robledo-Márquez et al., 2021).

Se han aislado linajes de *M. caribbica* (anteriormente *Pichia caribbica*) de diferentes sustratos que incluyen suelo, almidón derivado del maíz, caña de azúcar (Kurtzman et al., 2011), frutas, madera en descomposición y ambientes relacionados con la fermentación, como las bebidas destiladas de agave (Lappe-Oliveras et al., 2008), jugo de manzana fermentado (Arumugam et al., 2020), viñedos (Rossouw & Bauer, 2016). Cepas de esta especie han sido de interés en el control biológico de fitopatógenos, en la producción de xilitol y su potencial probiótico (Amorim et al., 2018, Trichez et al., 2019, González-Gutiérrez et al., 2021).

Wickerhamomyces anomalus (anteriormente *P. anomala*, *H. anomala*, *C. pelliculosa*) es prevalente en la naturaleza, se encuentra en el suelo, material vegetal y como un patógeno oportunista de humanos y animales (Kurtzman et al., 2011), también se ha descrito en fermentaciones industriales y espontáneas, ambientes de fermentación como vinos, fermentación de granos de cacao y destilería de cachaza (Padilla et al., 2018; Cunha et al., 2020; Delgado-Ospina et al., 2020). Esta especie presenta especial interés para la industria del vino por producir enzimas y metabolitos de relevancia enológica también en la producción de biosurfactantes, xilitol y bioetanol de segunda generación (Padilla et al., 2018; Souza et al., 2018; Carneiro et al., 2019).

Tabla 6. Identificación de levaduras productoras de xilitol aisladas en ambientes fermentativos de caña de azúcar y bebidas tradicionales en las dos temporadas climáticas del año.

Código IBUN	Código de colecta	Sustrato	Temporada	Especie relacionada*
IBUN-03526	UN108-5	Jugo de caña	Seca	*Clavispora* sp.
IBUN-03566	UN116-4	Bagazo de caña	Seca	*Clavispora* sp.
IBUN-03567	UN116-5	Bagazo de caña	Seca	*Candida tropicalis*
IBUN-03565	UN116-3	Bagazo de caña	Seca	*Candida tropicalis*
IBUN-03596	UN120-14	Guarapo	Seca	*Meyerozyma caribbica*
IBUN-03625	UN206-5	Jugo de caña	Lluvia	*Meyerozyma caribbica*
IBUN-03642	UN209-4	Jugo de caña	Lluvia	*Meyerozyma caribbica*
IBUN-03502	UN104-2	Caña de azúcar	Seca	*Meyerozyma caribbica*
IBUN-03513	UN105-14	Caña de azúcar	Seca	*Meyerozyma caribbica*
IBUN-03545	UN112-2	Bagazo de caña	Seca	*Meyerozyma caribbica*
IBUN-03558	UN113-3	Cachaza	Seca	*Meyerozyma caribbica*
IBUN-03594	UN120-12	Guarapo	Seca	*Wickerhamomyces anomalus*

*Basado en la región ITS-5.8S y los dominios variables D1/D2 de la subunidad mayor del gen rRNA (LSU).

Clavispora sp. está estrechamente relacionado con *C. pseudointermedia* y *C. intermedia* (clado *Clavispora*), especies consideradas generalistas (Kurtzman et al., 2011), debido a la variedad de sustratos a partir de los cuales se han descrito varios

linajes. Algunos sustratos reportados para estas especies están asociados con plantas, insectos, ambientes fermentativos y materia orgánica en descomposición (Kurtzman et al., 2011; Limtong & Kaewwichian, 2015; Moreno, et al., 2017; Barrilli et al., 2020). Estas especies son de gran interés por su capacidad metabólica para asimilar una variedad de sustratos como glucosa, D-xilosa y celobiosa (Bazoti et al., 2017; Wu et al., 2018; Barrilli et al., 2020).

C. tropicalis es una de las especies de *Candida* más importantes. Ha sido considerada entre las más virulentas después de *C. albicans* porque presenta una amplia variedad de factores de virulencia y se caracteriza por producir biopelículas (Zuza-Alves et al., 2017). Sin embargo, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos ha permitido su uso para la producción de xilitol (Junior et al., 2019; Lourenço et al., 2014). Se han aislado varios linajes de diferentes ambientes como miel (Kim et al., 2019), ensilaje de maíz y residuos de viticultura (Altamirano et al., 2000), hormiguero, frutas, mosto de vino (Martins et al., 2018), suelo (Mattam et al., 2016) y flores (Misra et al., 2012). Además, *C. tropicalis* se usa ampliamente en procesos de biorremediación, producción de xilanasas, etanol (Shariq y Sohail, 2019) y producción de ácido cítrico (Kim et al., 2015).

La evaluación de doce linajes de levaduras para la fermentación de D-xilosa evidenció la producción de xilitol como principal producto del metabolismo. La Tabla 7 resume los parámetros de fermentación que se calcularon según el tiempo de fermentación (tiempo de máxima producción de xilitol) para cada linaje de levadura. Todas las cepas de *M. caribbica* mostraron los mayores rendimientos con valores superiores a 0.63 g/g y eficiencia de conversión con valores que oscilan entre 68 y 87%, no se observó la producción de etanol. Esta especie ya ha sido descrita para la transformación de D-xilosa a xilitol, Trichez et al. (2019) reportaron un rendimiento de 0.54 g/g y una productividad de 0.1 g/ L.h para *M. caribbica* JA9 cuando se evaluó en un biorreactor en medio mineral con 40 g/L de D-xilosa.

Los linajes de *C. tropicalis* presentaron el mayor consumo de D-xilosa alcanzando valores del 90% y revelaron una productividad volumétrica de 0.27 g/L y 0.29 g/L. Tamburini et al. (2015) utilizaron *C. tropicalis* DSM 7524, evaluando la producción de xilitol con una concentración inicial de D-xilosa de 40 g/L en matraces, con medio mineral a 32 °C y agitación de 200 rpm, y la productividad volumétrica fue

de 0.204 g/L.h, valor muy cercano a los obtenidos en este trabajo. *C. tropicalis* es una de las especies productoras de xilitol más estudiada debido a los altos rendimientos alcanzados. Sin embargo, la heterogeneidad de los diseños experimentales empleados para la fermentación en estos estudios hace difícil la comparación de los datos.

Clavispora sp. fue la especie que presentó la menor eficiencia de conversión. Los linajes alcanzaron la máxima producción de xilitol a las 71 h con un valor máximo de eficiencia del 57%, a pesar del alto consumo de D-xilosa en esta especie. La capacidad de producir xilitol es un rasgo metabólico compartido con las especies estrechamente relacionadas *C. pseudointermedia* que se ha informado presentó una productividad de 0.27 g/L.h y rendimiento de 0.39 g/g en medio suplementado (Guamán-Burneo et al., 2015) y *C. intermedia* que alcanzó una productividad de 0.38 g/L.h y rendimiento de 0.76 g/g en un medio rico en nutrición con alta concentración de D-xilosa (Wu et al., 2018).

Tabla 7. Parámetros de fermentación de levaduras productoras de xilitol aisladas en ambientes fermentativos en medio YPX (D-xilosa 4 %)

Linaje	Consumo de D-xilosa (g/L)	Xilitol (g/L)	$Y_{P/S}^{Xil}$ (g/g)	Q_P^{Xil} (g/L.h)	η^{Xil} (%)	Tiempo (h)
***Clavispora* sp.**						
IBUN-03526 (UN108-5)	26.7 ± 0.3	13.9 ± 0.8	0.52 ^{C,D}	0.20 ^{D,E}	57	71
IBUN-03566 (UN116-4)	30.4 ± 5.2	14.9 ± 1.0	0.48 ^{D}	0.21 ^{C,D,E}	52	71
Candida tropicalis						
IBUN-03567 (UN116-5)	34.2 ± 2.0	20.4 ± 1.8	0.60 ^{B,C,D}	0.29 ^{A,B}	65	71
IBUN-03565 (UN116-3)	30.0 ± 1.8	18.8 ± 0.4	0.63 ^{B,C,D}	0.27 ^{A,B,C}	68	71
Meyerozyma caribbica						
IBUN-03596 (UN120-14)	24.6 ± 1.7	17.4 ± 1.7	0.71 ^{A,B}	0.25$^{A,B.C.D}$	77	71
IBUN-03625 (UN206-5)	26.0 ± 1.7	16.3 ± 1.7	0.63 ^{A,B,C,D}	0.23^{B,C,D,E}	68	71

Linaje	Consumo de D-xilosa (g/L)	Xilitol (g/L)	$Y_{P/S}^{Xil}$ (g/g)	Q_P^{Xil} (g/L.h)	η^{Xil} (%)	Tiempo (h)
IBUN-03642 (UN209-4)	27.2 ± 1.3	17.8 ± 1.8	0.66 ^{A,B,C,D}	0.25^{A,B,C,D}	71	71
IBUN-03502 (UN104-2)	30.1 ± 3.9	21.6 ± 2.7	0.72 ^{A,B}	0.30 ^{A}	78	71
IBUN-03513 (UN105-14)	27.6 ± 2.3	19.6 ± 1.7	0.71 ^{A,B}	0.28 ^{A,B}	78	71
IBUN-03545 (UN112-2)	27.9 ± 2.6	19.4 ± 1.2	0.70 ^{A,B,C}	0.27 ^{A,B}	76	71
IBUN-03558 (UN113-3)	25.2 ± 0.4	20.0 ± 1.2	0.80^{A,B,C}	0.28 ^{A,B}	87	71
Wickerhamomyces anomalus						
IBUN-03594 (UN120-12)	23.9 ± 1.6	16.3 ± 0.6	0.68 ^{A,B,C}	0.17 ^{E}	74	95
Control positivo						
***C. tropicalis* FTI20037**	34.6 ± 2.6	17.9 ± 1.7	0.52 ^{C,D}	0.25$^{A,B,C.D}$	56	71

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (test Tukey)

Todas las levaduras evaluadas mostraron rendimientos de xilitol superiores a los del linaje control *C. tropicalis* FTI20037 en las condiciones del ensayo. Sin embargo, la especie *W. anomalus* presentó la menor productividad 0.171 g/L.h, alcanzando su máxima producción de xilitol solo hasta las 95 h. Aunque esta especie multitolerante se ha estudiado ampliamente por su capacidad para fermentar glucosa en etanol de manera eficiente (Atitallah et al., 2020), su capacidad para transformar la D-xilosa aún no está bien caracterizada. Carneiro et al. (2019) describieron la capacidad de la cepa *W. anomalus* 740 aislada de un ingenio de caña de azúcar para producir 24 g/L de xilitol a las 44 h en hidrolizado de bagazo de caña de azúcar. Este reporte muestra una productividad volumétrica mucho mayor que las observadas para el linaje evaluado en este trabajo bajo condiciones menos estresantes para las células.

Linajes que presentaron mayor porcentaje de eficiencia de las especies *M. caribbica* y *C. tropicalis* fueron evaluadas frente a la tolerancia de HHBA 50% (Figura

26). *C. tropicalis* evidenció inhibición en el crecimiento en presencia de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (50%). En contraste, el linaje de *M. caribbica*, presentó un aumento en la tasa de crecimiento especifica máxima cuando el hidrolizado estaba presente en el medio.

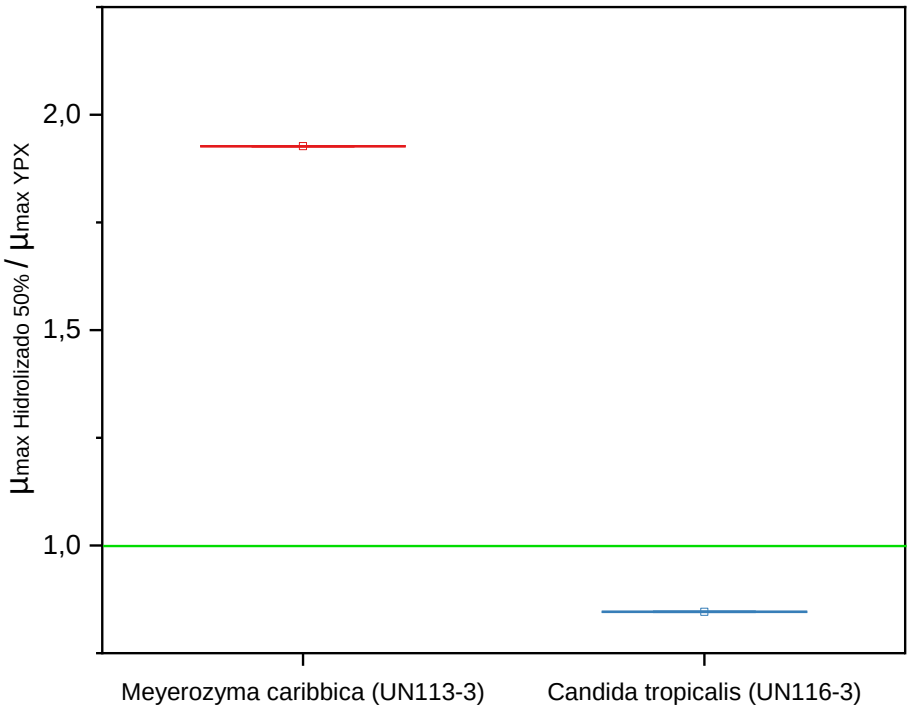


Figura 26. Inhibición del crecimiento de linajes productores de xilitol, aisladas en ambientes fermentativos, en presencia de hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (50%). ($\mu_{max\ Hidrolizado\ 50\%}$ / $\mu_{max\ YPX}$)

3.3 Conclusiones

El estudio del potencial de fermentación de D-xilosa por 21 especies de levaduras aisladas de bosques de robles evidenció mayor diversidad en las levaduras productoras de xilitol con un 85.7% de especies, siendo solo el 14.3% de las especies productoras promisorias de etanol. Además, se describe por primera vez la capacidad productora de etanol para linajes de la especie *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus*, y la capacidad productora de xilitol para linajes de *Sc. coipomensis*, confirmando el potencial del género *Scheffersomyces* para la transformación de la pentosa.

La producción de xilitol por parte de tres posibles especies nuevas de levaduras aisladas de bosques de robles *Scheffersomyces* sp.1, *Scheffersomyces* sp.3 y *Wickerhamomyces* sp. con valores de producción por encima de 18 g/L, evidencian el potencial de la diversidad en estos ecosistemas para la búsqueda y estudio de microorganismos de interés biotecnológico.

Para la discriminación de levaduras tolerantes a la presencia de inhibidores en las condiciones estudiadas, el análisis multivariado a partir de los parámetros de fermentación y crecimiento de las levaduras aisladas en bosques de robles permitió determinar para el grupo de levaduras productoras de etanol a *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X) y *P. membranifaciens* (CQ7.1X) que presentaron parámetros de crecimiento y fermentación muy similares, en la fermentación del hidrolizado. En el grupo de levaduras productoras de xilitol *D. nepalensis* evidenció mayor tolerancia a las condiciones de estrés en presencia de HHBA (50% v/v).

Se evidenció diferencias en el metabolismo para dirigir la D-xilosa hasta xilitol o etanol, a partir del estudio de la correlación de los parámetros de fermentación y crecimiento de las levaduras aisladas en bosques de robles. La eficiencia del metabolismo etanólico aumenta con la velocidad de crecimiento de la levadura y con la disminución en la producción de biomasa. El metabolismo del xilitol no presenta dependencia con la velocidad de crecimiento y su eficiencia dependen de la capacidad de acumulación del metabolito y disminución de producción de biomasa. Lo que sugiere que no es suficiente los parámetros de crecimiento para evaluar la aptitud en procesos de transformación de D-xilosa.

Metabolismos de interés biotecnológico también están presentes en levaduras que colonizan ambientes fermentativos. En este estudio *C. tropicalis* FTI20037, siendo *M. caribbica* (IBUN-03558) y *C. tropicalis* (IBUN-03565) presentaron capacidad de transformar la D-xilosa hasta xilitol en condiciones de estrés ácido.

CAPITULO 4: Respuesta fenotípica de levaduras trasformadoras de D-xilosa a condiciones de estrés en hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar

Las levaduras utilizan varios mecanismos de protección celular que se activan cuando las células se exponen a condiciones estresantes. Existen sistemas complejos de vías de señalización desde la superficie celular hasta el núcleo que permiten el reconocimiento de los cambios ambientales externos, promoviendo que las señales de estrés ambiental se transformen en alteraciones en la expresión génica (Lin et al., 2021), adaptando su metabolismo central. La adaptación es fundamental para mantener el desempeño y la vitalidad celular, y las levaduras que pueden adaptarse rápidamente y obtener una sinergia entre las diversas tensiones prosperarán y proliferarán en estas condiciones adversas (Brandt et al., 2021). La evolución de las respuestas al estrés en las levaduras refleja los desafíos ambientales planteados por sus respectivos nichos, y la naturaleza del nicho es relevante al examinar las adaptaciones a condiciones de estrés (Brown et al., 2020).

En los procesos de conversión de la biomasa por fermentación, las levaduras están expuesta a diversos tipos de estrés ambiental, como alta temperatura, alta osmolaridad, estrés ácido y oxidativo (Lin et al., 2021). El crecimiento bajo condiciones tan diversas requiere el mantenimiento del sistema interno; que debe lograr un cambio rápido en el programa celular; sin embargo, estas variaciones esenciales para el mantenimiento están determinados por los desafíos externos (Saini et al., 2018). Los mecanismos de tolerancia de las células de levadura a diferentes factores de estrés ambiental son diversos, pero a veces comparten la misma vía de señalización (Lin et al., 2021). Li y colaboradores (2022) agruparon las respuestas a estrés descritas para levadura, a partir de estudios desde las herramientas de biología molecular y la tecnología de la ingeniería genética, en cinco grupos de regulación; regulación de pared/membrana celular, regulación energética, regulación de aminoácidos, regulación de transcripción /traducción, y regulación redox.

La respuesta al estrés genera cambios fenotípicos en la estructura y el metabolismo del organismo que son causados por la activación de diversas vías que regulan la expresión de genes y factores de trascripción implicados en la síntesis de

compuestos específicos que protegen al organismo (Saini et al., 2018). Diferentes vías han sido descritas en la participación de los mecanismos de respuesta al estrés en levaduras como la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés); la vía del glicerol de alta osmolaridad (HOG, por sus siglas en inglés), la respuesta al choque térmico (HSR, por sus siglas en inglés), la vía de la señalización del objetivo de la rapamicina (TOR, por sus siglas en ingés), y la vía de integridad de la pared celular (CWI, por sus siglas en inglés) (Ndukwe et al., 2020; Lin et al., 2021). Se han identificado conjuntos de genes y productos de genes asociados a estas vías que se regulan positiva y negativamente a condiciones de estrés con una superposición significativa entre diferentes factores de estrés (Brandt et al., 2021). Existe un programa de respuesta central también llamado respuesta al estrés ambiental (ESR, por sus siglas en inglés) que es general, y brinda ventajas de aptitud física por encima de las respuestas específicas al estrés, razón por la que probablemente sean más exigentes desde el punto de vista energético (Brown et al., 2020), además se ha descrito que juega un papel potencial en la inducción de mutagénesis en presencia de tensiones que pueden causar inestabilidad genética en microorganismos (Saini et al., 2018).

Los mecanismos presentes en los organismos unicelulares que les permiten reconocer y responder rápidamente a un factor dañino, es el proceso estocástico de reordenamiento de genes, que hace que ciertas células de la población se vuelvan resistentes al efecto de un factor de estrés ambiental (Święciło et al., 2016). La activación de estos programas de respuesta puede proveer protección cruzada contra diferentes factores de estrés donde las células expuestas a una dosis leve de un estrés se vuelven resistentes a dosis grandes y generalmente letales del mismo factor o de otro tipo (Ndukwe et al., 2020; Brown et al., 2020). Esta capacidad de reconfiguración del genoma para regular al alza los genes necesarios para sobrevivir en condiciones de estrés y brindar defensa para futuras exposiciones a ambientes hostiles, ha sido explotada implementando estrategias de adaptación mediante el diseño y la aplicación de regímenes de cultivo que confieren una ventaja selectiva específica (Mans et al., 2018).

Los microorganismos tienen redes reguladoras complejas y eficientes que responden a los cambios en el entorno de cultivo, por lo tanto, las células que se han

adaptado a un entorno estresante pueden aumentar su tolerancia al estrés (Tan et al., 2022). Los experimentos de adaptación son una herramienta para el desarrollo del fenotipo deseado y mejorar las propiedades genéticamente complejas y de importancia industrial de la levadura (Saini et al., 2018). La adaptación a corto plazo de las células en la etapa de propagación mediante un cultivo para la obtención del inóculo de fermentación ha evidenciado mejorar su tolerancia y desempeño (Van Dijk et al., 2019). La aplicación de regímenes de cultivo como experimentos de adaptación a menudo revelan compensaciones entre un rasgo seleccionado y otros aspectos de la fisiología de la levadura, lo que permite aprovechar el proceso de selección natural para obtener y comprender nuevos fenotipos microbianos (Mans et al., 2018).

4.1 Materiales y Métodos

4.1.1 Ensayos de fermentación de levaduras productoras de xilitol aisladas en ambientes fermentativos en condiciones de estrés ácido y térmico

La respuesta al estrés térmico y ácido fueron evaluados en linajes de levaduras aisladas de ambientes fermentativos con mejor desempeño en la transformación de D-xilosa hasta xilitol (numeral 3.3.4).

Estrategia de cultivo para preparación de inóculo

Las levaduras fueron crecidas en placa con medio YM (que contiene glucosa 1%, extracto de levadura 0.3%, extracto de malta 0.3%, peptona bacteriológica 0.5%, agar 2% y pH 5.5), a 30 °C durante 48 h. Tres condiciones de temperaturas fueron implementadas como estrategia para la preparación del inóculo. Una colonia de cada levadura fue crecida por triplicado para cada condición en 40 mL de medio liquido YPX-2% en Erlenmeyer (100 mL de capacidad) con tapón de algodón. En la primera condición el crecimiento se realizó a 30 °C, 180 rpm por 24 h; en la segunda condición, el crecimiento se realizó a 180 rpm a 30°C por 16h y expuestas a 37 °C durante 8 h; en la última condición el crecimiento se realizó a 180 rpm a 30 °C por 16 h y expuestas a 10°C durante 8 h. Las células de las levaduras fueron recuperadas por centrifugación a 6000 xg durante 15 min, lavadas dos veces con NaCl (0.85%). Se ajusto el inóculo de la fermentación a 1 g/L de acuerdo con las curvas de biomasa previamente construidas a partir de la correlación de OD_{600nm} y el peso seco.

Condiciones de fermentación

Las fermentaciones fueron realizadas en Erlenmeyer (125 mL de capacidad) con tapón de algodón, el volumen de trabajo fue de 50 mL y el medio de fermentación fue YPX (el cual contiene extracto de levadura 1%; peptona 2 %; D-xilosa 5%, pH 5.5) suplementado con ácido acético a una concentración de 2 g/L y 6 g/L. La incubación fue realizada a 200 rpm, a 30 °C durante 113h, tomando alícuotas en 15, 24, 48, 72, 96 y 113 horas. El seguimiento a la fermentación fue realizado de acuerdo con los métodos analíticos descritos en el numeral 3.1.1.

4.1.2 Ensayos de fermentación de levaduras productoras de xilitol y etanol aisladas en bosques de robles en condiciones de estrés en hidrolizados hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar (HHBA)

Condiciones de fermentación

Las fermentaciones fueron realizadas en Erlenmeyer (125 mL de capacidad) con tapón de algodón, el volumen de trabajo fue de 50 mL y se implementaron tres medios de fermentación. Como control se usó el medio YPX (el cual contiene extracto de levadura 1%; peptona 2 %; D-xilosa 5%, pH 5.5). Se implementó hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido al 75% ajustando la concentración de azúcar a ~ 50 g/L y pH 5.5 e hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar sin diluir obtenido de acuerdo con lo descrito en el numeral 3.1.2, suplementados con extracto de levadura (1%) y peptona (2%). La incubación fue realizada a 200 rpm, a 30 °C durante 120h, tomando alícuotas cada 24h aproximadamente.

Estrategia de cultivo para preparación de inóculo en la fermentación del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar diluido (HHBA, 75%)

Las levaduras fueron crecidas en placa con medio YM a 30°C durante 48 h. Una colonia de cada levadura fue crecida por triplicado para cada condición en de medio liquido YPX-2% en Erlenmeyer (125mL de capacidad) con tapón de algodón. Un total de cuatro condiciones fueron evaluadas. Dos condiciones de temperaturas fueron implementadas como estrategia para la preparación del inóculo. En la primera condición el crecimiento se realizó a 30 °C, 180 rpm por 24 h; en la segunda condición, el crecimiento se realizó a 180 rpm a 30 °C por 16 h y expuestas a 10 °C durante 8 h. Una condición de estrés oxidativo fue implementada con la exposición de las células a una concentración de 0.15mM de H_2O_2 durante 2 h después del crecimiento a 30 °C por 22 h. Por último, una condición de estrés ácido fue implementada con el crecimiento de las células a la condición de tolerancia en concentración y tipo de ácido establecida para cada linaje (Anexo F) por 24 h a 30 °C. Las células de las levaduras fueron recuperadas por centrifugación a 6000 x g durante 15 minutos, lavadas dos veces con NaCl (0.85%). Se ajusto el inóculo de la fermentación a 1 g/L de acuerdo

con las curvas de biomasa previamente construidas a partir de la correlación de OD_{600nm} y el peso seco.

Estrategia de fermentación serial en hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar (HHBA)

Una estrategia de fermentación serial fue implementada para la fermentación del hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar sin diluir. De acuerdo con los resultados del ensayo de fermentación HHBA (75%), la mejor condición para la transformación de la D-xilosa fue utilizada para recuperar las células y realizar nuevamente la preparación del inóculo en las mismas condiciones por triplicado, ajustando a 1 g/L la fermentación de acuerdo con las curvas de biomasa previamente construidas para cada levadura.

4.1.3 Métodos Analíticos

El seguimiento de la biomasa fue realizado por la cuantificación del peso seco a partir de la toma de alícuotas de 0.5 mL, seguido de centrifugación y secado en SpeedVac. El sobrenadante de cultivo líquido fue analizado en un equipo de HPLC (Hitachi Elite LaChrom), utilizando una columna Biorad Aminex HPX-87H (300x7.8mm), con volumen de carga 20µL, utilizando H_2SO_4 como fase móvil (5 mmol /L), con un flujo de 0.6 ml/min, temperatura de la columna de 60 °C, y temperatura del detector de índice de refracción en 40°C. El pH final de la fermentación fue determinado en el sobrenadante usando pHmetro calibrado (Thermo Scientific Orion 4Star). Al terminar cada fermentación las levaduras fueron crecidas en placa con medio YM a 30°C durante 24h, para confirmar que el cultivo permanezca axénico.

4.1.4 Métodos estadísticos

Se implemento un diseño experimental completamente al azar para comparar todas las condiciones evaluadas en la estrategia de cultivo para la propagación, implementando como variable respuesta la producción del metabolito (etanol o xilitol). Para cada grupo de datos a analizar fueron evaluados los principios de normalidad y homocedasticidad implementado la prueba de Shapiro–Wilk y la prueba de Levene

respectivamente. Los datos fueron analizados mediante el método paramétrico de Anova one way usando como prueba *post hoc* la prueba de Tukey. La prueba no paramétrica Kruskal-Wallis fue implementando cuando el grupo de datos no atendía el principio de normalidad, pero si el de homocedasticidad como prueba *post hoc* fue implementado la prueba Mann-Whitney con corrección de significancia. Los análisis fueron realizados a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, empleando *software*s como Minitab, OriginLab y paquetes en R studio.

4.2 Resultados y Discusión

4.2.1 Respuesta fenotípica de levaduras productoras de xilitol aisladas en ambientes fermentativos a condiciones de estrés ácido y térmico

Los linajes de las especies *Meyerozyma caribbica* (IBUN-03558) y *Candida tropicalis* (IBUN-03565), mostraron la mayor eficiencia de conversión dentro de los linajes de la misma especie en el ensayo de fermentación de D-xilosa (Tabla 7) y fueron seleccionadas para la descripción de la respuesta fenotípica en la adaptación de estrés cruzado a condiciones de estrés térmico y ácido.

En la evaluación del perfil de fermentación utilizando medio YPX con 50 g/L de D-xilosa, el linaje *M. caribbica* (IBUN-03558) alcanza su producción máxima de xilitol 35.8 g/L a las 96h con un alto rendimiento de 0.76 g/g (Figura 27a). Sin embargo, el rendimiento presenta el mismo valor que en el tiempo de 72 h con una producción de xilitol de 26.8 g/L. No se observó producción de etanol (Anexo G), lo que contrasta con los resultados informados por Sukpipat et al. (2017) en la fermentación de D-xilosa por el linaje de *M. caribbica* 5XY2, que mostró un rendimiento para xilitol de 0.60 g/g y una producción de 20.2 g/L después de un cultivo de 120h, con producción de una pequeña cantidad de etanol. Los resultados obtenidos muestran el alto rendimiento y eficiencia para la transformación de D-xilosa del linaje de *M. caribbica* (IBUN-03558), dirigiendo el catabolismo de las pentosas principalmente hacia la vía metabólica del xilitol.

C. tropicalis (IBUN-03565) cuando no estuvo expuesta a ninguna condición de estrés (Figura 27b), mostró un rendimiento máximo de 0.56 g/g en 72h con una producción de xilitol de 23.0 g/L; después de 96 horas aumentó solo a 24.1 g/L. El-Baz y colaboradores (2011) informaron una concentración de xilitol de 24.42 g/L en 72 h que es un valor muy similar al de este estudio. Como subproductos se obtuvo etanol y glicerol en pequeñas cantidades (Anexo G). La conversión de D-xilosa a etanol puede estar asociado a la restauración del equilibrio redox de los cofactores, donde las reductasas (XR) utilizan preferentemente NADPH como cofactor, mientras que las deshidrogenasas (XDH) prefieren NAD^+ (Barros, et al 2020) lo que permitiría el metabolismo a etanol de una pequeña cantidad de D-xilosa.

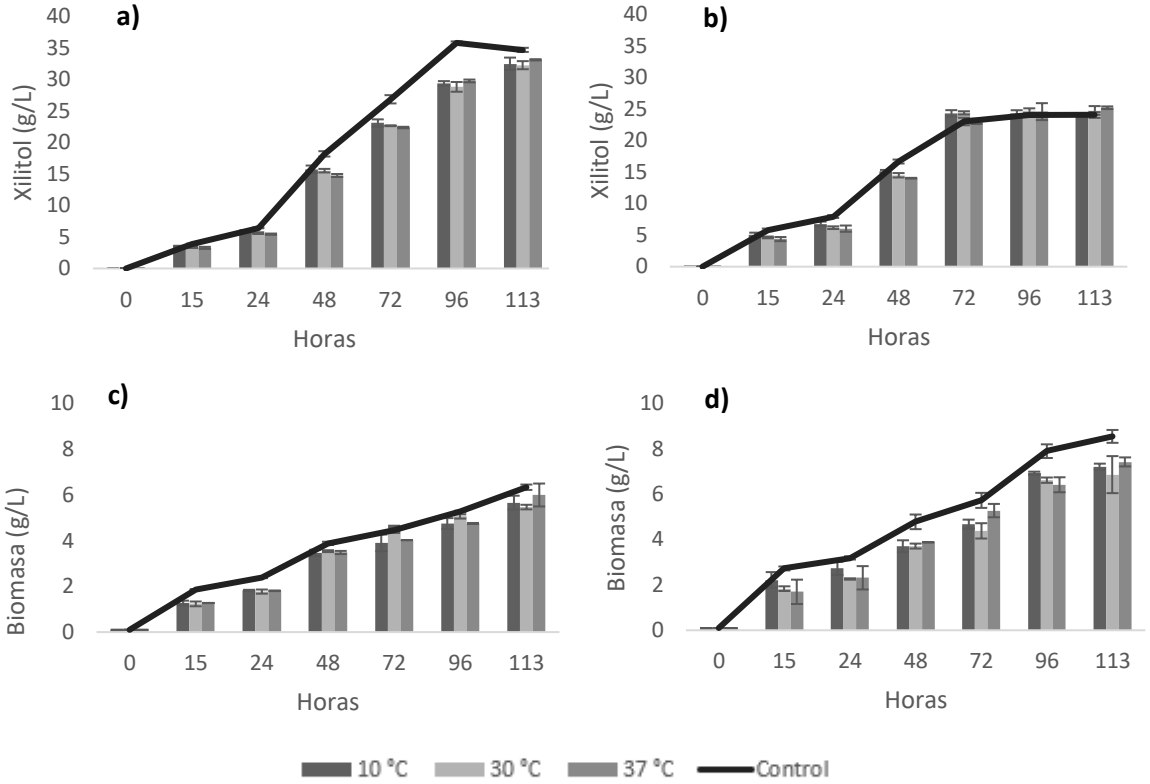


Figura 27. Fermentación discontinua con medio suplementado con D-xilosa (5 %) y ácido acético 2 g/L por *Meyerozyma caribbica* UN113-3 (cepa IBUN-03558) a) producción de xilitol, c) biomasa y *Candida tropicalis* UN116-3 (IBUN-03565) b) producción de xilitol, d) biomasa. Se utilizaron tres condiciones de temperatura para la preparación del inóculo. El Control fue medio sin ácido acético y la condición para la preparación del inóculo fue 30 °C.

La biomasa obtenida de las condiciones control para *M. caribbica* y *C. tropicalis* presentó valores más altos en la tasa de crecimiento específico en las primeras 24h siendo 0.048 h^{-1} y 0.144 h^{-1} respectivamente, luego de este tiempo la tasa de crecimiento disminuyó alcanzando un valor de 0.011 h^{-1} para ambos linajes. Estos valores están inversamente relacionados con la tasa de producción de xilitol, donde la tasa de producción de xilitol es mucho más lenta en las primeras horas de fermentación. Esto evidencia la relación estrecha entre la producción de xilitol con la cantidad de biomasa en el proceso de fermentación, en consecuencia, el xilitol es un producto asociado al crecimiento (Mardawati et al., 2017), el cual presenta una menor producción en el proceso inicial de la duplicación celular. Esto podría estar relacionado con el alto requerimiento de energía de las células para aumentar la población, y en condiciones aeróbicas, el NADH formado en la oxidación del xilitol por XDH puede re-oxidarse en la cadena respiratoria y la fuente de carbono se utiliza para el crecimiento (Converti et al., 2002).

Se ha demostrado que el ácido acético es más tóxico para las levaduras productoras de xilitol que otros compuestos inhibidores asociados con los hidrolizados lignocelulósicos (Bellido et al., 2011; Soares et al., 2021). El efecto de una baja concentración de ácido acético (2 g/L) sobre el comportamiento de *M. caribbica* mostró que en las primeras 24 h no se afecta la producción de xilitol (Figura 27a). Sin embargo, el rendimiento de biomasa varía de 0.29 g/g a 0.27 g/g, disminuyendo en un 14% y no hay diferencia significativa en los tratamientos evaluados para la preparación del inóculo (Figura 27c). Esta disminución en el rendimiento de biomasa se ha descrito en función del aumento en el coeficiente de mantenimiento, definido como la fracción de sustrato desviada del crecimiento para hacer frente al estrés (Quintas et al., 2005). A las 48 h se mantiene la producción de biomasa; sin embargo, la producción de xilitol disminuyo alcanzando el valor máximo de 32.47g/L solo hasta las 113h. En estas mismas condiciones, *C. tropicalis* mantuvo la producción de xilitol (Figura 27b) sin diferencias significativas en el rendimiento de xilitol, que se mantuvo cercano a 0.5 g/g. Sin embargo, el rendimiento de biomasa disminuyó para todas las condiciones de temperatura evaluadas a partir de las 24h (Figura 27d). El mismo patrón de crecimiento se observó para linajes de esta especie, evaluadas en medios con concentraciones de glucosa y ácido acético de 1 g/L (Soares et al., 2021). La afectación en el crecimiento de levaduras expuestas a la presencia de ácido débil se ha asociado con la coactivación de H^+-ATPasa de membrana plasmática y H^+-ATPasa de membrana vacuolar, que acopla la hidrólisis de ATP a la expulsión de protones, generando un desequilibrio entre el consumo y la producción de ATP, además del efecto del pH intracelular bajo sobre las actividades enzimáticas de la vía glucolítica (Ullah et al., 2013; Palma et al., 2018). Chen y colaboradores (2009) también reportaron que el rendimiento de xilitol no se vio afectado para un linaje de *C. tropicalis* cuando el ácido acético estuvo presente en el medio hasta una concentración de 2 g/L, obteniendo un valor de 0.72 g/g y productividad volumétrica de 0.98 g/L.h usando una concentración de D-xilosa superior a la implementada en este estudio.

El aumento de la concentración de ácido acético hasta 6 g/L mostró una disminución en el desempeño de la producción de xilitol en las dos especies evaluadas (Figura 28). *C. tropicalis* en esta condición disminuyó la producción de xilitol en un 20% alcanzando la productividad máxima de 18.50 g/L a las 72h (Figura 28b) en el tratamiento de inóculo a 10°C, y no se evidenció diferencia significativa en

este parámetro para las condiciones de temperatura evaluadas en la respuesta al estrés ácido. Sin embargo, en cuanto al rendimiento de biomasa, el inóculo preparado a 37 °C presentó mayor sensibilidad durante las primeras 24 h, alcanzando valores de 0.20 g/g con respecto al inóculo preparado a 10 °C con un rendimiento de 0.24 g/g, y las células crecidas a 30 °C presentaron el mayor valor 0.26 g/g, lo que representó una disminución en comparación con las células de control del 28%, 16% y 8% respectivamente. Después de 72 h, la producción de biomasa fue similar para todos los tratamientos. Choudhary y colaboradores (2017) también observaron una disminución en la tasa de crecimiento de un linaje de *C. tropicalis*, siendo más sensible al aumento de la temperatura cuando crece en presencia de D-xilosa que en otras fuentes de carbono. Además, contrario a lo informado por los autores, el linaje de C*. tropicalis* evaluada en este estudio sí produjo concentraciones bajas de etanol (2.86 g/L en condiciones control) que se incrementaron en presencia de ácido acético (Tabla 8); esto sugiere que este linaje podría estar utilizando la vía metabólica de acetato a etanol como mecanismo para el equilibrio de cofactores, con la oxidación de NADH (Ndukwe et al., 2020).

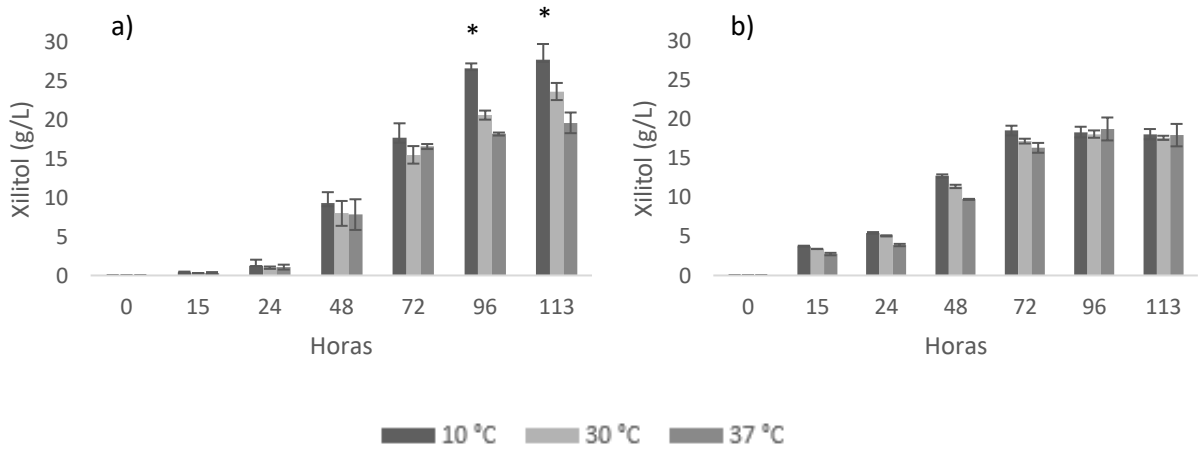


Figura 28. Producción de xilitol a partir de fermentación discontinua con medio suplementado con D-xilosa (5 %) y ácido acético 6 g.L-1 por a) *Meyerozyma caribbica* UN113-3 (IBUN-03558) y, b) *Candida tropicalis* UN116-3 (IBUN-03565). Se utilizaron tres condiciones de temperatura para la preparación del inóculo. Medias con * son significativamente diferentes (p > 0,05)

En contraste, la exposición en la preparación de inóculo a 10°C para la especie *M. caribbica* mejoró significativamente el comportamiento de producción de xilitol (26.67 g/L) en las 96h en relación con los inóculos expuestos a temperaturas más

altas (Figura 28a), aumentando el rendimiento de xilitol en un 21 % en comparación con el inóculo preparado a 30°C. Se han aislado linajes de *M. caribbica* de ambientes de baja temperatura como la Antártica y han mostrado actividad de xilanasa a bajas temperaturas (Martorell et al, 2017), lo que sugiere la capacidad genómica de esta especie para adaptar su metabolismo de pentosas a ambientes fríos. Además, se ha descrito en *S. cerevisiae* que las bajas temperaturas producen un desequilibrio redox de los cofactores $NAD(P)^+$/NAD(P)H (García-Ríos et al., 2016) que se relaciona con la capacidad de acumular xilitol. Es decir, un mecanismo de adaptación al estrés oxidativo provocado por la exposición previa a bajas temperaturas puede estar relacionado con el aumento en el rendimiento de xilitol observado para esta cepa en presencia de altas concentraciones de ácido acético. A pesar del incremento con la exposición previa de las células a baja temperatura, este linaje mostró una disminución del 25% en el rendimiento de xilitol respecto a los resultados obtenidos en el ensayo control (sin exposición a ácido acético).

En alta concentración de ácido acético (6 g/L), la producción de biomasa de *M. caribbica* en las tres condiciones de temperatura evaluadas presentó un comportamiento similar hasta las 48h (Figura 29a), con una fase de Lag de 15 h. Asimismo, se evidenció una disminución en la tasa de consumo de D-xilosa a las 24 h respecto al control para todos los tratamientos utilizados. En la fase de adaptación, las levaduras consumieron D-xilosa de la misma manera que las células que no estuvieron expuestas a ninguna condición de estrés. Sin embargo, la producción de xilitol y biomasa es mucho menor y no se observaron subproductos como glicerol o etanol. Esto sugiere que en esta etapa la célula modifica el metabolismo central del carbono, posiblemente hacia procesos de biosíntesis de moléculas protectoras. El análisis de los metabolitos intracelulares de un linaje de *C. tropicalis* en presencia de inhibidores mostró un aumento en el flujo de xilulosa hacia la vía de las pentosas fosfato, se indujo la producción de 1,3-propanodiol y trehalosa, y se incrementaron los ácidos grasos saturados (Wang et al., 2015). Sin embargo, el análisis del metaboloma realizado por Hasunuma y colaboradores (2011) de una cepa fermentadora de D-xilosa recombinante de *S. cerevisiae* durante las primeras horas de exposición al ácido acético reveló que los metabolitos involucrados en la ruta de las pentosas fosfato no oxidativa se acumularon significativamente. Las células expuestas a 10°C y 30°C alcanzaron valores similares en producción de biomasa a

las células del experimento control a las 96h con menor consumo de D-xilosa, obteniendo un incremento en el rendimiento desde 0.127 g/g a 0.163 g/g. Por otro lado, la tasa de crecimiento de las células expuestas a 37°C disminuyó a las 48 h, obteniendo un valor de 0.0072 h^{-1} en comparación con las células expuestas a 10°C y 30°C con tasas de 0.0134 h^{-1} y 0.0121 h^{-1} respectivamente.

El consumo de ácido acético fue similar en todas las condiciones de preparación del inóculo (Figura 29b), alcanzando un valor máximo de 3.46 g/L a las 113h de fermentación. La tasa de consumo fue mayor en las primeras 48 h. Este proceso de co-utilización de D-xilosa y ácido acético ha sido estudiado como un mecanismo para superar el desequilibrio de cofactores a través de la reducción de acetato, aumentando la producción de etanol (Ndukwe et al., 2020). Sin embargo, los perfiles de fermentación no muestran la producción de etanol en las levaduras que fueron expuestas a 10°C y 30°C, y en el caso de las levaduras expuestas a 37°C las concentraciones son muy bajas (Tabla 8). El acetato es un producto del metabolismo fermentativo de las levaduras, por lo tanto, este compuesto, incluso en concentraciones relativamente altas, puede ser utilizado como fuente regular de carbono al canalizarlo hacia el metabolismo respiratorio (Guaragnella & Bettiga, 2021).

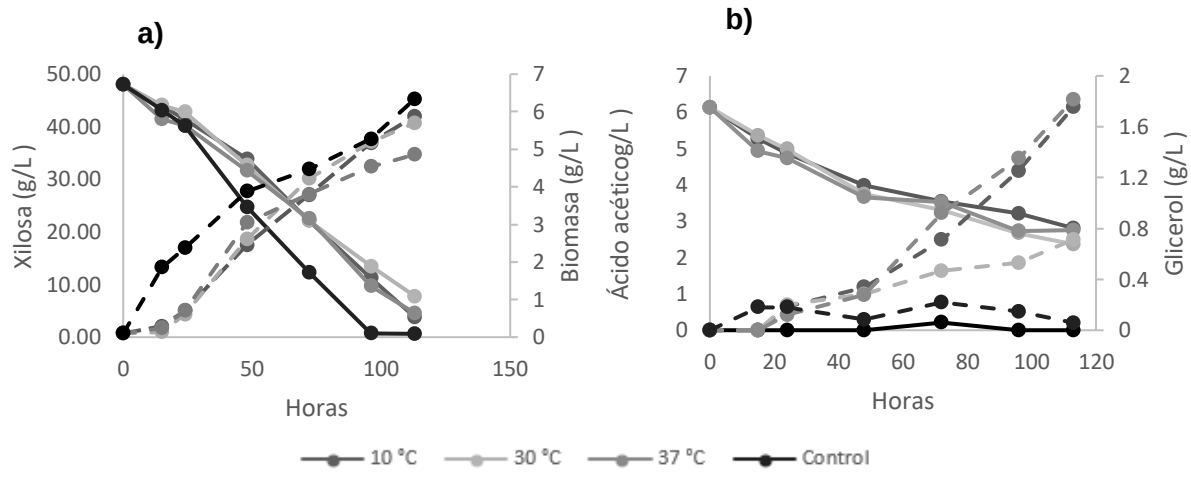


Figura 29. Consumo de D-xilosa y formación de xilitol a partir de la fermentación discontinua con medio suplementado con D-xilosa (5 %) y ácido acético 6 g/L por *Meyerozyma caribbica* (cepa IBUN-03558) **a)** Consumo de D-xilosa (*círculo, línea continua*) y producción de biomasa (*círculo, Linea discontinua*); **b)** Consumo de ácido acético (*círculo, línea continua*) y producción de glicerol (*círculo, línea discontinua*). Se utilizaron tres condiciones de temperatura para la preparación del inóculo. El Control fue medio sin ácido acético y la condición para la preparación del inóculo fue 30 °C.

El glicerol es otro subproducto metabólico que se ha relacionado con el mantenimiento del equilibrio redox, participando en la re-oxidación del exceso de NADH producido durante la biosíntesis (Ndukwe et al., 2020). Este poliol se puede producir como precursor para la síntesis de glicerofosfolípidos, para osmoadaptación, en condiciones de estrés oxidativo, en respuesta a la temperatura y en presencia de ácidos débiles (Zhang et al., 2020a). El perfil de fermentación de *M. caribbica* mostró un aumento en la producción de glicerol cuando el ácido acético estaba presente en el medio, este aumento fue significativamente mayor en las células que fueron expuestas a condiciones de temperatura baja (10 °C) y alta (37 °C) (Figura 29b), alcanzando un 156% más de producción. En la levadura, la capacidad de producir y consumir glicerol está estrechamente regulada por la vía de señalización de glicerol de alta osmolaridad de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK-HOG) (Zhang et al., 2020a). En el estrés por ácido acético, la enzima HOG1p involucrada en esta vía se activa como un mecanismo esencial para la resistencia, controlando la activación de la enzima fosfofructoquinasa-2, lo que conduce a la estimulación del flujo glucolítico y a una mayor producción de glicerol (Mollapour & Piper, 2007). Además, Hog1 media en la expresión mejorada de los genes GPD1 y GPP2 y, por lo tanto, aumenta la capacidad de producir glicerol (Goli et al., 2012). Los resultados de este trabajo muestran protección cruzada con la exposición de las células a temperaturas subóptimas y su subsecuente exposición a estrés ácido, aumentando la acumulación del glicerol lo que probablemente se relaciona con el mecanismo de resistencia por la vía MAPK-HOG. Sin embargo, el aumento en la concentración extracelular de glicerol no estuvo directamente relacionado con el rendimiento de xilitol, ya que las células expuestas a 10°C tuvieron una mayor producción (26.67 g/L) en comparación con las células expuestas a 37°C (18.21 g/L) lo que sugiere la participación de otros mecanismos en la regulación del rendimiento fermentativo.

La comparación del pH final en el proceso de fermentación mostró que las dos especies evaluadas sin exposición a condiciones de estrés incrementan el pH extracelular de 5.5 a 6.5, lo que podría estar asociado a la presencia de un mecanismo simportador protón/azúcar descrito para el transporte de D-xilosa (Estrada-Ávila et al., 2022). Sin embargo, se encontró una relación directa entre el aumento de pH y la concentración de ácido acético en el medio (Figura 30). La toxicidad del ácido acético se ha relacionado con la concentración y variación del pH (intracelular y extracelular),

mediada por las relaciones de equilibrio entre el anión y el protón (pKa= 4.75) (Kitanovic et al., 2012). Esto sugiere que al pH inicial de la fermentación una fracción importante del ácido se encuentra en estado no disociado, el cual puede ingresar a la célula generando acidificación intracelular, proceso que ha sido descrito como la principal causa de inhibición del crecimiento por parte de este ácido (Mira et al., 2010). Sin embargo, con la captación de D-xilosa por este mecanismo, aumenta el pH extracelular, lo que genera una disociación externa del ácido que podría controlar la capacidad amortiguadora del medio, regulando así la entrada de ácido a la célula por simple difusión, esto podría estar influyendo en el cambio observado en la tasa de consumo de ácido después de 48h (Figura 29b). La exposición a ácidos débiles también se ha relacionado con la vía de integridad de la pared celular de levadura (CWI) para modular la arquitectura de la pared celular y reducir su porosidad, lo que disminuye la intrusión de ácido no disociado en la célula (Ndukwee et al., 2020).

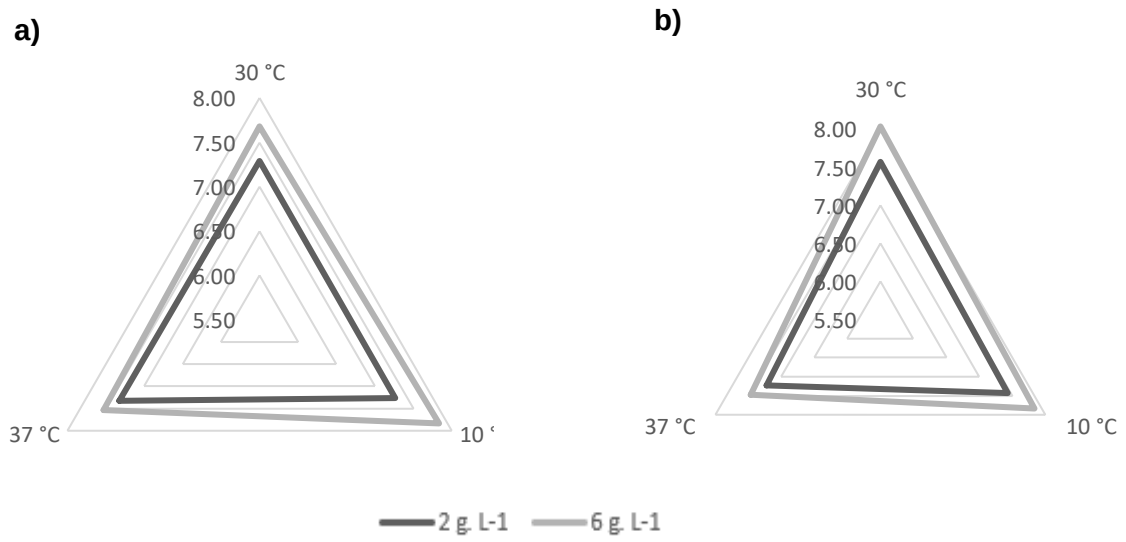


Figura 30. pH final de la fermentación discontinua con medio suplementado con D-xilosa (5%) y ácido acético 2 g/L y 6 g/L por a) *Meyerozyma caribbica* (IBUN-090-03558) y, b) *Candida tropicalis* (IBUN- 090-03565). Se utilizaron tres condiciones de temperatura para la preparación del inóculo.

La capacidad de aumentar el pH extracelular en varias especies de levadura está asociada con la regulación del metabolismo del nitrógeno y ocurre en un entorno de fuente de carbono limitada que requiere aminoácidos exógenos (Vylkova et al., 2011). En las condiciones evaluadas, *C. tropicalis* presentó una capacidad de alcalinización del medio mucho mayor que *M. caribbica* cuando el inóculo se preparó

a 30 °C, lo que puede estar relacionado con la capacidad patogénica de esta especie, donde el metabolismo de los aminoácidos se ha asociado con características de virulencia, como la morfogénesis de las hifas, la formación de biopelículas, la melanización y la formación de cápsulas (Garbe & Vylkova, 2019). Además, utilizando un enfoque de metabolómica, Wang y colaboradores (2015) reportaron en *C. tropicalis* alteraciones en metabolitos relacionados con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y el metabolismo de los aminoácidos, en respuesta al estrés en un medio con presencia de inhibidores como el ácido acético y extracto de levadura como fuente de aminoácidos, lo que confirma la capacidad de modular el metabolismo de aminoácidos y proteínas en condiciones de estrés.

El aumento del pH está asociado con la liberación de amoníaco, donde las células alcalinizantes presentan la inducción de la captación y catabolismo de aminoácidos y la represión de la biosíntesis de aminoácidos (Vylkova et al., 2011). Las células de *M. caribbica* expuestas a 10°C mostraron el mayor aumento de pH en presencia de una concentración de ácido acético de 6g/L (Figura 30a). Estos resultados mostraron el efecto de la baja temperatura sobre la capacidad adquirida de *M. caribbica* para alcalinizar el medio como mecanismo de respuesta a condiciones de estrés ácido, mientras que para *C. tropicalis* no se evidenció el mismo efecto, presentando el pH más alcalino para el inóculo expuesto a 30°C (Figura 30b), contrario a lo que se evidenció con células expuestas a 37°C donde el pH extracelular aumentó en menor medida para las dos concentraciones de ácido evaluadas.

Tabla 8. Rendimiento y productividad para la producción de xilitol a partir de un medio suplementado con D-xilosa (5%) y ácido acético (6 g/L) por levaduras de *C. tropicalis* y *M*. *caribbica* aisladas en ambientes fermentativos (1g/L inóculo).

Especie /Linaje	Inóculo (Temp.)	Tiempo (h)	Consumo Xilosa (g/L)	$Y_{P/S}^{Xyl}$ (g/g)	Q_P^{Xyl} (g/L.h)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
***Meyerozyma caribbica* UN113-3 (IBUN-090-03558)**	10 °C	72	25.87 ± 1.65	0.69	0.25	ND	0.71 ± 0.17
		96	36.77 ± 0.32	0.73	0.28	ND	1.25 ± 0.17
		113	44.23 ± 0.22	0.63	0.25	ND	1.75 ± 0.40
	30 °C	72	25.89 ± 1.42	0.60	0.22	ND	0.47 ± 0.03
		96	34.54 ± 1.64	0.60	0.22	ND	0.53 ± 0.17
		113	40.24 ± 1.27	0.59	0.21	ND	0.71 ± 0.11

Especie /Linaje	Inóculo (Temp.)	Tiempo (h)	Consumo Xilosa (g/L)	$Y_{P/S}^{Xyl}$ (g/g)	Q_P^{Xyl} (g/L.h)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
	37 °C	72	25.48 ± 1.91	0.65	0.23	0.72 ±0.08	0.92 ±0.06
		96	38.31 ± 0.63	0.48	0.19	0.99 ± 0.16	1.35 ± 0.23
		113	43.46 ± 0.58	0.45	0.17	1.05 ± 0.17	1.81 ± 0.21
***Candida tropicalis* UN116-3 (IBUN-090-03565)**	10 °C	72	43.90 ± 0.25	0.42	0.26	4.77 ± 0.29	2.36 ± 0.02
		96	47.52 ±0.01	0.39	0.19	4.07 ± 0.25	2.48 ± 0.06
		113	47.57 ± 0.01	0.38	0.16	2.82 ± 0.20	2.43 ± 0.03
	30 °C	72	41.48 ± 0.14	0.41	0.24	4.87 ± 0.04	2.04 ± 0.01
		96	47.52 ± 0.01	0.38	0.19	4.58 ± 0.14	2.21 ± 0.03
		113	47.51 ± 0.03	0.37	0.16	3.41 ± 0.03	2.16 ± 0.01
	37 °C	72	38.77 ± 0.58	0.42	0.23	4.64 ± 0.34	2.19 ± 0.07
		96	47.13 ± 0.36	0.40	0.19	5.06 ± 0.66	2.49 ± 0.10
		113	47.50 ± 0.01	0.38	0.16	3.93 ± 0.08	2.48 ± 0.13

ND= No detectado

4.2.2 Respuesta fenotípica de levadura productora de xilitol aislada en bosques de robles a condiciones de estrés en hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar

La implementación de una estrategia de cultivo para la preparación del inóculo en condiciones de estrés ácido, oxidativo o térmico en la fermentación de un medio con hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (75% v/v) para la producción de xilitol, fue realizada con la levadura *D. nepalensis* (Qn6.3Xn), seleccionada a partir de los análisis estadísticos multivariados (numeral 3.2.3). La estrategia de pre-exposición a una condición ácida no letal fue seleccionada basada en el análisis fenotípico de las tasas de crecimiento especifico máxima (μ_{max}) en tres diferentes concentraciones de cuatro ácidos orgánicos que evidenció la tolerancia de este linaje a altas concentraciones de ácido acético (100 mM) (Anexo F).

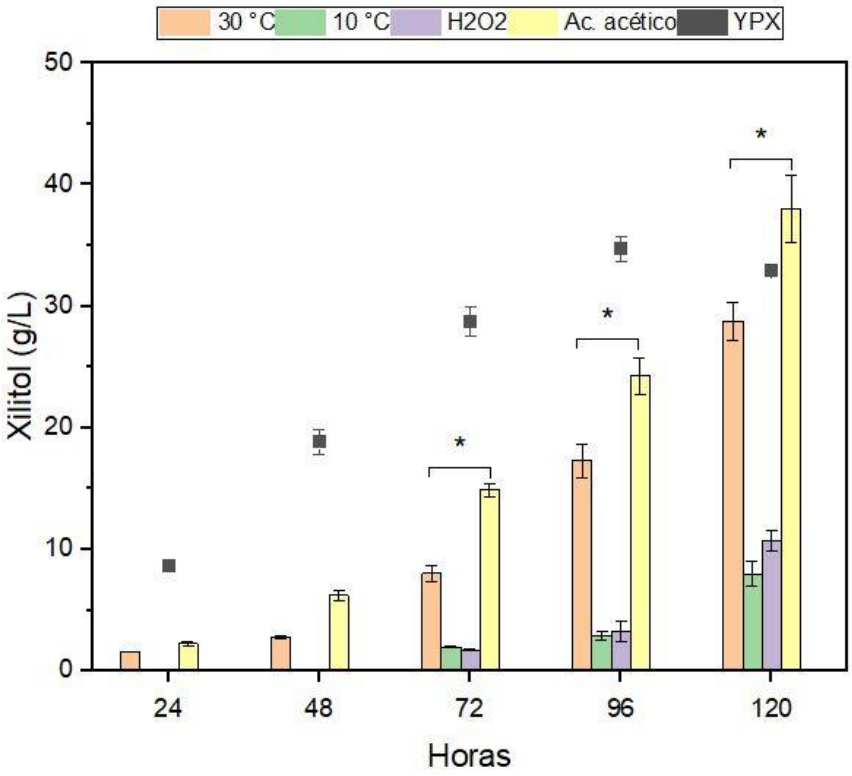


Figura 31. Producción de xilitol por *D. nepalensis* (Qn6.3Xn) a partir de fermentación discontinua en medio con hidrolizado de bagazo de caña de azúcar diluido (75%) suplementado con extracto de levadura y peptona, en cuatro condiciones de preparación de inóculo. El medio YPX fue utilizado como control (Cuadrado negro). Medias con * son significativamente diferentes (test Tukey)

La presencia de hidrolizado disminuyo la velocidad de producción del xilitol (Figura 31) por parte de la levadura, que en medio YPX-5% mostró una producción máxima con valor de 34.7 g/L a las 96h, un valor superior al reportado para *D. hansenii* con producción de xilitol de 28.5 g/L en 108h (Prakash et al., 2011). No obstante, este valor fue superado por *D. nepalensis* (Qn6.3Xn) en la fermentación del hidrolizado hemicelulósico diluido (75%) a las 120h implementando el inóculo expuesto previamente a ácido acético 100 mM, obteniendo un valor de 37.98 g/L a las 120h. La exposición previa a la fermentación implementando condiciones de baja temperatura y peróxido de hidrógeno, evidenció una reducción del metabolismo para la producción de xilitol en comparación con los resultados del inóculo preparado a 30°C. Se ha informado que en estas condiciones de estrés se produce un desequilibrio redox NAD(P)/NAD(P)H que debe ser regulado dinámicamente mediante la relación de cofactores (García-Ríos et al., 2016; Vázquez et al., 2018), lo que puede estar afectando la transformación de la D-xilosa hasta xilitol mediado por la D-xilosa reductasa (XR), enzima que presenta dependencia de cofactor especifico (NADPH),

adicionalmente se ha descrito que este cofactor brinda protección de estabilización térmica para la XR proveniente de un linaje de *D. nepalensis,* reportando una menor actividad a temperaturas bajas y mostrando una temperatura óptima para la actividad enzimática a 55 °C (Malla & Gummadi, 2018). Sin embargo, el linaje evaluado en este trabajo demostró la capacidad de dirigir la mayor parte de la D-xilosa consumida hasta xilitol logrando eficiencias por encima del 78% en las 120h de fermentación en todas las condiciones evaluadas. Asimismo, en *D. nepalensis* (Qn6.3Xn) las bajas temperaturas y la exposición a peróxido de hidrógeno evidenció un fuerte efecto negativo en la capacidad para consumir la D-xilosa, logrando solo el 19% y 9% respectivamente para estas dos condiciones, respecto al 73% de consumo observado para el inóculo que creció a 30°C (Tabla 9) y el 100% cuando no estaba presente el hidrolizado. El peróxido de hidrógeno ha sido señalado como un mensajero en los mecanismos de la muerte celular. Vázquez y colaboradores (2018) evidenciaron después de la exposición a H_2O_2 en levaduras no-convencionales un aumento significativo en la peroxidación lipídica correlacionado positivamente con la acumulación de ROS, provocando una pérdida de la integridad de la membrana. Se ha relacionado el efecto inhibitorio del H_2O_2 en el crecimiento de las levaduras con la supresión de la expresión génica que normalmente promueve el crecimiento de celular, provocando una detención de la fase G2 permitiendo que las células entren en un estado de reposo para evitar que las células entren en fase S, evitando daños en el ADN y desencadenando una señal funcional para proteger las células (Mariani et al., 2008).

El tratamiento de las células en ácido acético 100 mM evidenció un aumento significativo en la producción de xilitol a partir de las 72h de fermentación frente a las demás condiciones evaluadas (Figura 32). Esta misma condición mostró la mayor tasa de consumo de la pentosa (Figura 32a) logrando el 85% en 120h (Tabla 9), la producción de biomasa no presentó periodo de latencia a diferencia de las demás condiciones evaluadas en donde se evidenció una fase lag de 24h, 48h y 72h para los inóculos preparados a 30°C, 10°C y en presencia de H_2O_2, respectivamente (Figura 32b). Se ha descrito el papel que juegan los radicales libres de oxígeno (ROS) y las mitocondrias en la toxicidad que puede generar la presencia de ácido acético, lo que supone la necesidad de activar el sistema antioxidante o ciertas vías de señalización de estrés mitocondrial para contrarrestar estos efectos (Guaragnella &

Bettiga, 2021). En *Debaryomyces hansenii* se evidenció la presencia de oxidorreductasas alternativas (AOX) estimulada por AMP, que constituyen una rama desacoplada de la cadena respiratoria probablemente encargada de prevenir la sobrecarga de sustrato y la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que regula la producción de energía en diferentes condiciones fisiológicas (Cabrera-Orefice et al., 2014).

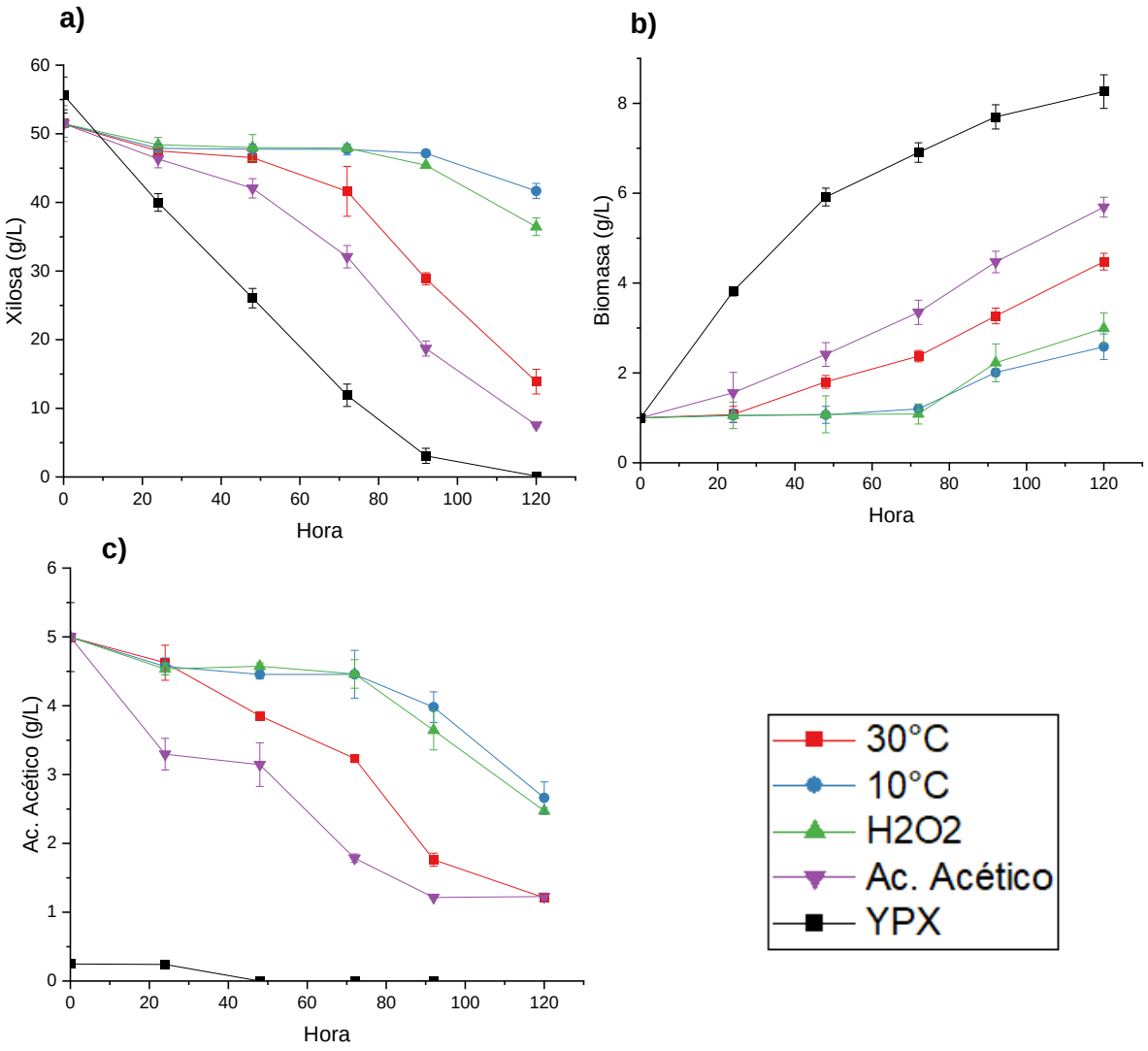


Figura 32. Fermentación discontinua por *D. nepalensis* (Qn6.3Xn) en medio con hidrolizado de bagazo de caña de azúcar diluido (75%) suplementado con extracto de levadura y peptona, **a)** Consumo de D-xilosa; **b)** producción de biomasa; y **c)** consumo de ácido acético, en cuatro condiciones de preparación de inóculo. El medio YPX se usó como control (D-xilosa 5%).

El pre-acondicionamiento de las células en ácido acético probablemente activó estas vías compensatorias, para el secuestro de radicales libres y la estabilización de la cadena respiratoria mejorando el desempeño en la fermentación del hidrolizado,

aumentando el rendimiento en un 12% y 46% en 96h y 120h, respectivamente comparado con el desempeño en medio YPX-5%. Estos mecanismos de regulación de la cadena de transporte de electrones y el equilibrio redox, desencadenados por el bloqueo de otras rutas principales como el cambio reportado por Guaragnella y Bettiga (2021) de la vía glucolítica principal a la vía de las pentosas fosfato en respuesta al estrés por ácido acético, podrían explicar la capacidad de las células expuestas a este ácido orgánico en la preparación del inóculo, de disminuir la producción de biomasa en un 31% respecto a la producción de biomasa en ausencia de hidrolizado, favoreciendo la dirección de la D-xilosa para la acumulación de xilitol, característica también evidenciada en el linaje *Candida tropicalis* (IBUN-03565). La expresión o actividad de los componentes respiratorios alternativos se han asociado como mecanismos de adaptación al estrés por frío, el estrés oxidativo, las condiciones anaeróbicas, el cambio en la fuente de alimento o la temperatura. En estas cadenas respiratorias ramificadas también se han reportado enzimas alternativas como NADH deshidrogenasas (Juárez et al., 2004) y glicerol-fosfato deshidrogenasa que se encuentran en la cara externa de la membrana mitocondrial interna, carecen de actividad de bomba de protones y constituyen un importante sumidero mitocondrial de equivalentes redox (Cabrera-Orefice et al., 2014). Para las levaduras expuestas a la estrategia de cultivo en diferentes condiciones de estrés, se realizó el análisis de coeficiente de aptitud relativa (*s*) (Reyes et al., 2012) de acuerdo con la ecuación (3)

$$s = \frac{\mu max\ adaptado\ (HHBA\ 75\%)}{\mu max\ parental\ (HHBA\ 75\%)} - 1 \qquad \text{(Ecuación 3)}$$

El coeficiente de aptitud relativa (s) para *D. nepalensis* (Qn6.3Xn) fue positivo solo para las células expuestas a ácido acético alcanzando un valor de 0.40 lo que evidencia un aumento del 40% en la tolerancia a las condiciones del hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar, respecto a las células sin tratar.

Las levaduras expuestas a bajas temperaturas y a peróxido de hidrógeno disminuyeron la capacidad de consumir la D-xilosa en contraste con el consumo de ácido acético que aumentó después de las 72h (Figura 32c). Los mayores consumos de ácido acético fueron evidenciados en las fermentaciones realizadas con inóculos expuestos a 30°C y a ácido acético logrando el 76% para las dos condiciones (Tabla 9). Este consumo podría explicarse por la activación de las vías anapleróticas y el ciclo del glioxilato, para producir precursores de los intermediarios del ciclo del ciclo

del ácido tricarboxílico (TCA, del inglés *tricarboxylic acid*) a partir del acetato, como mecanismo de adaptación para mantener el nivel energético y producir intermediarios metabólicos (Eleutherio et al., 2018).

Tabla 9. Parámetros de fermentación para la producción de xilitol por *D. nepalensis* (Qn6.3Xn) en medio con hidrolizado de bagazo de caña de azúcar diluido (75%) suplementado con extracto de levadura y peptona. El medio YPX-5% se usó como control.

Tratamiento inóculo	Tiempo (h)	Consumo D-xilosa (%)	Consumo Ac. acético (%)	Xilitol (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/L.h)	η (%)
30°C	72	19	35	8.04±0.66	0.81	0.11	89
	96	44	65	17.32±1.39	0.77	0.18	84
	120	73	76	28.78±1.56	0.77	0.24	83
10°C	72	7	11	1.98±0.04	0.53	0.03	57
	96	8	20	2.94±0.36	0.68	0.03	74
	120	19	47	8.01±1.02	0.82	0.07	89
H_2O_2 (0.15mM)	72	6	11	1.75±0.06	0.49	0.02	54
	96	7	27	3.27±0.79	0.54	0.03	59
	120	9	51	10.75±0.84	0.72	0.09	78
Ácido acético (100mM)	72	38	64	14.89±0.54	0.77	0.21	84
	96	64	75	24.27±1.49	0.74	0.25	81
	120	85	76	37.98±2.74	0.86	0.32	94
YPX (Condición control)							
30°C	72	79	100	28.74±1.26	0.66	0.40	72
	96	94	100	34.70±1.08	0.66	0.36	72
	120	100	100	32.88±0.40	0.59	0.27	65

El pH final de la fermentación del hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (75%) evidenció que los tratamientos en la preparación del inóculo a 30°C, 10°C y H_2O_2 el pH se mantiene próximo a 7.0 (Figura 33), resultados similares

fueron observados en el experimento de tolerancia con hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (50%) (numeral 3.2.2). En contraste, las células expuestas previamente a ácido acético presentaron un aumento en la capacidad de alcalinización lo que se correlacionó con un mejor desempeño fermentativo (Tabla 9). Este aumento de pH en medio con D-xilosa por parte de las levaduras ha sido relacionado con un sistema de transporte simportador de protones/azúcar, que también ha sido informado en especies del mismo género como *D. fabryi* y *D. hansenii* (Ferreira et al., 2013). Así como mecanismos proteolíticos para hacer frente al estrés implementando las vías metabólicas del nitrógeno (Guaragnella & Bettiga, 2021).

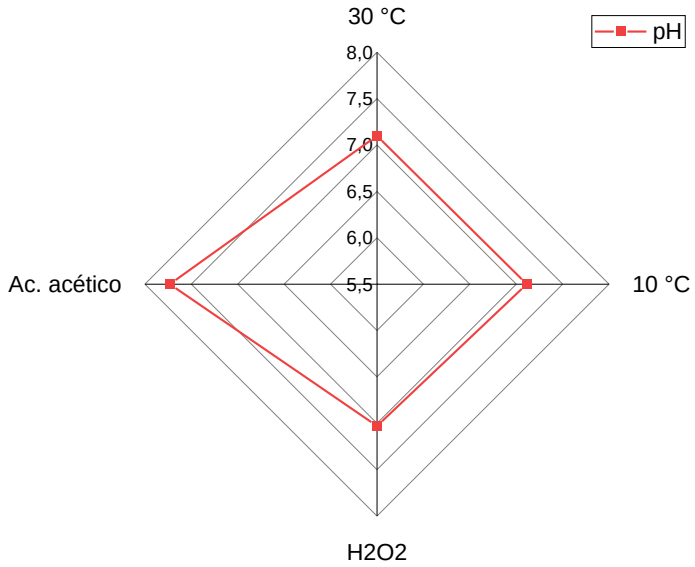


Figura 33. pH final de la fermentación de D-xilosa por *D. nepalensis* (Qn6.3Xn) en medio con hidrolizado de bagazo de caña de azúcar diluido (75%) suplementado con extracto de levadura y peptona, en cuatro condiciones de preparación de inóculo.

La fermentación serial se realizó con las células recuperadas de la fermentación en hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (75%) y tratadas previamente con ácido acético (100 mM). En la fermentación del hidrolizado sin diluir *D. nepalensis* (Qn6.3Xn) evidenció mayor tolerancia a las condiciones de estrés aumentando la producción de biomasa en un 24 % (Figura 34a) y mostrando un consumo de D-xilosa del 94% (Figura 34b). Sin embargo, la producción de xilitol disminuyo un 13% alcanzando un valor de 33.01 g/L a las 120h de fermentación, con un rendimiento de 0.72 g/g y una productividad de 0.28 g/L.h. Después de la implementación de la estrategia de cultivo las células evidenciaron un

menor consumo de ácido acético mostrando un alto remanente del ácido orgánico y solo el 29% del consumo durante todo el tiempo de fermentación. El aumento de la producción también fue observado en esta condición en correlación con el consumo de glucosa presente en el medio durante las primeras 24h de fermentación (Figura34b). La producción de glicerol no fue observada en las condiciones evaluadas.

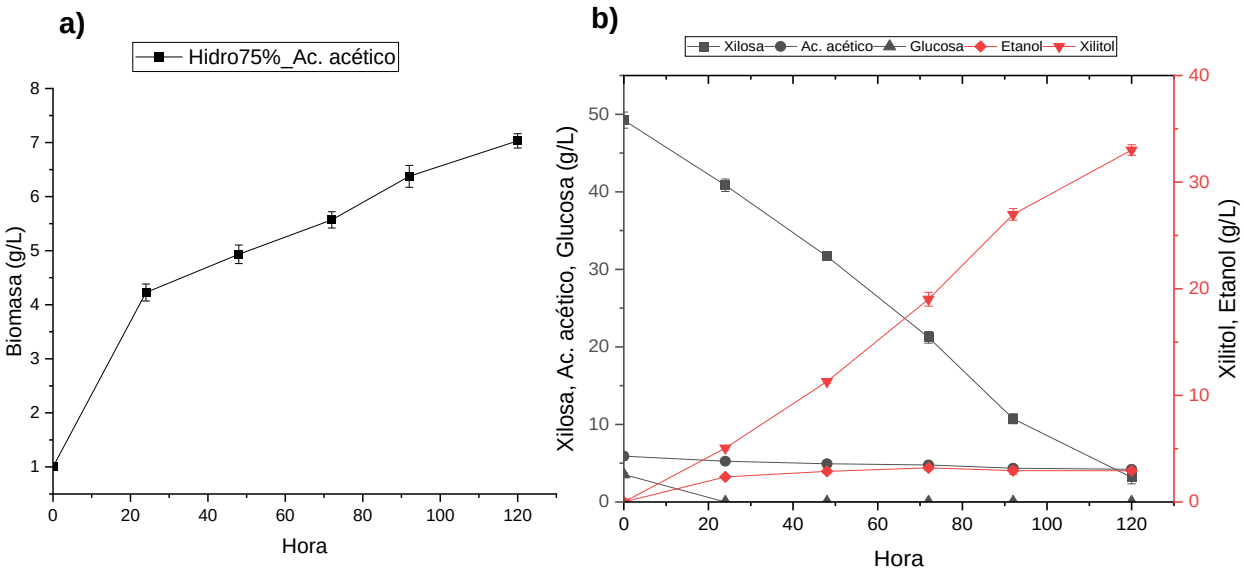


Figura 34. Fermentación serial por *D. nepalensis* (Qn6.3Xn) en medio con hidrolizado de bagazo de caña de azúcar suplementado con extracto de levadura y peptona, **a)** producción de biomasa; y **b)** consumo de D-xilosa, glucosa, ácido acético y producción de xilitol y etanol.

4.2.3 Respuesta fenotípica de levadura productora de etanol aislada en bosques de robles a condiciones de estrés en hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar

La implementación de una estrategia de cultivo para la preparación del inóculo en condiciones de estrés ácido, oxidativo o térmico en la fermentación de un medio con hidrolizado de bagazo de caña de azúcar diluido (75%) para la producción de etanol, fue realizada con la levadura *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X), seleccionada a partir de los análisis estadísticos multivariados (numeral 3.2.3). La estrategia de preexposición a una condición ácida no letal fue seleccionada basada en el análisis fenotípico de las tasas de crecimiento especifico (μ_{max}) en tres diferentes concentraciones de cuatro ácidos orgánicos, que evidenció la tolerancia de este linaje a altas concentraciones de ácido tartárico (100 mM) (Anexo F).

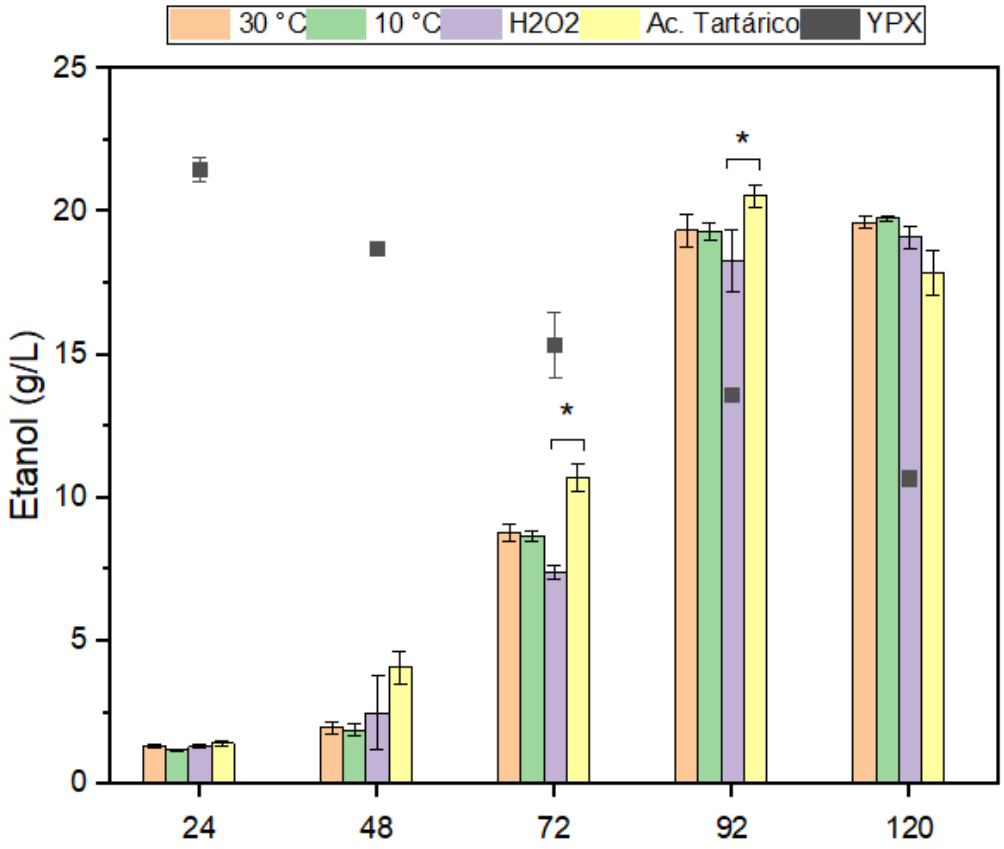


Figura 35. Producción de etanol por *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X) a partir de fermentación discontinua en medio con hidrolizado de bagazo de caña de azúcar diluido (75%) suplementado con extracto de levadura y peptona, en cuatro condiciones de preparación de inóculo. El medio YPX fue utilizado como control (Cuadrado negro). Medias con * son significativamente diferentes (test Tukey)

En todas las condiciones evaluadas se evidenció un fuerte efecto negativo en la tasa de producción de etanol (Figura 35) y consumo de D-xilosa (Figura 36a) cuando se realizó la fermentación en el hidrolizado hemicelulósico diluido (75%), prolongando el tiempo de fermentación. La exposición a bajas temperaturas no evidenció una modificación en su desempeño respecto a lo observado a las células crecidas a 30°C, lo que sugiere la capacidad de este linaje para tolerar temperaturas subóptimas. Esta capacidad de adaptación ha sido asociada en *S. cerevisiae* a cambios en la expresión de proteínas, que a temperaturas bajas sugiere una mayor remodelación del proteoma, relacionándose con el direccionamiento del carbono hacia la vía de las pentosas fosfato como parte del sistema de defensa antioxidante mediado por la producción de NADPH, una fuerte represión de las proteínas relacionadas con la traducción, así como la inducción del metabolismo de los aminoácidos, la síntesis de arginina, aminoácido que presenta actividad crioprotectora, además de los componentes involucrados en el plegamiento y la degradación de las proteínas (Pinheiro et al., 2020) . Aunque se ha descrito en la adaptación de levaduras a temperaturas bajas como en la industria del vino y la cerveza, que el crecimiento de la levadura se ralentiza y su actividad metabólica disminuye (Liszkowska & Berlowska, 2021), estas características no fueron observadas en las condiciones evaluadas, cuando se comparó con el desempeño fermentativo a 30°C, para los cuales se obtuvieron perfiles similares. Santos y colaboradores (2016) reportaron en una fermentación discontinua secuencial con *Sc. stipitis* que un cambio de temperatura gradual decreciente aumento el consumo de D-xilosa en presencia de glucosa, en consecuencia, se obtuvieron valores más altos en el rendimiento y productividad de etanol.

A partir de las 72h y hasta las 92h las células expuestas previamente a ácido tartárico (100mM) evidenciaron diferencia significativa solo respecto al inóculo preparado con exposición a H_2O_2, después de este tiempo y con el agotamiento de la D-xilosa se evidenció proceso de respiración del etanol producido (Figura 35). La mayoría de las levaduras carecen de la capacidad bioquímica para el metabolismo del ácido tartárico (Gao et al., 1995), se ha reportado esta característica metabólica solo para algunos ascomicetos *Sugiyamaella chiloensis* (antes *Candida bertae*), *Sugiyamaella paludigena* (antes *Candida paludigena)*, *Sugiyamaella smithiae* (antes *Stephanoascus smithiae*) y *Candida tartarivorans* (clado *Groenewaldozyma*)

(Fonseca et al., 2000). Sin embargo, el efecto de este ácido orgánico en un linaje industrial de *S. cerevisiae* en la fermentación de glucosa y fructosa evidenció un aumento en la tasa de fermentación cuando el ácido estaba presente en el medio de fermentación en una concentración de hasta 10 g/L (Torija et al., 2003). La exposición previa de las células a este ácido dicarboxílico en este estudio también evidenció para este linaje una mayor productividad volumétrica en las condiciones de fermentación a las 92h (tabla 9).

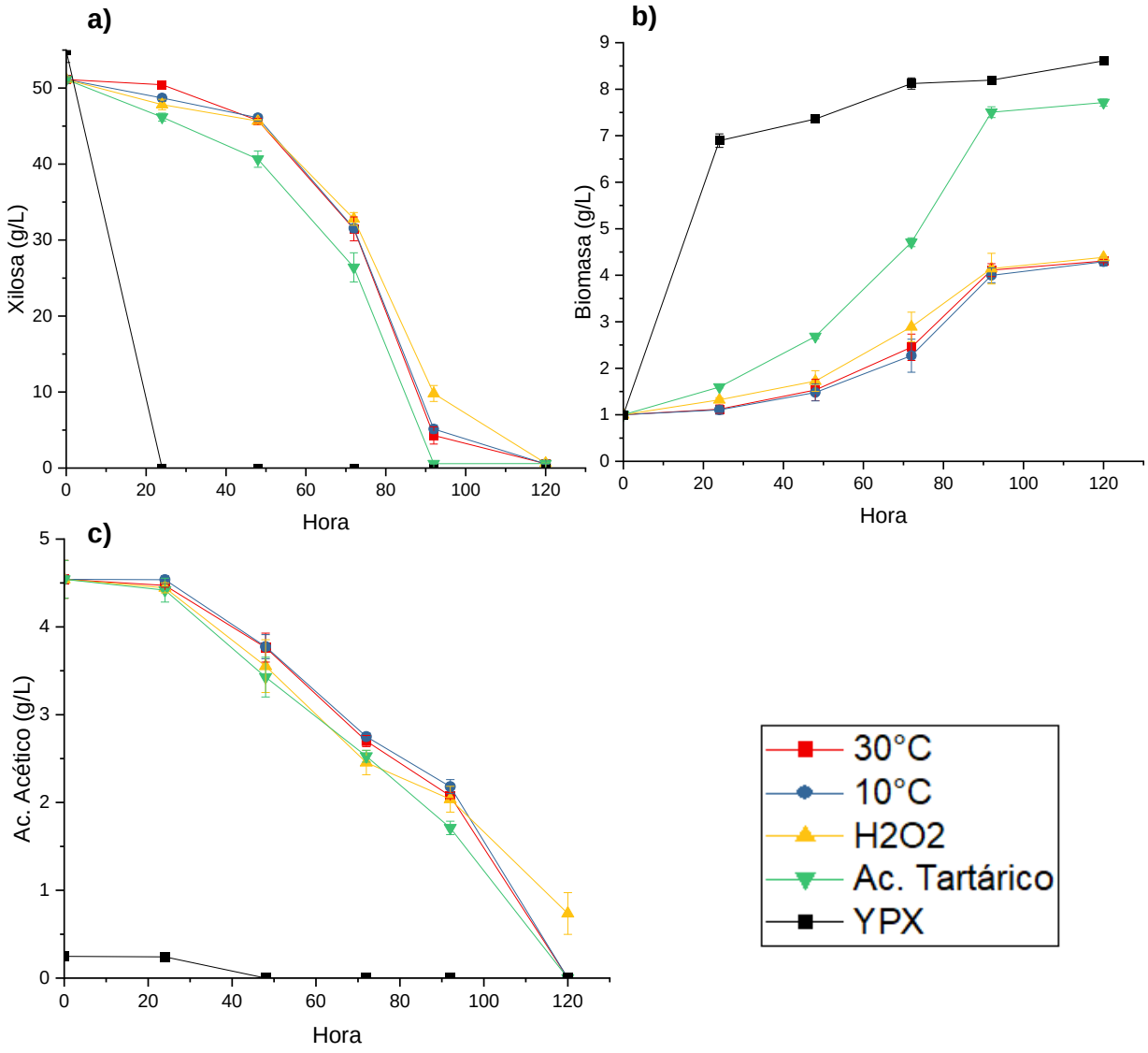


Figura 36. Fermentación discontinua por *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X) en medio con hidrolizado de bagazo de caña de azúcar diluido (75%) suplementado con extracto de levadura y peptona, **a)** Consumo de D-xilosa; **b)** producción de biomasa; y **c)** consumo de ácido acético, en cuatro condiciones de preparación de inóculo.

La tasa de consumo de D-xilosa fue más lenta durante las primeras 48h para las condiciones de 10°, 30° y H_2O_2 (Figura 36a), periodo en el que también se evidencia una fase de adaptación con un 79% de disminución en la producción de biomasa (Figura 36b) respecto a la condición sin hidrolizado (medio YPX). Exclusivamente el tratamiento de las células con ácido tartárico evidenció una mayor capacidad para producir biomasa a partir de las 24h logrando un 87% de la biomasa producida en la condición control a las 92h de fermentación (Figura 36b). El coeficiente de aptitud relativa (*s*) para *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X) fue positivo solo para las células expuestas a ácido tartárico, alcanzando un valor de 0.24 lo que evidencia un aumento del 24% en la tolerancia a las condiciones del hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar, respecto a las células sin tratar. El mecanismo de acción del ácido tartárico en el desempeño de las levaduras aún no es claro, se conoce la capacidad de este ácido de ingresar a la célula y la acumulación intracelular durante la fermentación en relación con pH altos, donde la forma predominante es la disociada, sugiriendo una regulación para el transporte de este ácido (Torija et al., 2003). Aunque se han descrito transportadores de ácidos dicarboxílicos en levaduras *Wickerhamomyces anomalus* (antes *Hansenula anómala*), *Kluyveromyces marxianus* y *Kluyveromyces lactis*, no se ha informado el transporte de este ácido por estos sistemas (Côrte-Real & Leao, 1990; Queirós et al., 1998; Lodi et al., 2004), lo que podría indicar un transporte por difusión. Se ha descrito la importante capacidad amortiguadora del ácido tartárico (Torija et al., 2003) lo que probablemente podría estar funcionando en el medio intracelular como mecanismo de protección frente al estrés ácido generado por los compuestos inhibidores del hidrolizado hemicelulósico como el ácido acético, así mismo los ácidos dicarboxílicos tienen un papel metabólico adicional como precursores gluconeogénicos (Lodi et al., 2004).

El consumo de ácido acético fue mayor después de las 24h (Figura 36c), siendo eficientemente consumido hasta las 120h por las levaduras expuestas a los tratamientos a 10°C, 30°C y ácido tartárico (100mM) (Tabla 10). Se ha informado previamente para *Sc. stipitis* el consumo de ácido acético como sustrato a concentraciones que no inhiben el crecimiento celular con un pH inicial entre 6.0 y 6.5 (Biswas et al., 2013), pudiendo actuar en el equilibrio NADH/NAD^+. Se conoce que el equilibrio de cofactores regula la acumulación de xilitol, para la especie del mismo

género productora de etanol *Sc. stipitis* se han descrito dos mecanismos para minimizar esta producción, el primero es la capacidad de la enzima XR de utilizar los dos factores (NADH, NADPH), el segundo es la vía del ácido salicilhidroxámico (SHAM) que proporciona un sumidero redox para hacer frente al desequilibrio del cofactor (Agbogbo, & Coward-Kelly, 2008). En la fermentación del hidrolizado hemicelulósico diluido (75%) con inóculos expuestos a 10°C y 30°C no se evidenció la formación de xilitol durante toda la fermentación, mostrando datos similares a los de la fermentación en la condición control. No obstante, la exposición a condiciones subletales de estrés ácido y oxidativo promovió la producción de bajas concentraciones de este metabolito partir de las 92h y 72h para los inóculos expuestos a H_2O_2 y ácido tartárico, respectivamente, disminuyendo la eficiencia de conversión de la D-xilosa, parámetro en el que se obtuvieron valores superiores a los obtenidos en la fermentación del medio sin presencia del hidrolizado.

Tabla 10. Parámetros de fermentación para la producción de etanol por *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X) en medio con hidrolizado de bagazo de caña de azúcar diluido (75%) suplementado con extracto de levadura y peptona.

Tratamiento inóculo	Tiempo (h)	Consumo D-xilosa (%)	Consumo Ac. acético *(%)*	Etanol (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)[§]	Q_P (g/L.h)	η *(%)*
30°C	72	38	17	8.79±0.31	0.39	0.12	76
	92	92	41	19.34±0.56	0.39	0.21	76
	120	99	54	19.64±0.19	0.37	0.16	72
10°C	72	38	17	8.68±0.04	0.38	0.12	75
	92	90	39	19.30±0.36	0.39	0.21	77
	120	99	52	19.77±1.02	0.37	0.16	72
H_2O_2 (0.15mM)	72	36	22	7.40±0.24	0.35	0.10	69
	92	81	46	18.28±0.79	0.39	0.20	77
	120	99	55	19.10±0.84	0.36	0.16	71
Ácido tartárico (100mM)	72	48	25	10.72±0.54	0.40	0.15	78
	92	99	44	20.55±0.40	0.38	0.22	75
	120	100	62	17.85±0.78	0.33	0.15	64

Tratamiento inóculo	Tiempo (h)	Consumo D-xilosa (%)	Consumo Ac. acético *(%)*	Etanol (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)§	Q_P (g/L.h)	η *(%)*
YPX (Condición control)							
30°C	24	100	100	21.47±0.44	0.39	0.89	77
	48	100	100	18.70±0.09	0.34	0.39	67
	72	100	100	15.32±1.15	0.28	0.21	55

§ El rendimiento en el hidrolizado fue calculado a partir de azúcares totales consumidos (xilosa y glucosa)

El pH final de la fermentación del hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (75%) para todas las condiciones del tratamiento en la preparación del inóculo fue cercano a 8.0 (Figura 37), siendo ligeramente mayor en las células expuestas al ácido orgánico. Esto evidencia una relación con el perfil del consumo de D-xilosa lo que sugiere probablemente el funcionamiento de un sistema de cotransporte (H^+/azúcar) en esta especie, otros ensayos experimentales deben ser realizados para confirmar estos planteamientos. La capacidad de consumir el ácido acético también contribuye a elevar el pH del medio al disminuir su concentración extracelular (da Silva et al., 2022). Proteínas identificadas previamente en *Sc. stipitis* relacionadas con mecanismos de defensa en el ambiente tóxico del hidrolizado hemicelulósico han permitido asociar sistemas de desintoxicación, que incluyen Acetil-CoA hidrolasa, enzima que actúa en la mitocondria de la célula y su función está relacionada con el control de los niveles de acetil-coenzima A (acetil-CoA), conservando la energía a través de la regulación del acetato mitocondrial (Biazi et al., 2022).

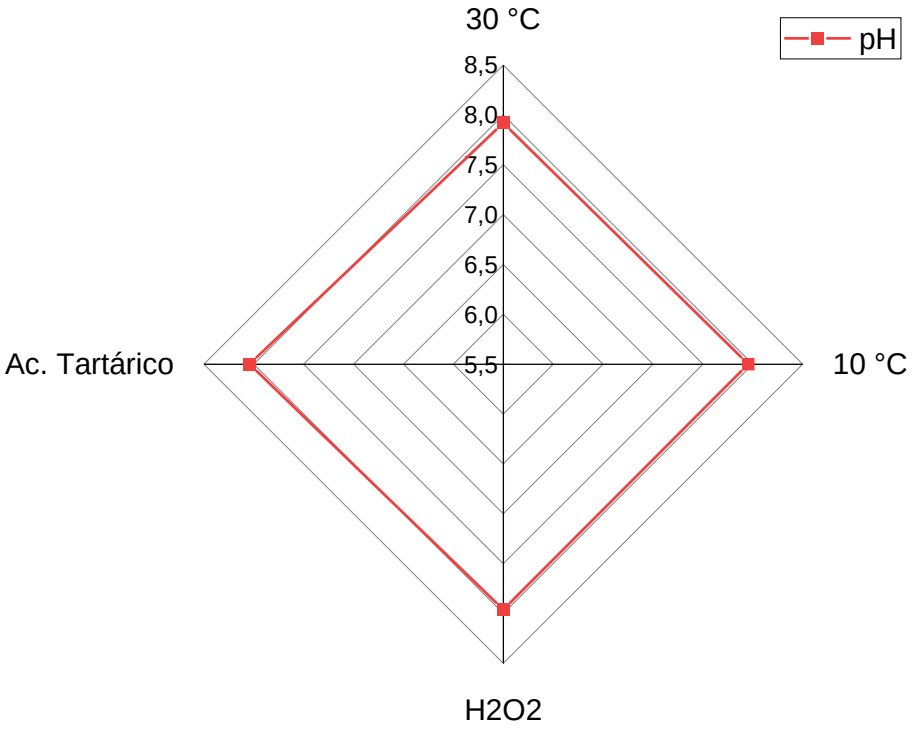


Figura 37. pH final de la fermentación de D-xilosa por *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X) en medio con hidrolizado de bagazo de caña de azúcar diluido (75%) suplementado con extracto de levadura y peptona, en cuatro condiciones de preparación de inóculo.

La fermentación serial en hidrolizado de bagazo de caña de azúcar fue realizado con el reciclaje de células de los inóculos expuestos a 30°C y ácido tartárico, que no evidenciaron diferencia significativa en el ensayo en la fermentación con el hidrolizado hemicelulósico diluido (75%). La producción de biomasa evidenció una fase de adaptación de 24h para las células expuestas a ácido tartárico, comportamiento que fue similar al de la fermentación en el hidrolizado hemicelulósico diluido (75%). Sin embargo, el valor alcanzado al final de la fermentación en estas condiciones fue menor en un 42% (Figura 38a). En contraste las células provenientes del inóculo tratado a 30°C evidenciaron un leve crecimiento hasta las 48h, por lo tanto, la composición del hidrolizado hemicelulósico (concentración de D-xilosa y ácido acético) no cambió considerablemente con el tiempo (no se muestran los datos). Durante la fermentación con inóculo expuesto a 30°C solo se consumieron pequeñas cantidades de D-xilosa y toda la glucosa presente en el medio, especialmente en las primeras 24h. Por estas razones, no se determinaron los parámetros fermentativos para esta condición.

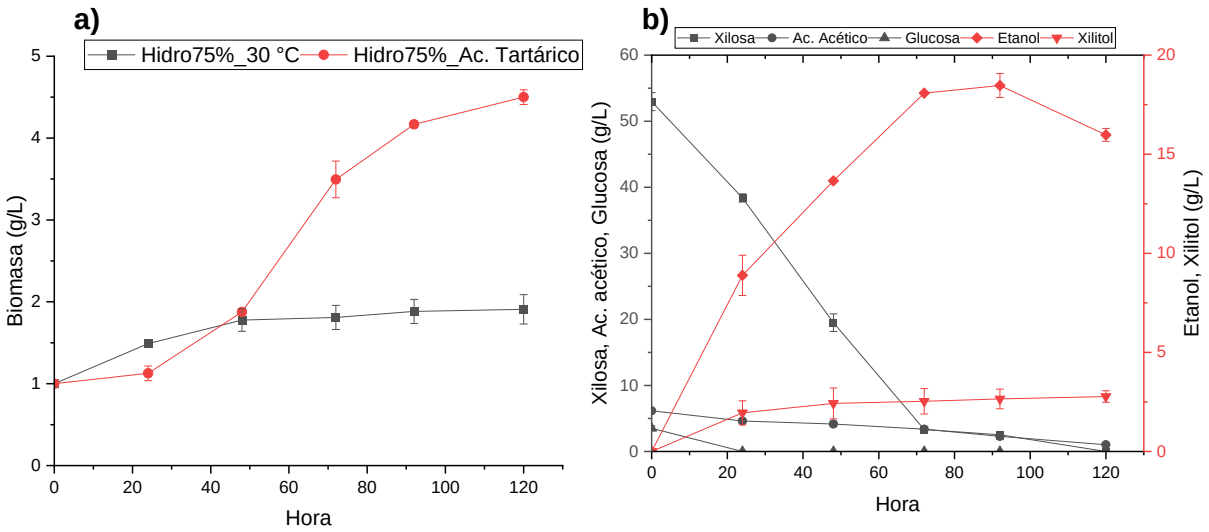


Figura 38. Fermentación serial por *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X) en medio con hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar suplementado con extracto de levadura y peptona, **a)** producción de biomasa; y **b)** consumo de D-xilosa, glucosa, ácido acético y producción de xilitol y etanol de las células expuestas a ácido tartárico provenientes de la fermentación de hidrolizado hemicelulósico diluido (75%).

La fermentación de la D-xilosa proveniente de la fracción hemicelulósica del bagazo de caña de azúcar presenta grandes desafíos de tolerancia y adaptación para las levaduras con el fin de alcanzar alta eficiencia en la transformación de la pentosa. La estrategia cultivo y la fermentación serial realizada con el linaje *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X) evidencia una tolerancia adquirida a las condiciones tóxicas del hidrolizado hemicelulósico, logrando un aumento en la velocidad de consumo de la D-xilosa con un valor de 94% a las 72h (Figura 38b), lo que significa 2 veces el valor consumido en la fermentación con hidrolizado hemicelulósico diluido (75%) para ese mismo tiempo. El arreglo proteómico en la fermentación de hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar por el linaje tipo de *Sc. stipitis* evidenció la expresión de proteínas que proveen protección a la célula frente a los daños causados por la liberación de compuestos ROS, acidificación intracelular, integridad de la membrana entre los que se describieron las enzimas citocromo c oxidasa; tiorredoxina y tiorredoxina reductasa; Cu/Zn-superóxido dismutasa; Mn-superóxido dismutasa; malato deshidrogenasa; proteína de choque térmico 70 y la Acetil-CoA hidrolasa (Biazi et al., 2022).

La producción de etanol a partir de D-xilosa por parte de levaduras no-convencionales que utilizan la vía metabólica de oxidorreducción (XR/XDH) requiere

un paso crítico que es la conversión de la pentosa a D-xilulosa, siendo descrita una mayor eficiencia en condiciones limitadas de oxígeno donde se favorece el metabolismo fermentativo sobre el metabolismo aerobio (Ochoa-Chacón et al., 2021). Sin embargo, en las condiciones aerobias utilizadas en este estudio y con la implementación de la estrategia de cultivo el linaje *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X) alcanzo un rendimiento de 0.34 g/g a las 72h, un valor menor que en la fermentación con hidrolizado hemicelulósico diluido (75%) pero una mayor productividad con valor de 0.25 g/L.h en el mismo tiempo de fermentación. da Silva y colaboradores (2022) reportaron diferencia significativa en el aumento de la actividad enzimática de los extractos celulares de *Sc. stipitis* al aumentar el número de lotes de un proceso de fermentación secuencial en medio sintético, en las enzimas D-xilosa reductasa (XR), xilitol deshidrogenasa (XDH), alcohol deshidrogenasa (ADH) y aldo-ceto reductasa (AKR), con un incremento de 32.6%, 16%, 39% y 73%, respectivamente. El decrecimiento en la eficiencia de la fermentación de la D-xilosa logrando un 67% en 72h es atribuible a la producción de coproductos como el xilitol que alcanzo un valor de 2.77 g/L a las 120h. Los valores de rendimiento y productividad, reportados por primera vez para esta especie en la fermentación de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar son cercanos a los descritos para *Sc. shehatae*, una especie filogenéticamente próxima, con valores de rendimiento 0.436 g/g y productividad de 0.241 g/L.h para un linaje que fue 85% más eficiente que un linaje de *Sc. stipitis* cuando fueron expuestas a un proceso de fermentación en lotes repetidos (da Silva et al., 2022). El pH final de la fermentación del hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar fue de 8.06 un valor similar al obtenido en la fermentación del hidrolizado diluido (75%).

4.3 Conclusiones

El diseño de estrategias de cultivo basado en la adaptación adquirida por la protección cruzada al estrés puede ser exitoso para el acondicionamiento de las células. La levadura de ambiente fermentativo *M. caribbica* mostró la capacidad de modificar su respuesta fenotípica al estrés por altas concentraciones de ácido acético cuando se expuso previamente a baja temperatura, mostrando mayor producción de glicerol como un mecanismo de protección. Aunque, *C. tropicalis* no evidenció adaptación adquirida en ninguna de las condiciones evaluadas, demostró una menor sensibilidad a los efectos de la presencia del ácido acético.

La bioprospección de especies de levaduras no-convencionales evidenció nuevas oportunidades para explorar la biodiversidad y aplicar estrategias de cultivo que evidencian la modificación y la reorganización metabólica para generar distintas respuestas fenotípicas con características industrialmente relevantes. *D. nepalensis* presentó capacidad natural para crecer en altas concentraciones de ácido acético y *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* presentó resistencia natural al ácido tartárico; sin embargo, los desempeños fueron disminuidos en presencia de HHBA.

La regulación del metabolismo de etanol presentó mayor inhibición al aumentar en un 300% el tiempo para lograr la producción máxima de etanol, sin alcanzar los valores obtenidos en la condición control (sin presencia de HHBA). En contraste, la acumulación de xilitol presentó mayor capacidad de tolerancia con tan solo una disminución de 25% en el tiempo de producción máxima de xilitol logrando un aumento en la concentración respecto a la condición control.

La capacidad de alcalinización del medio fue representativa en el metabolismo de las levaduras productoras de xilitol (*M. caribbica, C. tropicalis* y *D. nepalensis*) independiente del ambiente de aislamiento, lo que podría indicar una activa regulación del metabolismo de compuestos nitrogenados para esta vía metabólica.

La estrategia de adaptación en la propagación de las células permite mejorar la respuesta y diversificar la eficiencia de las levaduras en la bioconversión de la xilosa presente en los hidrolizados hemicelulósicos de bagazo de caña de azúcar hasta etanol y xilitol. Esto evidencia el potencial de la implementación de estas estrategias

para la obtención de levaduras no-convencionales más adaptadas a las condiciones de proceso y el desarrollo de productos de base biológica a partir del uso de levaduras como biocatalizadores.

CAPITULO 5: Recomendaciones

Aumentar el esfuerzo en el muestreo y estudio de la diversidad en los bosques de robles, implementado diversos medios selectivos para contribuir al estudio de la diversidad y ecología de las levaduras en este ecosistema poco explorado único para América del Sur y con fuerte amenaza por acción antrópica.

Evaluar el potencial de la diversidad de levaduras asociadas a ecosistemas de bosques de roble en la cordillera oriental de los Andes Colombianos, para diversas aplicaciones biotecnológicas (producción de enzimas, acción como agentes de biocontrol, entre otros), que pueden contribuir a construir propuestas de desarrollo económico.

Explorar fuentes de nitrógeno novedosas, como residuos de diferentes procesos agroindustriales, para contribuir al déficit de nutrientes presente en los hidrolizados hemicelulósicos de bagazo de caña y evitar el aumento de los costos en el proceso de fermentación con levaduras.

Implementar enfoques genómicos, transcriptómicos y metabólicos en estas levaduras naturalmente transformadoras de D-xilosa, con potencial para ser implementadas en bioprocesos, con el fin de correlacionar fenotipo-genotipo y permitir el reconocimiento de la variación en la expresión génica y metabólica para aumentar la supervivencia celular y mantener el rendimiento fermentativo, asociados al metabolismo específico de la D-xilosa.

Diseñar y aplicar estrategias de cultivos implementado diferentes estresores (etanol, sales, entre otros) y condiciones de configuración que permitan un seguimiento continuo y mayor control de las condiciones del proceso de fermentación. Una forma de operar procesos de manera más confiable podría orientarse a la implementación de reactores secuenciales por lotes (SBR, del inglés *Sequential Batch Reactors*) que permiten un control estricto del entorno de reacción, facilitando el direccionamiento hacía la vía metabólica de interés.

REFERENCIAS

Adeboye, P. T., Bettiga, M., & Olsson, L. (2014). The chemical nature of phenolic compounds determines their toxicity and induces distinct physiological responses in *Saccharomyces cerevisiae* in lignocellulose hydrolysates. *Amb Express*, 4(1), 46.

Agbogbo, F. K., & Coward-Kelly, G. (2008). Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnology letters*, 30(9), 1515-1524.

Ali, S. S., Al-Tohamy, R., Xie, R., El-Sheekh, M. M., & Sun, J. (2020). Construction of a new lipase-and xylanase-producing oleaginous yeast consortium capable of reactive azo dye degradation and detoxification. *Bioresource Technology*, 313, 123631.

Ali, S. S., Al-Tohamy, R., Koutra, E., Kornaros, M., Khalil, M., Elsamahy, T., ... & Sun, J. (2021). Coupling azo dye degradation and biodiesel production by manganese-dependent peroxidase producing oleaginous yeasts isolated from wood-feeding termite gut symbionts. Biotechnology for biofuels, 14(1), 1-25.

Allen, S. A., Clark, W., McCaffery, J. M., Cai, Z., Lanctot, A., Slininger, P. J., ... &Gorsich, S. W. (2010). Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 3(1), 2.

Alfenore, S., & Molina-Jouve, C. (2016). Current status and future prospects of conversion of lignocellulosic resources to biofuels using yeasts and bacteria. *Process Biochemistry*, 51(11), 1747-1756.

Altamirano, A., Vazquez, F., & De Figueroa, L. I. C. (2000). Isolation and identification of xylitol-producing yeasts from agricultural residues. *Folia microbiologica*, 45(3), 255-258.

Amorim, J. C., Piccoli, R. H., & Duarte, W. F. (2018). Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages. *Food Research International*, 107, 518-527.

Andrade, M. C., Gorgulho Silva, C. D. O., de Souza Moreira, L. R., & Ferreira Filho, E. X. (2021). Crop residues: applications of lignocellulosic biomass in the context of a biorefinery. *Frontiers in Energy*, 1-22.

Arumugam, N., Boobalan, T., Saravanan, S., Basu, M. J., Arun, A., Devi, T. S., & Kavitha, T. (2020). In silico and in vitro comparison of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate dependent xylose reductase rossmaan fold in Debaryomycetaceae yeast family. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24, 101508.

Ashokkumar, V., Venkatkarthick, R., Jayashree, S., Chuetor, S., Dharmaraj, S., Kumar, G., ... & Ngamcharussrivichai, C. (2022). Recent advances in lignocellulosic biomass for biofuels and value-added bioproducts-A critical review. *Bioresource technology*, 344, 126195.

Ask, M., Bettiga, M., Duraiswamy, V. R., & Olsson, L. (2013). Pulsed addition of HMF and furfural to batch-grown xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* results in different physiological responses in glucose and xylose consumption phase. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 181

Asocaña. (2022). Informe anual de Asocaña con aspectos generales del Sector Agroindustrial de la Caña de Colombia 2021-2022. http://www.asocana.org/modules/documentos/17611.aspx

Atitallah, I. B., Ntaikou, I., Antonopoulou, G., Alexandropoulou, M., Brysch-Herzberg, M., Nasri, M., Lyberatos, G., & Mechichi, T. (2020). Evaluation of the non-conventional yeast strain *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*) X19 for enhanced bioethanol production using date palm sap as renewable feedstock. *Renewable Energy*, 154, 71-81.

Bakker, B. M., Overkamp, K. M., Van Maris, A. J., Kötter, P., Luttik, M. A., Van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2001). Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews*, 25(1), 15-37.

Banerjee, S., Mudliar, S., Sen, R., Giri, B., Satpute, D., Chakrabarti, T., & Pandey, R. A. (2010). Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 4(1), 77-93.

Banu, J. R., Kavitha, S., Tyagi, V. K., Gunasekaran, M., Karthikeyan, O. P., & Kumar, G. (2021). Lignocellulosic biomass based biorefinery: A successful platform towards circular bioeconomy. *Fuel*, 302, 121086.

Barbosa, M. F., de Medeiros, M. B., de Mancilha, I. M., Schneider, H., & Lee, H. (1988). Screening of yeasts for production of xylitol from d-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology*, 3(4), 241-251.

Barrilli, É. T., Tadioto, V., Milani, L. M., Deoti, J. R., Fogolari, O., Müller, C., Barros, K. O., Rosa C. A., Dos Sandos, A. A., Stambuk, B. U., Treichel, H., & Alves, S. L. (2020). Biochemical analysis of cellobiose catabolism in *Candida pseudointermedia* strains isolated from rotten wood. *Archives of Microbiology*, 202(7), 1729-1739.

Barros O. K., Garcia-Acero A. M., & Rosa, C. A. (2020) Non-Conventional Yeasts with Potential for Production of Second-Generation Ethanol. In Biofuels: Advances in Research and Applications (pp. 109 -150). *Nova Science Publishers*.

Bazoti, S. F., Golunski, S., Siqueira, D. P., Scapini, T., Barrilli, É. T., Mayer, D. A., Barros, K. O., Rosa, C. A., Stambuk, B. U., Alves, S. L., Valério, A., Oliveira D., & Treichel, H. (2017). Second-generation ethanol from non-detoxified sugarcane hydrolysate by a rotting wood isolated yeast strain. *Bioresource Technology*, 244, 582-587.

Bellido, C., Bolado, S., Coca, M., Lucas, S., González-Benito, G., & García-Cubero, M. T. (2011). Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. *Bioresource technology*, 102(23), 10868-10874.

Bergmann, J. C., Trichez, D., Morais Junior, W. G. D., Ramos, T. G. S., Pacheco, T. F., Carneiro, C. V. G., ... & Almeida, J. R. M. (2019). Biotechnological application of non-conventional yeasts for xylose valorization. *Non-conventional yeasts: from basic research to application*, 23-74.

Bianchini, I. D. A., Sene, L., da Cunha, M. A. A., & Felipe, M. D. G. D. A. (2022). Short-term Adaptation Strategy Improved Xylitol Production by *Candida guilliermondii* on Sugarcane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate. *BioEnergy Research*, 15(2), 1182-1194.

Biazi, L. E., Santos, S. C., Kaupert Neto, A. A., Sousa, A. S., Soares, L. B., Renzano, E., ... & Ienczak, J. L. (2022). Adaptation strategy to increase the tolerance of *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 to inhibitors of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate through comparative studies of proteomics and fermentation. *BioEnergy Research*, 15(1), 479-492.

Blackwell, M. (2017). Made for each other: ascomycete yeasts and insects. *Microbiology Spectrum*, 5(3), 5-3.

Boekhout, T., Amend, A. S., El Baidouri, F., Gabaldón, T., Geml, J., Mittelbach, M., ... & Yurkov, A. (2021a). Trends in yeast diversity discovery. *Fungal Diversity*, 1-47.

Boekhout, T., Aime, M. C., Begerow, D., Gabaldón, T., Heitman, J., Kemler, M., ... & Yurkov, A. (2021b). The evolving species concepts used for yeasts: from phenotypes and genomes to speciation networks. *Fungal diversity*, 109(1), 27-55.

Boontham, W., Angchuan, J., Boonmak, C., & Srisuk, N. (2020). *Limtongozyma siamensis* gen. nov., sp. nov., a yeast species in the Saccharomycetales and reassignment of Candida

cylindracea to the genus *Limtongozyma*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(1), 199-203.

Brandt, B. A., Jansen, T., Görgens, J. F., & van Zyl, W. H. (2019). Overcoming lignocellulose-derived microbial inhibitors: advancing the *Saccharomyces cerevisiae* resistance toolbox. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13(6), 1520-1536.

Brandt, B. A., Jansen, T., Volschenk, H., Görgens, J. F., Van Zyl, W. H., & Den Haan, R. (2021). Stress modulation as a means to improve yeasts for lignocellulose bioconversion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(12), 4899-4918.

Brown, A. J., Larcombe, D. E., & Pradhan, A. (2020). Thoughts on the evolution of Core Environmental Responses in yeasts. *Fungal biology*, 124(5), 475-481.

Brysch-Herzberg, M., Dlauchy, D., Seidel, M., & Péter, G. (2021). *Cyberlindnera sylvatica* sp. nov., a yeast species isolated from forest habitats. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(2), 004477.

Cabrera-Orefice, A., Chiquete-Félix, N., Espinasa-Jaramillo, J., Rosas-Lemus, M., Guerrero-Castillo, S., Peña, A., & Uribe-Carvajal, S. (2014). The branched mitochondrial respiratory chain from *Debaryomyces hansenii*: components and supramolecular organization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1837(1), 73-84.

Cadete, R. M., Melo, M. A., Dussan, K. J., Rodrigues, R. C., Silva, S. S., Zilli, J. E., ... & Rosa, C. A. (2012). Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. *PLoS ONE* 7(8): e43135.

Cadete, R. M., Cheab, M. A., Santos, R. O., Safar, S. V., Zilli, J. E., Vital, M. J., ... & Rosa, C. A. (2015). *Cyberlindnera xylosilytica* sp. nov., a xylitol-producing yeast species isolated from lignocellulosic materials. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(Pt_9), 2968-2974.

Cadete, R. M., Melo-Cheab, M. A., Viana, A. L., Oliveira, E. S., Fonseca, C., & Rosa, C. A. (2016). The yeast *Scheffersomyces amazonensis* is an efficient xylitol producer. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32(12), 1-5.

Cadete, R. M., Lopes, M. R., & Rosa, C. A. (2017a). Yeasts associated with decomposing plant material and rotting wood. In Yeasts in natural ecosystems: diversity (pp. 265-292). *Springer, Cham.*

Cadete, R. M., Melo-Cheab, M. A., Dussán, K. J., Rodrigues, R. C. L. B., Da Silva, S. S., Gomes, F. C. O., & Rosa, C. A. (2017b). Production of bioethanol in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Scheffersomyces parashehatae*, *Scheffersomyces illinoinensis* and *Spathaspora arborariae* isolated from Brazilian ecosystems. Journal of applied microbiology, 123(5), 1203-1213.

Cadete, R. M., & Rosa, C. A. (2018). The yeasts of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second-generation biofuel production. *Yeast*, 35(2), 191-199.

Calleja, G. B., Levy-Rick, S., Mahmourides, G., Labelle, J., & Schneider, H. (1990). Rapid process for the conversion of xylose to ethanol. https://www.osti.gov/etdeweb/biblio/6842727

CAR. Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca (2016). Plan de manejo y conservación del Roble (*Quercus humboldtii* Bonpl.) en la jurisdicción Car Cundinamarca. Bogotá D.C., Colombia.

Carneiro, C. V. G., Silva, F. C. D. P. E., & Almeida, J. R. (2019). Xylitol production: identification and comparison of new producing yeasts. Microorganisms, 7(11), 484.

Causton, H.C., Ren, B., Koh, S.S., Harbison, C.T., Kanin, E., Jennings, E.G., Lee, T.I., True, H.L., Lander, E.S., and Young, R.A. (2001). Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell* 12, 323–337.

CEPF, Critical Ecosystem Partnership Fund (2022). https://www.cepf.net/node/1996 . Acceso 23 Ago 2022.

Chandel, A.K., Chandrasekhar, G., Radhika, K., Ravinder, K. y Ravindra, P. (2011). Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 6:8-20.

Chandel, A. K., Garlapati, V. K., Singh, A. K., Antunes, F. A. F., & da Silva, S. S. (2018). The path forward for lignocellulose biorefineries: bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. *Bioresource Technology*, 264, 370-381

Chao, A., & Jost, L. (2012). Coverage-based rarefaction and extrapolation: standardizing samples by completeness rather than size. *Ecology*, 93(12), 2533-2547.

Chao, A., Gotelli, N. J., Hsieh, T. C., Sander, E. L., Ma, K. H., Colwell, R. K., & Ellison, A. M. (2014). Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecological monographs*, 84(1), 45-67.

Chaves-López, C., Serio, A., Grande-Tovar, C. D., Cuervo-Mulet, R., Delgado-Ospina, J., & Paparella, A. (2014). Traditional Fermented Foods and Beverages from a Microbiological and Nutritional Perspective: The Colombian Heritage. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 1031–1048.

Cheng, K. K., Zhang, J. A., Ling, H. Z., Ping, W. X., Huang, W., Ge, J. P., & Xu, J. M. (2009). Optimization of pH and acetic acid concentration for bioconversion of hemicellulose from corncobs to xylitol by *Candida tropicalis*. *Biochemical Engineering Journal*, 43(2), 203-207.

Cheng, C., Almario, M. P., & Kao, K. C. (2015). Genome shuffling to generate recombinant yeasts for tolerance to inhibitors present in lignocellulosic hydrolysates. *Biotechnology letters*, 37(11), 2193-2200.

Cho, E. J., Trinh, L. T. P., Song, Y., Lee, Y. G., & Bae, H. J. (2020). Bioconversion of biomass waste into high value chemicals. Bioresource technology, 298, 122386.

Choudhary, J., Singh, S., & Nain, L. (2017). Bioprospecting thermotolerant ethanologenic yeasts for simultaneous saccharification and fermentation from diverse environments. *Journal of bioscience and bioengineering*, 123(3), 342-346.

CI, Pagina web Conservación Internacional (2022) https://www.conservation.org/priorities/biodiversity-hotspots. Acceso 23 Ago 2022

Conab (2022) Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar - Safra 2022–23 - Segundo levantamento. https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar . Acceso 23Ago 2022 - SAFRA 2022/223

Conrad, A. O., McPherson, B. A., Lopez-Nicora, H. D., D'Amico, K. M., Wood, D. L., & Bonello, P. (2019). Disease incidence and spatial distribution of host resistance in a coast live oak/sudden oak death pathosystem. *Forest Ecology and Management*, 433, 618-624.

Converti, A., Perego, P., Sordi, A., & Torre, P. (2002). Effect of starting xylose concentration on the microaerobic metabolism of *Debaryomyces hansenii*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 101(1), 15-29.

Côrte-Real, M., & Leao, C. (1990). Transport of malic acid and other dicarboxylic acids in the yeast *Hansenula anomala*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(4), 1109-1113.

Cunha, A. C., Santos, R. A., Riaño-Pachon, D. M., Squina, F. M., Oliveira, J. V., Goldman, G. H., Souza, A. T., Gomes, L. S., Godoy-Santos, F., Teixeira, J. A., Faria-Oliveira, F., Rosse, I. C., Castro, I. M., Lucas, C., & Brandão, R. L. (2020). Draft genome sequence of *Wickerhamomyces anomalus* LBCM1105, isolated from cachaça fermentation. *Genetics and molecular biology*, 43.

da Silva, D. D. V., Machado, E., Danelussi, O., dos Santos, M. G., da Silva, S. S., & Dussán, K. J. (2022). Repeated-batch fermentation of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate to ethanol using two xylose-fermenting yeasts. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-11

Dahmen, N., Lewandowski, I., Zibek, S., & Weidtmann, A. (2018). Integrated lignocellulosic value chains in a growing bioeconomy: Status quo and perspectives. *Global Change Biology Bioenergy*, 11(1), 107-117.

Datta, N., Arendrup, M. C., & Saunte, J. P. (2015). First report of *Candida palmioleophila* endogenous endophthalmitis. *Acta ophthalmologica*, 93(6), e517-e518.

Daniel, H. M., Lachance, M. A., & Kurtzman, C. P. (2014). On the reclassification of species assigned to *Candida* and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106(1), 67-84.

De Albuquerque, T. L., Gomes, S. D. L., Marques Jr, J. E., da Silva Jr, I. J., & Rocha, M. V. P. (2015). Xylitol production from cashew apple bagasse by *Kluyveromyces marxianus* CCA510. *Catalysis Today*, 255, 33-40.

De Bhowmick, G., Sarmah, A. K., & Sen, R. (2018). Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value-added products. *Bioresource Technology*. 247, 1144-1154.

Delgado-Ospina, J., Triboletti, S., Alessandria, V., Serio, A., Sergi, M., Paparella, A., Rantsiou, K., & Chaves-López, C. (2020). Functional biodiversity of yeasts isolated from Colombian fermented and dry cocoa beans. *Microorganisms*, 8(7), 1086

Ding, M. Z., Wang, X., Yang, Y., & Yuan, Y. J. (2012). Comparative metabolic profiling of parental and inhibitors-tolerant yeasts during lignocellulosic ethanol fermentation. *Metabolomics*, 8(2), 232-243.

Dong, Y., Hu, J., Fan, L., & Chen, Q. (2017). RNA-Seq-based transcriptomic and metabolomic analysis reveal stress responses and programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Scientific reports*, 7(1), 1-16.

Dourou, M., Economou, C. N., Aggeli, L., Janák, M., Valdés, G., Elezi, N., ... & Aggelis, G. (2021). Bioconversion of pomegranate residues into biofuels and bioactive lipids. *Journal of Cleaner Production*, 323, 129193.

Dragosits, M., & Mattanovich, D. (2013). Adaptive laboratory evolution–principles and applications for biotechnology. *Microbial cell factories*, 12(1), 1-17.

Duque, A., Álvarez, C., Doménech, P., Manzanares, P., & Moreno, A. D. (2021). Advanced bioethanol production: from novel raw materials to integrated biorefineries. *Processes*, 9(2), 206.

El-Baz, A. F., Shetaia, Y. M., & Elkhouli, R. R. (2011). Xylitol production by *Candida tropicalis* under different statistically optimized growth conditions. *African Journal of Biotechnology*, 10(68), 15353-15363.

Eliodório, K. P., e Cunha, G. C. D. G., Müller, C., Lucaroni, A. C., Giudici, R., Walker, G. M., ... & Basso, T. O. (2019). Advances in yeast alcoholic fermentations for the production of bioethanol, beer and wine. *Advances in applied microbiology*, 109, 61-119.

Endoh, R., Horiyama, M., & Ohkuma, M. (2021). D-Fructose assimilation and fermentation by yeasts belonging to saccharomycetes: rediscovery of universal phenotypes and elucidation of fructophilic behaviors in *Ambrosiozyma platypodis* and *Cyberlindnera americana*. *Microorganisms*, 9(4), 758.

Enjalbert, B., Nantel, A., & Whiteway, M. (2003). Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response. *Molecular biology of the cell*, 14(4), 1460-1467.

Estrada-Ávila, A. K., González-Hernández, J. C., Calahorra, M., Sánchez, N. S., & Peña, A. (2022). Xylose and yeasts: A story beyond xylitol production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1866(8), 130154.

Fan, L. F., Alvarenga, R. L. M., Gibertoni, T. B., Wu, F., & Dai, Y. C. (2021). Four new species in the *Tremella fibulifera* complex (*Tremellales*, Basidiomycota). MycoKeys, 82, 33.

Ferreira, A. D., Mussatto, S. I., Cadete, R. M., Rosa, C. A., & Silva, S. S. (2011). Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. Yeast, 28(7), 547-554.

Ferreira, D., Nobre, A., Silva, M. L., Faria-Oliveira, F., Tulha, J., Ferreira, C., & Lucas, C. (2013). XYLH encodes a xylose/H+ symporter from the highly related yeast species *Debaryomyces fabryi* and *Debaryomyces hansenii*. *FEMS yeast research*, 13(7), 585-596.

Ferreira, L. R. A., Otto, R. B., Silva, F. P., De Souza, S. N. M., De Souza, S. S., & Junior, O. A. (2018). Review of the energy potential of the residual biomass for the distributed generation in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 94, 440-455.

Fletcher, E., Gao, K., Mercurio, K., Ali, M., & Baetz, K. (2019). Yeast chemogenomic screen identifies distinct metabolic pathways required to tolerate exposure to phenolic fermentation inhibitors ferulic acid, 4-hydroxybenzoic acid and coniferyl aldehyde. *Metabolic Engineering*, 52, 98-109.

Galbe, M., & Wallberg, O. (2019). Pretreatment for biorefineries: a review of common methods for efficient utilisation of lignocellulosic materials. *Biotechnology for biofuels,* 12(1), 1-26.

Gambacorta, F. V., Dietrich, J. J., Yan, Q., & Pfleger, B. F. (2020). Rewiring yeast metabolism to synthesize products beyond ethanol. *Current opinion in chemical biology*, 59, 182-192.

Garbe, E., & Vylkova, S. (2019). Role of amino acid metabolism in the virulence of human pathogenic fungi. *Current Clinical Microbiology Reports*, 6(3), 108-119.

Garcia-Acero A., Velasquez L M., Brandão P., 2017, Isolation of Colombian Native Bacteria and their Potential for Ethanol Production from Xylose and Glucose. *Chemical Engineering Transactions*, 57, 1735-1740

García L. L. S., & Vanegas V. L. L (2021). Análisis técnico y ambiental de la capacidad de carga de los senderos del Parque Natural Chicaque. *Boletín Semillas Ambientales*, 15(1).

García-Ríos, E., Ramos-Alonso, L., & Guillamon, J. M. (2016). Correlation between low temperature adaptation and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1199.

García-Ríos, E., Alonso-del-Real, J., Lip, K. Y. F., Pinheiro, T., Teixeira, J., van Gulik, W., ... & Guillamón, J. M. (2022). Genome-wide effect of non-optimal temperatures under anaerobic conditions on gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genomics*, 114(4), 110386.

Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., ... & Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular biology of the cell*, 11(12), 4241-4257.

Goli, J. K., Panda, S. H., & Linga, V. R. (2012). Molecular mechanism of D-xylitol production in yeasts: focus on molecular transportation, catabolic sensing and stress response. *In D-xylitol* (pp. 85-107). Springer, Berlin, Heidelberg.

González-Gutiérrez, K. N., Ragazzo-Sánchez, J. A., & Calderón-Santoyo, M. (2021). Application of stressed and microencapsulated *Meyerozyma caribbica* for the control of *Colletotrichum gloeosporioides* in avocado (Persea americana Mill. cv. Hass). *Journal of Plant Diseases and Protection*, 1-9.

Granström, T., Ojamo, H., & Leisola, M. (2001). Chemostat study of xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Applied microbiology and biotechnology*, 55(1), 36-42.

Groenewald, M., Robert, V., & Smith, M. T. (2011). The value of the D1/D2 and internal transcribed spacers (ITS) domains for the identification of yeast species belonging to the genus *Yamadazyma*. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 26(1), 40-46.

Gschaedler, A., Iñiguez-Muñoz, L. E., Flores-Flores, N. Y., Kirchmayr, M., & Arellano-Plaza, M. (2021). Use of non-Saccharomyces yeasts in cider fermentation: Importance of the nutrients addition to obtain an efficient fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 347, 109169.

Guamán-Burneo, M. C., Dussán, K. J., Cadete, R. M., Cheab, M. A., Portero, P., Carvajal-Barriga, E. J., ... & Rosa, C. A. (2015). Xylitol production by yeasts isolated from rotting wood in the Galápagos Islands, Ecuador, and description of *Cyberlindnera galapagoensis* fa, sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 108(4), 919-931.

Guaragnella, N., & Bettiga, M. (2021). Acetic acid stress in budding yeast: From molecular mechanisms to applications. *Yeast*, 38(7), 391-400.

Guleria, P., Kaur, S., Sidana, A., & Yadav, S. K. (2022). Xylitol production from rice straw hemicellulosic hydrolysate by *Candida tropicalis* GS18 immobilized on bacterial cellulose-sodium alginate matrix. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-11.

Guo, H., Chang, Y., & Lee, D. J. (2018). Enzymatic saccharification of lignocellulosic biorefinery: research focuses. *Bioresource Technology*, 252, 198-215.

Guo, H., Zhao, Y., Chang, J. S., & Lee, D. J. (2022). Inhibitor formation and detoxification during lignocellulose biorefinery: A review. *Bioresource Technology*, 127666.

Haase, M. A., Kominek, J., Langdon, Q. K., Kurtzman, C. P., & Hittinger, C. T. (2017). Genome sequence and physiological analysis of *Yamadazyma laniorum* fa sp. nov. and a reevaluation of the apocryphal xylose fermentation of its sister species, *Candida tenuis*. *FEMS yeast research*, 17(3).

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), 1-13.

Heisel, T., Nyaribo, L., Sadowsky, M. J., & Gale, C. A. (2019). Breastmilk and NICU surfaces are potential sources of fungi for infant mycobiomes. *Fungal Genetics and Biology*, 128, 29-35.

Hernández-Pérez, A. F., Arruda, P. V. D., & Felipe, M. D. G. D. A. (2016). Sugarcane straw as a feedstock for xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *brazilian journal of microbiology*, 47, 489-496.

Hernández-Pérez, A. F., de Arruda, P. V., Sene, L., da Silva, S. S., Kumar Chandel, A., & de Almeida Felipe, M. D. G. (2019). Xylitol bioproduction: state-of-the-art, industrial paradigm shift, and opportunities for integrated biorefineries. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(7), 924-943.

Hernández-Pérez, A. F., Antunes, F. A. F., dos Santos, J. C., da Silva, S. S., & Felipe, M. D. G. D. A. (2020). Valorization of the sugarcane bagasse and straw hemicellulosic hydrolysate through xylitol bioproduction: effect of oxygen availability and sucrose supplementation as key factors. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-15.

Hickert, L. R., da Cunha-Pereira, F., de Souza-Cruz, P. B., Rosa, C. A., & Ayub, M. A. Z. (2013). Ethanogenic fermentation of co-cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 in synthetic medium and rice hull hydrolysate. *Bioresource Technology*, 131, 508-514.

Hsieh TC, Ma KH & Chao A (2019). 'iNEXT': iNterpolation and EXTrapolation for species diversity. R package version 2.0.20

Hou, J., Qiu, Z., Han, H., & Zhang, Q. (2018). Toxicity evaluation of lignocellulose-derived phenolic inhibitors on *Saccharomyces cerevisiae* growth by using the QSTR method. *Chemosphere*, 201, 286

IPCC (2007). Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, Pachauri, R.K and Reisinger, A. (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland.

Jia, R. R., Lv, S. L., Chai, C. Y., & Hui, F. L. (2020). Three new *Scheffersomyces* species associated with insects and rotting wood in China. *MycoKeys*, 71, 87.
Juárez, O., Guerra, G., Martínez, F., & Pardo, J. P. (2004). The mitochondrial respiratory chain of *Ustilago maydis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1658(3), 244-251.

Junior, W. G. M., Pacheco, T. F., Trichez, D., Almeida, J. R., & Gonçalves, S. B. (2019). Xylitol production on sugarcane biomass hydrolysate by newly identified *Candida tropicalis* JA2 strain. *Yeast*, 36(5), 349-361.

Kieliszek, M., Kot, A. M., Bzducha-Wróbel, A., Błażejak, S., Gientka, I., & Kurcz, A. (2017). Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry: A review. *Fungal Biology Reviews*, 31(4), 185-198.)

Kim, D. (2018). Physico-chemical conversion of lignocellulose: inhibitor effects and detoxification strategies: a mini review. *Molecules*, 23(2), 309.

Kim, D., & Hahn, J.-S. (2013). Roles of the Yap1 transcription factor and antioxidants in *Saccharomyces cerevisiae*'s tolerance to furfural and 5-hydroxymethylfurfural, which function as thiol-reactive electrophiles generating oxidative stress. *Applied and Environmental Microbiology*. 79, 5069–5077.

Kim, K. H., Lee, H. Y., & Lee, C. Y. (2015). Pretreatment of sugarcane molasses and citric acid production by *Candida zeylanoides*. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 43(2), 164-168.

Kim, D., & Woo, H. M. (2018). Deciphering bacterial xylose metabolism and metabolic engineering of industrial microorganisms for use as efficient microbial cell factories. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(22), 9471-9480

Kim, S., Lee, J., & Sung, B. H. (2019). Isolation and characterization of the stress-tolerant *Candida tropicalis* YHJ1 and evaluation of its xylose reductase for xylitol production from acid pre-treatment wastewater. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 138.

Kitanovic, A., Bonowski, F., Heigwer, F., Ruoff, P., Kitanovic, I., Ungewiss, C., & Wölfl, S. (2012). Acetic acid treatment in *S. cerevisiae* creates significant energy deficiency and nutrient starvation that is dependent on the activity of the mitochondrial transcriptional complex Hap2-3-4-5. *Frontiers in oncology*, *2*, 118.

Kitichantaropas, Y., Boonchird, C., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Harashima, S., & Auesukaree, C. (2016). Cellular mechanisms contributing to multiple stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential use in high-temperature ethanol fermentation. *Amb Express*, 6(1), 1-14.

Khalifa, H. O., Watanabe, A., & Kamei, K. (2022). Azole and echinocandin resistance mechanisms and genotyping of Candida tropicalis in Japan: cross-boundary dissemination and animal–human transmission of C. tropicalis infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 28(2), 302-e5.

Khalil, M. J., Aslam, M., & Ahmad, S. (2021). Utilization of sugarcane bagasse ash as cement replacement for the production of sustainable concrete–A review. *Construction and Building Materials*, 270, 121371

Khatri, P., & Pandit, A. B. (2022). Systematic review of life cycle assessments applied to sugarcane bagasse utilization alternatives. *Biomass and Bioenergy*, 158, 106365.

Kumar, S., Lal, P., & Gummadi, S. N. (2008). Growth of halotolerant food spoiling yeast *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413 under the influence of pH and salt. *Current microbiology*, 57(6), 598-602.

Kumar, S., & Gummadi, S. N. (2011). Metabolism of glucose and xylose as single and mixed feed in *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413: production of industrially important metabolites. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(5), 1405-1415.

Kumar, B., & Verma, P. (2021). Biomass-based biorefineries: an important architype towards a circular economy. *Fue*l, 288, 119622.

Kumar, A., Kumar, V., & Singh, B. (2021). Cellulosic and hemicellulosic fractions of sugarcane bagasse: Potential, challenges and future perspective. *International Journal of Biological Macromolecules*, 169, 564-582

Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (2003). Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. *FEMS yeast research*, 3(4), 417-432.

Kurtzman CP, Suzuki M. (2010) Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. *Mycoscience* 51: 2–14.

Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (2011). The yeasts, a taxonomic study, chapter 10. (eds) Elsevier, Amsterdam, pp 137–144

Kwak, S., & Jin, Y. S. (2017). Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: a review and perspective. *Microbial cell factories*, 16(1), 1-15.

Kwak, S., Jo, J. H., Yun, E. J., Jin, Y. S., & Seo, J. H. (2019). Production of biofuels and chemicals from xylose using native and engineered yeast strains. *Biotechnology Advances*, 37(2), 271-283.

Lachance, M. A., Bowles, J. M., Starmer, W. T., & Barker, J. S. F. (1999). *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. *Canadian journal of microbiology*, 45(2), 172-177.

Lachance M-A (2006) Yeast biodiversity: how many and how much? In: Rosa CA, Péter G (eds) *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer, Berlin, pp 1–9

Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suárez, T., García-Mendoza, A., & Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS yeast research*, 8(7), 1037-1052.

Lara CA, Santos RO, Cadete RM, Ferreira C, Marques S, Gírio F, Oliveira ES, Rosa CA, Fonseca C (2014) Identificación y caracterización de levaduras xilanolíticas aisladas de madera en descomposición y bagazo de caña de azúcar en Brasil. *Antonie Van Leeuwenhoek* 105: 1107–1119.

Lask, J., Wagner, M., Trindade, L. M., & Lewandowski, I. (2019). Life cycle assessment of ethanol production from miscanthus: A comparison of production pathways at two European sites. *Gcb Bioenergy*, 11(1), 269-288.

Leonel, L. V., Arruda, P. V., Chandel, A. K., Felipe, M. G. A., & Sene, L. (2021). *Kluyveromyces marxianus*: a potential biocatalyst of renewable chemicals and lignocellulosic ethanol production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1–22.

Li, C., Zhang, H., Yang, Q., Komla, M. G., Zhang, X., & Zhu, S. (2014). Ascorbic acid enhances oxidative stress tolerance and biological control efficacy of *Pichia caribbica* against postharvest blue mold decay of apples. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(30), 7612-7621

Li, X., Chen, Y., & Nielsen, J. (2019). Harnessing xylose pathways for biofuels production. *Current Opinion in Biotechnology*, 57, 56-65.

Li, B., Liu, N., & Zhao, X. (2022). Response mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* to the stress factors present in lignocellulose hydrolysate and strategies for constructing robust strains. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 15(1), 1-20.

Limtong, S., & Kaewwichian, R. (2015). The diversity of culturable yeasts in the phylloplane of rice in Thailand. *Annals of microbiology*, 65(2), 667-675.

Lin, N. X., Xu, Y., & Yu, X. W. (2021). Overview of yeast environmental stress response pathways and the development of tolerant yeasts. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 1-14.

Liszkowska, W., & Berlowska, J. (2021). Yeast fermentation at low temperatures: Adaptation to changing environmental conditions and formation of volatile compounds. *Molecules*, 26(4), 1035.

Liu, X. Z., Wang, Q. M., Göker, M., Groenewald, M., Kachalkin, A. V., Lumbsch, H. T., ... & Bai, F. Y. (2015). Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. Studies in mycology, 81(1), 85-147.

Liu, X. J., Cao, W. N., Ren, Y. C., Xu, L. L., Yi, Z. H., Liu, Z., & Hui, F. L. (2016). Taxonomy and physiological characterisation of *Scheffersomyces titanus* sp. nov., a new D-xylose-fermenting yeast species from China. Scientific reports, 6(1), 1-8.

Lodi, T., Fontanesi, F., Ferrero, I., & Donnini, C. (2004). Carboxylic acids permeases in yeast: two genes in *Kluyveromyces lactis*. *Gene*, 339, 111-119.

Lopes, M. R., Morais, C. G., Kominek, J., Cadete, R. M., Soares, M. A., Uetanabaro, A. P. T., ... & Rosa, C. A. (2016). Genomic analysis and D-xylose fermentation of three novel

Spathaspora species: *Spathaspora girioi* sp. nov., *Spathaspora hagerdaliae* fa, sp. nov. and *Spathaspora gorwiae* fa, sp. nov. *FEMS yeast research*, 16(4), fow044.

Lopes, M. R., Lara, C. A., Moura, M. E., Uetanabaro, A. P. T., Morais, P. B., Vital, M. J., & Rosa, C. A. (2018). Characterisation of the diversity and physiology of cellobiose-fermenting yeasts isolated from rotting wood in Brazilian ecosystems*. Fungal biology*, 122(7), 668-676.

López-Linares, J. C., Romero, I., Cara, C., Castro, E., & Mussatto, S. I. (2018). Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* from rapeseed straw hemicellulosic hydrolysate. *Bioresource technology*, 247, 736-743.

Loureiro, S. T. A., Cavalcanti, M. A. D. Q., Neves, R. P., & Passavante, J. Z. D. O. (2005). Yeasts isolated from sand and sea water in beaches of Olinda, Pernambuco state, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 36, 333-337.

Lourenço, M. D. M., Dini-Andreote, F., Aguilar-Vildoso, C. I., & Basso, L. C. (2014). Biotechnological potential of *Candida* spp. for the bioconversion of D-xylose to xylitol. *African Journal of Microbiology Research*, 8(20), 2030-2036.

Lu, Y. F., Wang, M., Zheng, J., & Hui, F. L. (2017). *Ogataea neixiangensis* sp. nov. and *Ogataea paraovalis* fa, sp. nov., two methanol-assimilating yeast species isolated from rotting wood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(8), 3038-3042.

Lücking, R., Aime, M. C., Robbertse, B., Miller, A. N., Ariyawansa, H. A., Aoki, T., ... & Schoch, C. L. (2020). Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal ADN barcoding?. *IMA fungus*, 11(1), 1-32.

Magalhães Jr, A. I., de Carvalho, J. C., de Melo Pereira, G. V., Karp, S. G., Câmara, M. C., Medina, J. D. C., & Soccol, C. R. (2019). Lignocellulosic biomass from agro-industrial residues in South America: current developments and perspectives. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13(6), 1505-1519.

Mahecha, P. V. (2021). cadenas agroindustriales: subproductos y residuos de la actividad agrícola. *Alternativas de aprovechamiento de los residuos en la agroindustria*.

Maicas, S. (2020). The role of yeasts in fermentation processes. *Microorganisms*, 8(8), 1142.

Malassigné, S., Minard, G., Vallon, L., Martin, E., Valiente Moro, C., & Luis, P. (2021). Diversity and Functions of Yeast Communities Associated with Insects. *Microorganisms*, 9(8), 1552.

Malla, S., & Gummadi, S. N. (2018). Thermal stability of xylose reductase from *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413: deactivation kinetics and structural studies. *Process Biochemistry*, 67, 71-79.

Mankar, A. R., Pandey, A., Modak, A., & Pant, K. K. (2021). Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. *Bioresource Technology*, 334, 125235.

Mans, R., Daran, J. M. G., & Pronk, J. T. (2018). Under pressure: evolutionary engineering of yeast strains for improved performance in fuels and chemicals production. *Current opinion in biotechnology*, 50, 47-56.

Mardawati, E., Trirakhmadi, A., Kresnowati, M. T. A. P., & Setiadi, T. (2017). Kinetic study on Fermentation of xylose for The Xylitol Production. *Journal of Industrial and Information Technology in Agriculture*, 1(1), 1-8.

Mariani, D., Mathias, C. J., da Silva, C. G., Herdeiro, R. D. S., Pereira, R., Panek, A. D., ... & Pereira, M. D. (2008). Involvement of glutathione transferases, Gtt1and Gtt2, with oxidative stress response generated by H_2O_2 during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox Report*, 13(6), 246-254.

Martins, G. M., Bocchini-Martins, D. A., Bezzerra-Bussoli, C., Pagnocca, F. C., Boscolo, M., Monteiro, D. A., & Gomes, E. (2018). The isolation of pentose-assimilating yeasts and their xylose fermentation potential. *Brazilian journal of microbiology*, 49, 162-168.

Martorell, M. M., Ruberto, L. A. M., Fernández, P. M., Castellanos de Figueroa, L. I., & Mac Cormack, W. P. (2017). Bioprospection of cold-adapted yeasts with biotechnological potential from Antarctica. *Journal of Basic Microbiology*, 57(6), 504–516.

Mateo, S., Puentes, J. G., Moya, A. J., & Sánchez, S. (2015). Ethanol and xylitol production by fermentation of acid hydrolysate from olive pruning with *Candida tropicalis* NBRC 0618. *Bioresource Technology*, 190, 1-6.

Matheny, P. B., Liu, Y. J., Ammirati, J. F., & Hall, B. D. (2002). Using RPB1 sequences to improve phylogenetic inference among mushrooms (Inocybe, Agaricales). *American Journal of Botany*, 89(4), 688-698.

Mattam, A. J., Kuila, A., Suralikerimath, N., Choudary, N., Rao, P. V., & Velankar, H. R. (2016). Cellulolytic enzyme expression and simultaneous conversion of lignocellulosic sugars into ethanol and xylitol by a new *Candida tropicalis* strain. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1-12.

Medeiros, A. O., Missagia, B. S., Brandão, L. R., Callisto, M., Barbosa, F. A., & Rosa, C. A. (2012). Water quality and diversity of yeasts from tropical lakes and rivers from the Rio Doce basin in Southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1582-1594.

Meena, R. C., Thakur, S., Nath, S., & Chakrabarti, A. (2011). Tolerance to thermal and reductive stress in *Saccharomyces cerevisiae* is amenable to regulation by phosphorylation–dephosphorylation of ubiquitin conjugating enzyme 1 (Ubc1) S97 and S115. *Yeast*, 28(11), 783-793.

Mendes Ferreira, A., & Mendes-Faia, A. (2020). The role of yeasts and lactic acid bacteria on the metabolism of organic acids during winemaking. *Foods*, 9(9), 1231.

Mestre, M. C., Fontenla, S., Bruzone, M. C., Fernández, N. V., & Dames, J. (2016). Detection of plant growth enhancing features in psychrotolerant yeasts from Patagonia (Argentina). *Journal of basic microbiology*, 56(10), 1098-1106.

Meyer, W., Mitchell, T. G., Freedman, E. Z., & Vilgalys, R. (1993). Hybridization probes for conventional ADN fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(9), 2274-2280.

Mikulášová, M., Vodný, Š., & Pekarovičová, A. (1990). Influence of phenolics on biomass production by *Candida utilis* and *Candida albicans*. *Biomass*, 23(2), 149-154.

Mira, N. P., Palma, M., Guerreiro, J. F., & Sá-Correia, I. (2010). Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for tolerance to acetic acid. *Microbial cell factories*, 9(1), 1-13.

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

Misra, S., Raghuwanshi, S., Gupta, P., Dutt, K., & Saxena, R. K. (2012). Fermentation behavior of osmophilic yeast *Candida tropicalis* isolated from the nectar of *Hibiscus rosa sinensis* flowers for xylitol production. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101(2), 393-402.

Mollapour, M., & Piper, P. W. (2007). Hog1 mitogen-activated protein kinase phosphorylation targets the yeast Fps1 aquaglyceroporin for endocytosis, thereby rendering cells resistant to acetic acid. *Molecular and cellular biology,* 27(18), 6446-6456.

Monteiro Moreira, G. A., & Martins do Vale, H. M. (2020). Soil yeast communities in revegetated post-mining and adjacent native areas in Central Brazil. *Microorganisms*, 8(8), 1116

Morais, C. G., Sena, L. M., Lopes, M. R., Santos, A. R. O., Barros, K. O., Alves, C. R., ... & Rosa, C. A. (2020). Production of ethanol and xylanolytic enzymes by yeasts inhabiting rotting wood isolated in sugarcane bagasse hydrolysate. Fungal biology, 124(7), 639-647.

Morales, D., Cifuentes, Y., Ruiz, R., Montoya, J., & Velásquez, M. (2014). Fermentation of Enzymatic Hydrolysates of Sugar Cane Bagasse by a Colombian Native Strain of *Saccharomyces Cerevisiae* for the Production of Cellulosic Ethanol. In Conference Proceedings, *Tokyo International Conference on Life Science and Biological Engineering* (Vol. 287).

Moreno, A. D., Tellgren-Roth, C., Soler, L., Dainat, J., Olsson, L., & Geijer, C. (2017). Complete genome sequences of the xylose-fermenting *candida intermedia* strains CBS 141442 and PYCC 4715. *Genome announcements*, 5(14), e00138-17.

Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature, 403(6772), 853-858.

Nakase, T. (1971). New species of yeasts resembling Candida krusei (Cast.) Berkhout. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 17(5), 383-398.

Nakase, T., Suzuki, M., Takashima, M., Rosadi, D., Hermosillo, A. M., and Komagata, K. (1994) *Candida akabanensis*, a new species of yeast isolated from insect frass in bark of a grape vine. *Microbiol. Cult. Coll*., 10, 35-43.

Ndukwe, J. K., Aliyu, G. O., Onwosi, C. O., Chukwu, K. O., & Ezugworie, F. N. (2020). Mechanisms of weak acid-induced stress tolerance in yeasts: Prospects for improved bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Process Biochemistry*, 90, 118-130.

Negrão, D. R., Grandis, A., Buckeridge, M. S., Rocha, G. J., Leal, M. R. L., & Driemeier, C. (2021). Inorganics in sugarcane bagasse and straw and their impacts for bioenergy and biorefining: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 148, 111268.

Nguyen, N. H., Suh, S. O., Marshall, C. J., & Blackwell, M. (2006). Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. *Mycological Research*, 110(10), 1232-1241.

Nguyen, N. H., Suh, S. O., & Blackwell, M. (2007). Five novel Candida species in insect-associated yeast clades isolated from Neuroptera and other insects. *Mycologia*, 99(6), 842-858.

Nielsen, F., Tomás-Pejó, E., Olsson, L., & Wallberg, O. (2015). Short-term adaptation during propagation improves the performance of xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous saccharification and co-fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 1-15.

Nundaeng, S., Suwannarach, N., Limtong, S., Khuna, S., Kumla, J., & Lumyong, S. (2021). An Updated Global Species Diversity and Phylogeny in the Genus *Wickerhamomyces* with Addition of Two New Species from Thailand. *Journal of Fungi,* 7(11), 957.

Nwaefuna, A. E., Rumbold, K., Boekhout, T., & Zhou, N. (2021). Bioethanolic yeasts from dung beetles: tapping the potential of extremophilic yeasts for improvement of lignocellulolytic feedstock fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 1-10.

Ochoa-Chacón, A., Martinez, A., Poggi-Varaldo, H. M., Villa-Tanaca, L., Ramos-Valdivia, A. C., & Ponce-Noyola, T. (2021). Xylose Metabolism in Bioethanol Production: *Saccharomyces cerevisiae* vs Non-Saccharomyces Yeasts. *BioEnergy Research*, 1-19.

Olsson, L., & Hahn-Hägerdal, B. (1996). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial technology*, 18(5), 312-331.

Opulente, D. A., Rollinson, E. J., Bernick-Roehr, C., Hulfachor, A. B., Rokas, A., Kurtzman, C. P., & Hittinger, C. T. (2018). Factors driving metabolic diversity in the budding yeast subphylum. *BMC biology*, 16(1), 1-15.

Özüdoğru, H. R., Nieder-Heitmann, M., Haigh, K. F., & Görgens, J. F. (2019). Techno-economic analysis of product biorefineries utilizing sugarcane lignocelluloses: Xylitol, citric acid and glutamic acid scenarios annexed to sugar mills with electricity co-production. *Industrial Crops and Products*, 133, 259-268.

Pacheco, T. F., Machado, B. R., de Morais Júnior, W. G., Almeida, J. R., & Gonçalves, S. B. (2021). Enhanced tolerance of *Spathaspora passalidarum* to sugarcane bagasse hydrolysate for ethanol production from xylose. *Applied biochemistry and biotechnology*, 193(7), 2182-2197.

Padilla, B., Gil, J. V., & Manzanares, P. (2018). Challenges of the non-conventional yeast *Wickerhamomyces anomalus* in winemaking. *Fermentation*, 4(3), 68.

Paidimuddala, B., & Gummadi, S. N. (2014). Bioconversion of non-detoxified hemicellulose hydrolysates to xylitol by halotolerant yeast *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413. *J. Microb. Biochem. Technol*, 6(6), 327-33.

Palacio-Mejía, J. D. (2013). Mis amigos los robles colombianos. http://biogenic-colombia.blogspot.com/2013/01/mis-amigos-los-robles-colombianos-por.html. Acceso 15 de Julio 2022.

Palma, M., Guerreiro, J. F., & Sá-Correia, I. (2018). Adaptive response and tolerance to acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*: a physiological genomics perspective. *Frontiers in Microbiology*, 9, 274.

Palladino, F., Rodrigues, R. C., Cadete, R. M., Barros, K. O., & Rosa, C. A. (2021). Novel potential yeast strains for the biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 15(3), 690-702.

Papini, M., Nookaew, I., Uhlén, M., & Nielsen, J. (2012). *Scheffersomyces stipitis*: a comparative systems biology study with the Crabtree positive yeast *Saccharomyces cerevisiae. Microbial Cell Factories*, 11(1), 136.

Pappu, S. M. J., & Gummadi, S. N. (2018). Effect of cosubstrate on xylitol production by *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413: A cybernetic modelling approach. *Process Biochemistry,* 69, 12-21.

Patinvoh, R. J., & Taherzadeh, M. J. (2019). Fermentation processes for second-generation biofuels. *In Second and Third Generation of Feedstocks* (pp. 241-272). Elsevier.

Patiño, M. A., Ortiz, J. P., Velásquez, M., & Stambuk, B. U. (2019). D-Xylose consumption by nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Yeast*, 36(9), 541-556.

Paul, S., & Dutta, A. (2018). Challenges and opportunities of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *Resources*, *Conservation and Recycling*, 130, 164-174.

Pfeiffer, T., & Morley, A. (2014). An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 1, 17.

Prakash, G., Varma, A. J., Prabhune, A., Shouche, Y., & Rao, M. (2011). Microbial production of xylitol from D-xylose and sugarcane bagasse hemicellulose using newly

isolated thermotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Bioresource Technology*, 102(3), 3304-3308.

Peña-Torres, J. (2016) Análisis florístico del bosque de roble (*Quercus humboldtii*) Bonpl.(*Fagaceae*) de la Reserva Protectora Forestal Quininí, municipio de Tibacuy, Cundinamarca. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Pérez-Escobar, O. A., Zizka, A., Bermúdez, M. A., Meseguer, A. S., Condamine, F. L., Hoorn, C., ... & Chomicki, G. (2022). The Andes through time: evolution and distribution of Andean floras. *Trends in Plant Science*, 22, 364-378.

Péter, G., Takashima, M., & Čadež, N. (2017). Yeast habitats: different but global. In *Yeasts in natural ecosystems: ecology* (pp. 39-71). Springer, Cham.

Pinheiro, T., Lip, K. Y. F., García-Ríos, E., Querol, A., Teixeira, J., van Gulik, W., ... & Domingues, L. (2020). Differential proteomic analysis by SWATH-MS unravels the most dominant mechanisms underlying yeast adaptation to non-optimal temperatures under anaerobic conditions. *Scientific Reports*, 10(1), 1-17.

Polburee, P., Lertwattanasakul, N., Limtong, P., Groenewald, M., & Limtong, S. (2017). *Nakazawaea todaengensis* fa, sp. nov., a yeast isolated from a peat swamp forest in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(7), 2377-2382.

Pulido, M. T., Cavelier, J., & Cortés, S. P. (2006). Structure and composition of Colombian montane oak forests. In *Ecology and conservation of neotropical montane oak forests* (pp. 141-151). Springer, Berlin, Heidelberg.

Qi, X., Zhang, Y., Tu, R., Lin, Y., Li, X. y Wang Q. (2011) High-throughput screening and characterization of xylose-utilizing, ethanol-tolerant thermophilic bacteria for bioethanol production. *Journal of Applied Microbiology*. 1584–1591.

Queiros, O., Casal, M., Althoff, S., Moradas-Ferreira, P., & Leao, C. (1998). Isolation and characterization of *Kluyveromyces marxianus* mutants deficient in malate transport. *Yeast*, 14(5), 401-407.

Quintas, C., Leyva, J. S., Sotoca, R., Loureiro-Dias, M. C., & Peinado, J. M. (2005). A model of the specific growth rate inhibition by weak acids in yeasts based on energy requirements. *International journal of food microbiology*, 100(1-3), 125-130.

Ramírez, C., & González, A. (1984). Five new filamentous, glucose-fermenting Candida isolated from decayed wood in the evergreen rainy Valdivian Forest of southern Chile. *Mycopathologia*, 88(2), 83-92.

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

Rao, L. V., Goli, J. K., Gentela, J., & Koti, S. (2016). Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: an overview. *Bioresource technology*, 213, 299-310.

Reyes, L. H., Almario, M. P., Winkler, J., Orozco, M. M., & Kao, K. C. (2012). Visualizing evolution in real time to determine the molecular mechanisms of n-butanol tolerance in *Escherichia coli*. *Metabolic engineering*, 14(5), 579-590.

RFA, *Renewable Fuels Association* (2022). Annual World Fuel Ethanol Production. https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production

Rincón, L. J., Agualimpia Valderrama, B. E., & Zafra, G. (2018). Differential protein profiles of the lipolytic yeast candida palmioleophila under different growth conditions. *Chemical Engineering Transactions*, 64.

Rivera Ospina, D., & Córdoba García, C. (1998). Guía ecológica Parque Natural Chicaque. Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mútis. http://www.chicaque.com/files/9413/6683/6794/Guia_Ecologica.PDF

Robledo-Márquez, K., Ramírez, V., González-Córdova, A. F., Ramírez-Rodríguez, Y., García-Ortega, L., & Trujillo, J. (2021). Research opportunities: Traditional fermented beverages in Mexico. Cultural, microbiological, chemical, and functional aspects. *Food Research International*, 147, 110482.

Rodionov, Y. V., Keppen, O. I., & Sukhacheva, M. V. (2002). A photometric assay for ethanol. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 38(4), 395-396.

Rodrigues, R. C. L. B., Felipe, M. G. A., Roberto, I. C., & Vitolo, M. (2003). Batch xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate at controlled pH values. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26(2), 103-107.

Rodríguez-Zapata, M. A., & Ruiz-Agudelo, C. A. (2021). Environmental liabilities in Colombia: A critical review of current status and challenges for a megadiverse country. *Environmental Challenges*, 5, 100377.

Romero, A. M., Mateo, J. J., & Maicas, S. (2012). Characterization of an ethanol-tolerant 1, 4-β-xylosidase produced by *Pichia membranifaciens*. *Letters in applied microbiology*, 55(5), 354-361.

Rossouw, D., & Bauer, F. F. (2016). Exploring the phenotypic space of non-*Saccharomyces* wine yeast biodiversity. *Food microbiology*, 55, 32-46.

Ruchala, J., & Sibirny, A. A. (2021). Pentose metabolism and conversion to biofuels and high-value chemicals in yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(4), fuaa069.

Saha, B. C., & Kennedy, G. J. (2020). Production of xylitol from mixed sugars of xylose and arabinose without co-producing arabitol. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101786.

Sahara, T., Goda, T., & Ohgiya, S. (2002). Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 50015-50021.

Saini, P., Beniwal, A., Kokkiligadda, A., & Vij, S. (2018). Response and tolerance of yeast to changing environmental stress during ethanol fermentation. *Process Biochemistry*, 72, 1-12.

Salamanca, J. A. M., & Escobar, J. G. R. (2016). Aproximación a la entomofaúna desde dos tipos de orquídeas con ubicación en la reserva de Quinini. *Folhmyp*, (6), 21-36.

Salgado, A. M., Folly, R. O. M., Valdman, B., Cos, O., & Valero, F. (2000). Colorimetric method for the determination of ethanol by flow injection analysis. *Biotechnology Letters*, 22(4), 327-330.

Santiago Benítez, A. J. (2017). Estudio de la regulación de D-xilosa Reductasa y Xilitol Deshidrogenasa en *Cryptococcus humicola* OJ-31 (Master's thesis, Tesis (MC)--Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Departamento de Biotecnología y Bioingeniería).

Santos, S. C., de Sousa, A. S., Dionísio, S. R., Tramontina, R., Ruller, R., Squina, F. M., ... & Ienczak, J. L. (2016). Bioethanol production by recycled *Scheffersomyces stipitis* in

sequential batch fermentations with high cell density using xylose and glucose mixture. *Bioresource technology*, 219, 319-329.

Sasano, Y., Watanabe, D., Ukibe, K., Inai, T., Ohtsu, I., Shimoi, H., & Takagi, H. (2012). Overexpression of the yeast transcription activator Msn2 confers furfural resistance and increases the initial fermentation rate in ethanol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(4), 451-455.

Schade, B., Jansen, G., Whiteway, M., Entian, K. D., & Thomas, D. Y. (2004). Cold adaptation in budding yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 15(12), 5492-5502.

Schröder, T., Lauven, L. P., & Geldermann, J. (2018). Improving biorefinery planning: Integration of spatial data using exact optimization nested in an evolutionary strategy. *European Journal of Operational Research*, 264(3), 1005-1019.

Sena LM, Morais CG, Lopes MR, Santos RO, Uetanabaro APT, Morais PB, Vital MJS, de Morais Jr MA, Lachance MA, Rosa CA. (2017) d-Xylose fermentation, xylitol production and xylanase activities by seven new species of *Sugiyamaella*. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 110: 53–67.

Shariq, M., & Sohail, M. (2019). Application of *Candida tropicalis* MK-160 for the production of xylanase and ethanol. *Journal of King Saud University-Science*, 31(4), 1189-1194.

Sharma, N. K., Behera, S., Arora, R., Kumar, S., & Sani, R. K. (2018). Xylose transport in yeast for lignocellulosic ethanol production: current status. *Journal of bioscience and bioengineering*, 125(3), 259-267.

Sharma, K., Khaire, K. C., Thakur, A., Moholkar, V. S., & Goyal, A. (2020). Acacia xylan as a substitute for commercially available xylan and its application in the production of xylooligosaccharides. *ACS omega*, 5(23), 13729-13738.

Silva, C. J. S. M., & Roberto, I. C. (2001). Improvement of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 previously adapted to rice straw hemicellulosic hydrolysate. *Letters in Applied Microbiology*, 32(4), 248-252.

Singh, N., Singhania, R. R., Nigam, P. S., Dong, C. D., Patel, A. K., & Puri, M. (2022). Global status of lignocellulosic biorefinery: Challenges and perspectives. *Bioresource Technology*, 344, 126415.

Soares, L. B., Bonan, C. I. D. G., Biazi, L. E., Dionísio, S. R., Bonatelli, M. L., Andrade, A. L. D., ... & Ienczak, J. L. (2020). Investigation of hemicellulosic hydrolysate inhibitor resistance

and fermentation strategies to overcome inhibition in non-saccharomyces species. Biomass and bioenergy, 137, 105549.

Soares, C. E., Bergmann, J. C., & de Almeida, J. R. M. (2021). Variable and dose dependent response of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts toward lignocellulosic hydrolysate inhibitors. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(2), 575-586.

Sousa, M., Duarte, A. M., Fernandes, T. R., Chaves, S. R., Pacheco, A., Leão, C., ... & Sousa, M. J. (2013). Genome-wide identification of genes involved in the positive and negative regulation of acetic acid-induced programmed cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC genomics*, 14(1), 1-15.

Souza, K. S. T., Gudiña, E. J., Schwan, R. F., Rodrigues, L. R., Dias, D. R., & Teixeira, J. A. (2018). Improvement of biosurfactant production by *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 and its potential application in bioremediation. *Journal of hazardous materials*, 346, 152-158.

Stiller, J. W., & Hall, B. D. (1997). The origin of red algae: implications for plastid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(9), 4520-4525.

Stuecker, T. N., Scholes, A. N., & Lewis, J. A. (2018). Linkage mapping of yeast cross protection connects gene expression variation to a higher-order organismal trait. *PLoS Genetics*, 14(4), e1007335

Suh, S. O., Marshall, C. J., Mchugh, J. V., & Blackwell, M. (2003). Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. *Molecular ecology*, 12(11), 3137-3145.

Suh, S. O., & Zhou, J. (2010). Yeasts associated with the curculionid beetle Xyloterinus politus: Candida xyloterini sp. nov., Candida palmyrensis sp. nov. and three common ambrosia yeasts. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 60(7), 1702-1708.

Sukpipat, W., Komeda, H., Prasertsan, P., & Asano, Y. (2017). Purification and characterization of xylitol dehydrogenase with L-arabitol dehydrogenase activity from the newly isolated pentose-fermenting yeast *Meyerozyma caribbica* 5XY2. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(1), 20–27.

Święciło, A. (2016). Cross-stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* yeast—new insight into an old phenomenon. *Cell Stress and Chaperones*, 21(2), 187-200.

Takagi, H. (2019). Metabolic regulatory mechanisms and physiological roles of functional amino acids and their applications in yeast. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 83(8), 1449-1462.

Takashima, M., Sugita, T., Shinoda, T., & Nakase, T. (2001). Reclassification of the *Cryptococcus humicola* complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(6), 2199-2210.

Tamburini, E., Costa, S., Marchetti, M. G., & Pedrini, P. (2015). Optimized production of xylitol from xylose using a hyper-acidophilic *Candida tropicalis*. *Biomolecules*, 5(3), 1979-1989.

Tomás-Pejó, E., & Olsson, L. (2015). Influence of the propagation strategy for obtaining robust *Saccharomyces cerevisiae* cells that efficiently co-ferment xylose and glucose in lignocellulosic hydrolysates. *Microbial biotechnology*, 8(6), 999-1005.

Tan, Y. S., Zhang, R. K., Liu, Z. H., Li, B. Z., & Yuan, Y. J. (2022). Microbial adaptation to enhance stress tolerance. *Frontiers in Microbiology*, 13.

Torija, M. J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2003). Effect of organic acids and nitrogen source on alcoholic fermentation: study of their buffering capacity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(4), 916-922.

Trichez, D., Steindorff, A. S., Soares, C. E., Formighieri, E. F., & Almeida, J. R. (2019). Physiological and comparative genomic analysis of new isolated yeasts *Spathaspora* sp. JA1 and *Meyerozyma caribbica* JA9 reveal insights into xylitol production. *FEMS yeast research*, 19(4), foz034.

Tse, T. J., Wiens, D. J., & Reaney, M. J. (2021). Production of bioethanol—A review of factors affecting ethanol yield. *Fermentation*, 7(4), 268.

Uddin, S., & Hadi, S. M. (1995). Reactions of furfural and methylfurfural with ADN. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 35(1), 185-195.

Ullah, A., Chandrasekaran, G., Brul, S., & Smits, G. J. (2013). Yeast adaptation to weak acids prevents futile energy expenditure. *Frontiers in microbiology*, 4, 142.

Umai D, Kayalvizhi R, Kumar V & Jacob S (2022). Xylitol: Bioproduction and Applications-A Review. *Frontiers in Sustainability*. 3:826190.

Urbina, H., & Blackwell, M. (2012). Multilocus phylogenetic study of the *Scheffersomyces* yeast clade and characterization of the N-terminal region of xylose reductase gene. *PloS one*, 7(6), e39128.

Urbina, H., Frank, R., & Blackwell, M. (2013). *Scheffersomyces cryptocercus*: a new xylose-fermenting yeast associated with the gut of wood roaches and new combinations in the *Sugiyamaella* yeast clade. *Mycologia*, 105(3), 650-660.

Valdés, G., Mendonça, R. T., Parra, C., & Aggelis, G. (2020). Patterns of lignocellulosic sugar assimilation and lipid production by newly isolated yeast strains from Chilean Valdivian forest. Applied Biochemistry and Biotechnology, 192(4), 1124-1146.

Valinhas, R. V., Pantoja, L. A., Maia, A. C. F., Miguel, M. G. C., Vanzela, A. P. F., Nelson, D. L., & Santos, A. S. (2018). Xylose fermentation to ethanol by new *Galactomyces geotrichum* and *Candida akabanensis* strains. PeerJ, 6, e4673.

Van Dijk, M., Erdei, B., Galbe, M., Nygård, Y., & Olsson, L. (2019). Strain-dependent variance in short-term adaptation effects of two xylose-fermenting strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource technology*, 292, 121922.

Verkleij G (2020). Fungal Biodiversity Centre (CBS) - Fungi strains. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute. Occurrence dataset https://doi.org/10.15468/giuq7w accessed via GBIF.org

Vylkova, S., Carman, A. J., Danhof, H. A., Collette, J. R., Zhou, H., & Lorenz, M. C. (2011). The fungal pathogen *Candida albicans* autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. *MBio*, 2(3), e00055-11.

Wagner, E., Myers, K. S., Riley, N. M., Coon, J. J., & Gasch, A. P. (2019). PKA and HOG signaling contribute separable roles to anaerobic xylose fermentation in yeast engineered for biofuel production. *PLoS ONE* 14(5), 1-19.

Wang, S., Li, H., Fan, X., Zhang, J., Tang, P., & Yuan, Q. (2015). Metabolic responses in *Candida tropicalis* to complex inhibitors during xylitol bioconversion. *Fungal Genetics and Biology*, 82, 1-8.

Wang, S., Zhou, Y., Luo, W., Deng, L., Yao, S., & Zeng, K. (2020). Primary metabolites analysis of induced citrus fruit disease resistance upon treatment with oligochitosan, salicylic acid and *Pichia membranaefaciens*. *Biological Control*, 148, 104289.

Wang, W. L., Sun, P. L., Kao, C. F., Li, W. T., Cheng, I. J., & Yu, P. H. (2021a). Disseminated Candidiasis and Candidemia Caused by *Candida palmioleophila* in a Green Sea Turtle (*Chelonia mydas*). *Animals*, 11(12), 3480.

Wang, F., Ouyang, D., Zhou, Z., Page, S. J., Liu, D., & Zhao, X. (2021b). Lignocellulosic biomass as sustainable feedstock and materials for power generation and energy storage. *Journal of Energy Chemistry*, 57, 247-280.

Watanabe, K., Tachibana, S., & Konishi, M. (2019). Modeling growth and fermentation inhibition during bioethanol production using component profiles obtained by performing comprehensive targeted and non-targeted analyses. *Bioresource Technology*, 281, 260-268.

WBA (2016). Global biomass potential towards 2035.World Bioenergy Association, Stockholm, Sweden. Recuperado de https://worldbioenergy.org/uploads/Factsheet_Biomass%20potential.pdf

West, T. P. (2021). Xylitol Production by Candida Species from Hydrolysates of Agricultural Residues and Grasses. *Fermentation*, 7(4), 243.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. L. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, 18(1), 315-322.

Wu, J., Hu, J., Zhao, S., He, M., Hu, G., Ge, X., & Peng, N. (2018). Single-cell protein and xylitol production by a novel yeast strain *Candida intermedia* FL023 from lignocellulosic hydrolysates and xylose. *Applied biochemistry and biotechnology*, 185(1), 163-178.

Yalçın, H. T., Fındık, B., Terzi, Y., Uyar, E., & Shatila, F. (2021). Isolation and molecular identification of industrially important enzyme producer yeasts from tree barks and fruits. *Archives of Microbiology*, 203(3), 1079-1088.

Yamakawa, C. K., Kastell, L., Mahler, M. R., Martinez, J. L., & Mussatto, S. I. (2020). Exploiting new biorefinery models using non-conventional yeasts and their implications for sustainability. *Bioresource technology*, 309, 123374.

Yan, W., Gao, H., Qian, X., Jiang, Y., Zhou, J., Dong, W., ... & Jiang, M. (2021). Biotechnological applications of the non-conventional yeast *Meyerozyma guilliermondii*. *Biotechnology Advances*, 46, 107674.

Yurkov, A., & Lachance, M. A. (Eds.). (2017). Yeasts in natural ecosystems: ecology. Springer.

Yurkov, A. M., Dlauchy, D., & Péter, G. (2017b). *Meyerozyma amylolytica* sp. nov. from temperate deciduous trees and the transfer of five Candida species to the genus *Meyerozyma*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 67(10), 3977-3981.

Yuvadetkun, P., Reungsang, A., & Boonmee, M. (2018). Comparison between free cells and immobilized cells of *Candida shehatae* in ethanol production from rice straw hydrolysate using repeated batch cultivation. *Renewable Energy*, 115, 634-640.

Zha, J., Yuwen, M., Qian, W., & Wu, X. (2021). Yeast-based biosynthesis of natural products from xylose. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 634919.

Zhang, M. M., Xiong, L., Tang, Y. J., Mehmood, M. A., Zhao, Z. K., Bai, F. W., & Zhao, X. Q. (2019). Enhanced acetic acid stress tolerance and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by modulating expression of the de novo purine biosynthesis genes. *Biotechnology for Biofuels*, 12(1), 116.

Zhang, B., Ren, L., Wang, H., Xu, D., Zeng, X., & Li, F. (2020a). Glycerol uptake and synthesis systems contribute to the osmotic tolerance of *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 140, 109641

Zhang, H., Deng, L., Yao, S., Ming, J., & Zeng, K. (2020). Optimization of a vacuum-drying protectants for the biocontrol agent *Pichia membranifaciens* and its influence on viability and efficacy. *Biological Control*, 142, 104155.

Zhang, P., Zhang, R., Sirisena, S., Gan, R., & Fang, Z. (2021). Beta-glucosidase activity of wine yeasts and its impacts on wine volatiles and phenolics: A mini-review. *Food Microbiology*, 100, 103859.

Zuza-Alves, D. L., Silva-Rocha, W. P., & Chaves, G. M. (2017). An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. *Frontiers in microbiology*, 8, 1927.

Anexo A. Agrupamiento molecular

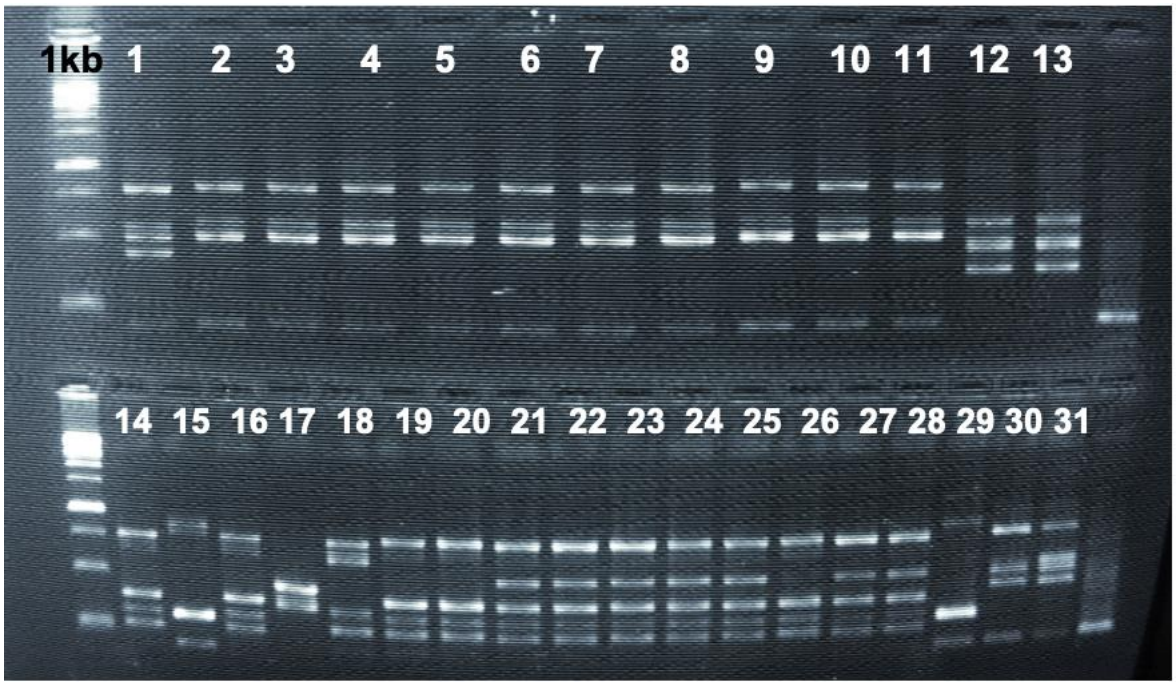


Figura A1. Producto de amplificación por PCR del ADN genómico en gel de agarosa 1.5%, usando el iniciador $(GTG)_5$ para la agrupación molecular de 31 aislados. Perfil A (1); perfil B (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 30, 31); perfil C (12,13); perfil D (14, 16); perfil E (15, 29); perfil F (16, 19, 20); perfil G (17); perfil H (18); perfil I (21, 22, 23, 24, 15, 27, 28); perfil J (26)

Anexo B. Método enzimático oxidasa-peroxidasa

El seguimiento de la reacción con patrones de etanol mostró el mejor grado de asociación lineal entre la concentración de etanol (de 0.5g·L^{-1} hasta 10.0 g·L^{-1}) y la absorbancia de la quinoneimina generada en la reacción (Figura B1a) durante 60min a 30°C.Los gráficos de residuales para tiempo de análisis de 60 min (Figura B1b) muestran el aumento en la variación de los residuos frente al valor estimado por la regresión a medida que aumenta la concentración. La distribución de los residuos evidencia la homocedasticidad en los datos ajustándose al modelo de regresión lineal.

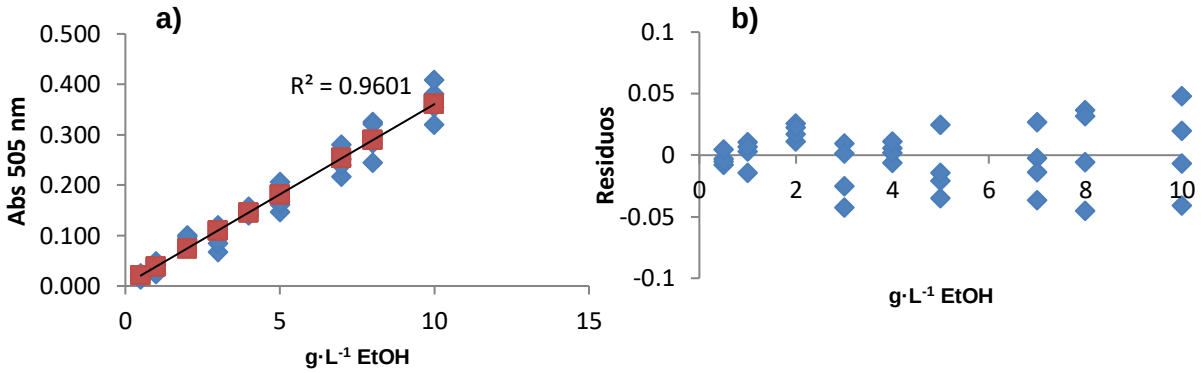


Figura B1. Ensayo enzimático oxidasa-peroxidasa; a) correlación entre la absorbancia y la concentración de etanol en el intervalo 0.5g·L^{-1} – 10.0 g·L^{-1}; b) gráfico de residuales para los valores obtenidos para la concentración de etanol (n=4).

Anexo C. Composición hidrolizados hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar

La producción de hidrolizados hemicelulósico a partir del bagazo de caña de azúcar fue realizado mediante tratamiento con ácido sulfúrico (100mg de ácido/g de materia seca) en un reactor de acero inoxidable en una relación solido/liquido de 1:10 a 120°C por 20 min. Después de la hidrólisis, el material sólido resultante se elimina por filtración. Todos fueron suplementados con extracto de levadura (10 g/L) y peptona (20 g/L) y su pH ajustado a 5.5.

Tabla C1. Composición de los hidrolizados hemicelulósicos de bagazo de caña de azúcar

Compuesto (g/L)	**Hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar**		
	50 %[a]	**75 %[b]**	**100 %[b]**
D-Xilosa	20.12	49.95*	52.97
L-Arabinosa	1.33	3.85	5.31
Glucosa	1.50	2.84	3.96
Ác. acético	3.02	4.54	6.16
HMF	0.04	0.05	0.07
Furfural	0.44	0.66	0.89

*****la D-xilosa fue ajustada ~ 50 g/L; a: Lote 1; b: Lote 2

Anexo D. Parámetros de crecimiento

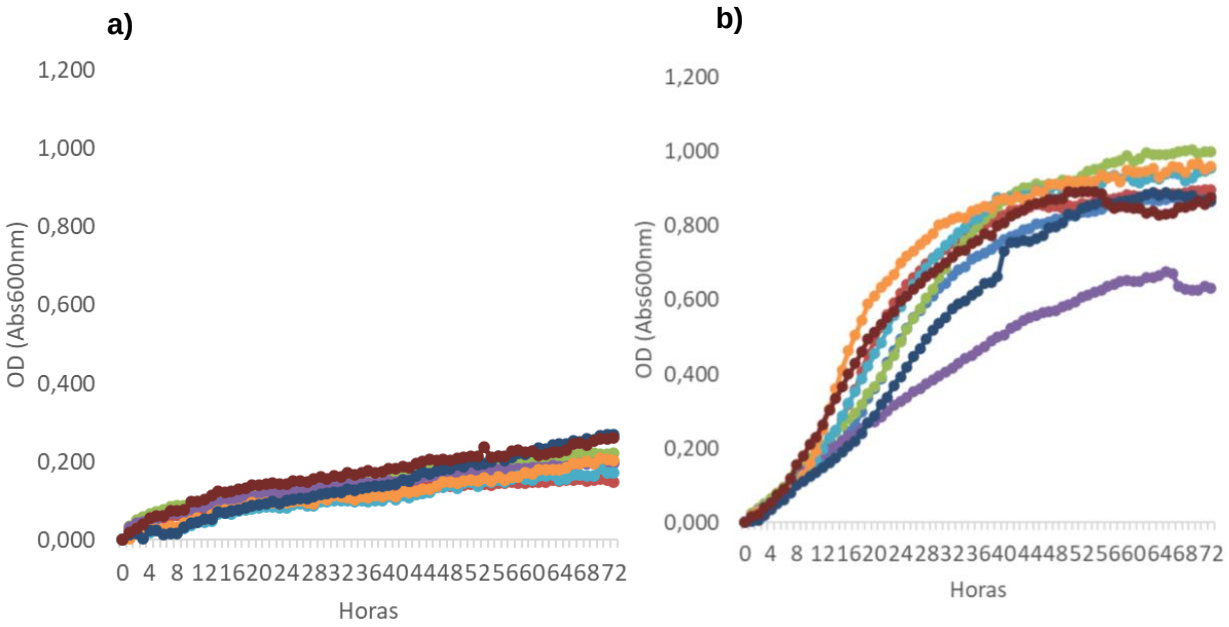


Figura D1. Curvas de crecimiento de levaduras aisladas en bosques de robles en **a**) medio con hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (50%) sin suplementar y **b**) medio con hidrolizado hemicelulósico de bagazo de caña de azúcar diluido (50%) suplementado con extracto de levadura 1% y peptona 2%.

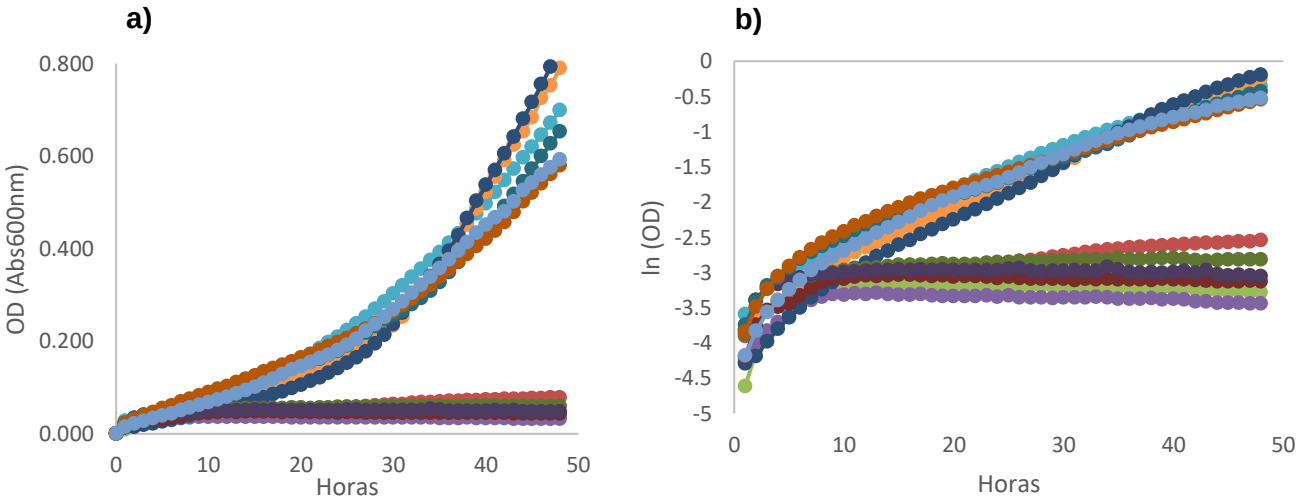


Figura D2. Tasa de crecimiento específica máxima (μ_{max}) de levaduras determinada a partir de **a**) la gráfica de densidad óptica versus tiempo por **b**) regresión lineal en la fase de crecimiento exponencial.

$$\mu max = \frac{\ln(OD)\,2 - \ln(OD)\,1}{t2 - t1}$$

Anexo E. Lista de linajes de la colección IBUN-UNAL aislados de ambientes fermentativos

Tabla E1. Crecimiento en glucosa y D-xilosa de aislados de la colección del banco de Cepas y Genes IBUN-UNAL

LINAJE	Código Colección	Crecimiento Medio Sólido (1% glucosa)	Crecimiento Medio Sólido (1% D-xilosa)	Crecimiento Medio Líquido (2% D-xilosa)
105-14	IBUN-090-03513	+	+	+
104-2	IBUN-090-03502	+	+	+
112-2	IBUN-090-03545	+	+	+
113-3	IBUN-090-03558	+	+	+
116-2	IBUN-090-03564	-	-	NC
116-3	IBUN-090-03565	+	+	+
116-5	IBUN-090-03567	+	+	+
116-4	IBUN-090-03566	+	+	+
108-5	IBUN-090-03526	+	+	+
118-2	IBUN-090-03577	+	+/-	-
118-3	IBUN-090-03578	+	+/-	-
118-4	IBUN-090-03579	+	+/-	-
106-1	IBUN-090-03515	+	+/-	-
107-2	IBUN-090-03520	+	+/-	-
205-7	IBUN-090-03619	+	+/-	+/-
109-4	IBUN-090-03530	+	+/-	-
109-7	IBUN-090-03533	+	+/-	-
205-6	IBUN-090-03618	+	-	NC
208-7	IBUN-090-03638	+	+/-	-
209-1	IBUN-090-03639	+	+/-	-
214-5	IBUN-090-03674	+	-	NC
205-1	IBUN-090-03614	+	+	+/-
206-2	IBUN-090-03622	+	+/-	+/-
206-5	IBUN-090-03625	+	+	+

LINAJE	Código Colección	Crecimiento Medio Sólido (1% glucosa)	Medio Sólido (1% D-xilosa)	Medio Líquido (2% D-xilosa)
206-8	IBUN-090-03628	+	+/-	-
209-4	IBUN-090-03642	+	+	+
210-4	IBUN-090-03647	+/-	-	NC
212-4	IBUN-090-03655	+	+/-	-
208-6	IBUN-090-03637	+	-	NC
211-3	IBUN-090-03648	+	+	+/-
211-4	IBUN-090-03649	+	-	NC
211-6	IBUN-090-03651	+	-	NC
211-7	IBUN-090-03652	+	+/-	+/-
213-5	IBUN-090-03664	+	+	+/-
216-2	IBUN-090-03681	+	-	NC
207-8	IBUN-090-03634	+	-	NC
204-4	IBUN-090-03613	+	-	NC
203-3	IBUN-090-03605	+	+	+/-
203-4	IBUN-090-03606	+	-	NC
120-12	IBUN-090-03594	+	+	+
120-10	IBUN-090-03592	+	+/-	-
109-10	IBUN-090-03536	+	+	+/-
114-1	IBUN-090-03561	+	+/-	-
120-2	IBUN-090-03585	+/-	-	NC
120-3	IBUN-090-03586	+	+/-	-
120-5	IBUN-090-03588	+	+	+/-
120-9	IBUN-090-03591	+	+/-	-
120-13	IBUN-090-03595	+/-	-	NC
120-14	IBUN-090-03596	+	+	+
120-15	IBUN-090-03597	+/-	-	NC

NC=No cultivado

Anexo F. Fenotipaje de levaduras no-convencionales en ácidos orgánicos

La tolerancia a condiciones ácidas para linajes productores de xilitol y etanol se evaluó en cuatro ácidos orgánicos en concentración baja, intermedia y alta. El ácido acético (pKa:4.75) y ácido fórmico (pKa: 3.75) son generados en el proceso de hidrólisis de la biomasa lignocelulósica. El ácido tartárico (pKa_1:4.37) es un compuesto que se encuentra en las uvas siendo el ácido predominante cerca de la madurez (Mendes & Mendes-Faia, 2020). Por último, el ácido ascórbico (pKa_1:4.17) es un antioxidante que ha sido implementado para mejor la tolerancia al estrés oxidativo en levaduras (Li et al., 2014).

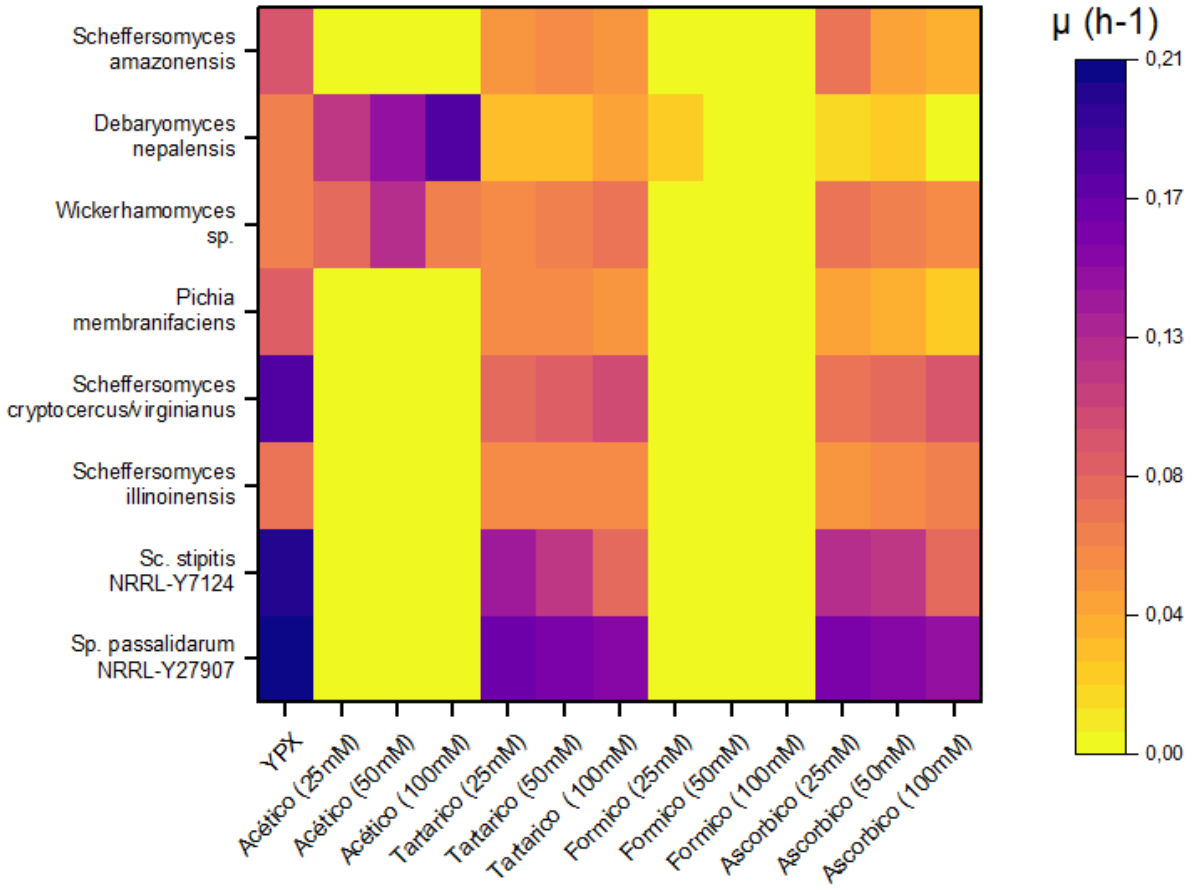


Figura F1. *Heatmap* de fenotipaje de levaduras productoras de xilitol (*Sc. amazonensis* (Qn22.1X), *D. nepalensis* (Qn6.3Xn) y *Wickerhamomyces* sp. (CQ16.3Xn)) y etanol (*P. membranifaciens* (CQ7.1X); *Sc. cryptocercus/Sc. virginianus* (Qn8.1X); *Sc. illinoinensis* (CQ6.1Xn), *Sp. stipitis* (NRRL-Y7124) y *Sp. passaliadarum* (NRRL-Y 27907)) en presencia de ácidos orgánicos en tres diferentes concentraciones, en medio YPX-5% y pH 5.5.

Anexo G. Parámetros de fermentación

El perfil fermentativo de las levaduras fue evaluado a partir del cálculo de los parámetros de fermentación.

Productividad volumétrica

$Qp = \frac{Pf-P0}{tf-t0}$, en donde P_f y P_0 es la concentración del metabolito de interés (xilitol o etanol) en los tiempos de fermentación final e inicial, t_f y t_0, respectivamente.

Rendimiento del producto

$Yp/s = \frac{Pf-P0}{S0-Sf}$, en donde P_f y P_0 es la concentración del metabolito de interés (xilitol o etanol) en los tiempos de fermentación final e inicial, y S_0 y S_f, se refieren a la concentración de xilosa en los tiempos de fermentación inicial y final.

Rendimiento biomasa

$Yx/s = \frac{Xf-X0}{S0-Sf}$, en donde X_f y X_0 es la concentración de biomasa en los tiempos de fermentación final e inicial, y S_0 y S_f, se refieren a la concentración de xilosa en los tiempos de fermentación inicial y final.

Eficiencia

$\eta\ (\%) = \frac{Yp/s(\exp)}{Yp/s\ (teor)} * 100$, en donde $Y_{p/s(exp)}$ es el rendimiento del producto (xilitol o etanol) experimental, y $Y_{p/s(teor)}$ el rendimiento teórico máximo del producto.

La eficiencia en la producción de etanol fue calculada a partir de rendimiento teórico de 0.51g de etanol/g de xilosa (Olsson & Hahn-Hägerdal, 1996)

La eficiencia en la producción de xilitol fue calculada a partir de rendimiento teórico de 0.917g de xilitol/g de xilosa (Barbosa et al., 1988)

Tabla G1. Parámetros de fermentación de las levaduras *M. caribbica* (IBUN-090-03558) y *C. tropicalis* (IBUN-090-03565) en medio YPX y medio YPX suplementado con ácido acético 2 g/L. (1 g/L de inóculo)

Especie	Inóculo (Temp.)	Tiempo (h)	Consumo Ác. Acét. (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/L.h)	η (%)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)
YPX (condición control)									
M. caribbica (IBUN-03558)	30°C	72	0.00	0.13	0.76	0.37	83	ND	0.22±0.05
		96	0.00	0.11	0.76	0.37	83	ND	0.15±0.08
		113	0.00	0.14	0.74	0.31	81	ND	0.06±0.03
C. tropicalis (IBUN-03565)	30°C	72	0.00	0.14	0.56	0.32	61	2.66±0.09	1.65±0.03
		96	0.00	0.17	0.52	0.25	57	2.86±0.27	1.81±0.09
		113	0.00	0.18	0.51	0.21	56	2.07±0.24	1.74±0.11
YPX (Ácido acético 2 g/L)									
M. caribbica (IBUN-03558)	10°C	72	1.43±0,08	0.13	0.75	0.32	82	ND	0.51±0.03
		96	1.64±0,13	0.12	0.72	0.31	78	ND	0.74±0.02
		113	1.76±0,08	0.12	0.70	0.29	76	ND	0.90±0.04
	30°C	72	1.56±0.26	0.15	0.75	0.31	82	ND	0.39±0.13
		96	1.80±0.22	0.13	0.73	0.30	80	ND	0.52±0.10
		113	1.84±0.20	0.12	0.71	0.29	78	ND	0.63±0.17
	37°C	72	1.31±0.20	0.13	0.74	0.31	81	ND	0.57±0.23
		96	1.38±0.26	0.12	0.72	0.31	79	ND	0.83±0.49
		113	1.48±0.21	0.13	0.71	0.29	77	ND	1.00±0.28
C. tropicalis (IBUN-03565)	10°C	72	0.10±0.05	0.10	0.53	0.34	58	2.76±0.25	2.26±0.04
		96	0.19±0.03	0.15	0.51	0.25	56	1.73±0.28	2.40±0.02
		113	1.12±0.06	0.15	0.51	0.21	55	1.38±0.13	2.30±0.10
	30°C	72	1.15±0.25	0.10	0.55	0.34	60	2.58±0.40	2.17±0.25
		96	2.95±0.32	0.14	0.52	0.26	57	2.06±0.19	2.40±0.39
		113	2.56±0.16	0.15	0.52	0.22	57	1.31±0.36	2.38±0.38
	37°C	72	1.40±0.35	0.13	0.55	0.32	60	2.72±0.22	1.83±0.09
		96	1.63±0.33	0.14	0.52	0.26	57	2.45±0.33	2.08±0.13
		113	1.61±0.32	0.16	0.53	0.22	58	1.62±0.37	2.10±0.26

ND= No detectado