

Universidad Politécnica del Estado de Morelos



**Evaluación del crecimiento de la levadura
oleaginosa *Clavispora lusitaniae* Hi2 y la producción
de lípidos en un medio de cultivo formulado a partir
de residuos agroindustriales.**

T e s i s

Que para obtener el grado de:

Maestro (a) en Ciencias en Biotecnología

P r e s e n t a

IBT. Aime Frida Moran Mejía

**Director de tesis
Dr. Luis Gerardo Treviño Quintanilla
Codirectora**



DIRECCIÓN DE POSGRADOS Y EDUCACIÓN CONTINUA

Jiutepec, Morelos a 20 de enero de 2020.

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS

Una vez revisada la tesis “Evaluación del crecimiento de la levadura oleaginosa *Clavispora lusitanae* Hi2 y la producción de lípidos en un medio de cultivo formulado a partir de residuos agroindustriales”, presentada por la estudiante Aime Frida Moran Mejía, la comisión revisora acordó que el documento cubre los requisitos de forma y fondo de una tesis de maestría, por lo tanto, se autoriza proceder con la impresión.

A continuación, se presentan las firmas de los integrantes de la comisión revisora, destacando como Director de la Tesis al **Dr. Luis Gerardo Treviño Quintanilla** y como Codirectora a la **Dra. Liliana García Sánchez**.

DR. LUIS GERARDO TREVIÑO QUINTANILLA
DIRECTOR
Cédula Profesional: 5914625

DRA. LILIANA GARCÍA SÁNCHEZ
CODIRECTORA
Cédula Profesional: 10202098

DRA. ROSA ANGÉLICA GUILLÉN GARCÉS
VOCAL 1
Cédula Profesional: 5925448

DRA. SANDRA MORALES ARRIETA
VOCAL 2
Cédula Profesional: 6051484

DRA. MARCELA AYALA ACEVES
VOCAL 3
Cédula Profesional: 3832556

MTRO. JONATHAN ORTUÑO TRIANA
RESPONSABLE DE LA DIRECCIÓN DE POSGRADO Y
EDUCACIÓN CONTINUA
Cédula Profesional: 10959684

c.c.p. Dirección de Posgrado y Educación Continua

El contenido de la tesis es responsabilidad del sustentante.

DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico con mucho amor y cariño a mis padres, **María Félix Mejía Almazán** y **Juan Carlos Moran Rodríguez**, por ser los principales promotores de mis sueños, por confiar y creer en mis expectativas, por los consejos, por haberme forjado con valores y principios que me han hecho la persona que soy. Gracias por inculcar en mí el ejemplo del esfuerzo y la valentía de no temer las adversidades porque Dios está conmigo siempre. Ustedes fueron los pilares de este proyecto y de no haber sido por su apoyo, su estímulo y su inquebrantable confianza en mí, jamás habría llegado a la cima, ha sido un orgullo y privilegio ser su hija, por eso con gratitud permanente, emoción y respeto hoy les digo nuevamente ¡Lo hemos logrado!.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente agradezco a **DIOS** por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida, además de bendecirme durante todo mi camino, darme fuerzas y salud para lograr mis objetivos.

Agradezco al **Dr. Treviño Quintanilla** por la confianza depositada en mí para la ejecución de la presente tesis, por su orientación en el tema, por toda la paciencia que ha tenido conmigo, por brindarme su conocimiento científico, su apoyo y su tiempo.

También agradezco a **CONACYT** por el apoyo económico que me brinda.

Agradezco a la **Universidad Politécnica del Estado de Morelos** por abrirme las puertas para realizar este reto que trajo para mí grandes satisfacciones en lo profesional y personal al obtener otro nivel de estudios.

Agradezco a mis asesores de tesis, **Dra. Marcela Ayala, Dra. Rosa Angelica Guillen, Dra. Liliana García y Dra. Sandra Morales** por brindarme su apoyo y conocimiento durante la elaboración de este proyecto, por su asistencia a todos mis tutoriales y retroalimentarme con sus preguntas y consejos.

Agradezco el gran apoyo incondicional de mi Mamá, **María Félix Mejía Almazán**, que a pesar de las situaciones que pasamos siempre estuvo de pie, fuerte y apoyándome en todo, TE AMO MUCHO MA!!!, gracias por todo el sacrificio de estos años.

Agradezco a mi papá, **Juan Carlos Moran Rodríguez**, por su apoyo incondicional en todo momento, por creer siempre en mí, por tu amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, además gracias por todos tus regaños y consejos.

Papas gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy, ha sido un privilegio ser su hija.

Agradezco a mi hermana **Aida Johana Moran Mejía** por estar siempre apoyándome y aconsejándome incondicionalmente, he aprendido mucho de ti y a pesar de que ya no estamos tanto tiempo juntas siempre siento tu apoyo, cada vez que te veo se recarga mi alma de alegría, gracias por todo tu amor brindado por los ánimos que siempre me das.

A mi hermanita; **Regina Jordana Martínez Lázaro**, por ser la personita que siempre alegra mis días haciéndome recordar lo divertido que es ser niña.

A mis amigos; **Itzel, Aurora, Tere, Ivonne, Cheli, Borja, Lupita, Vero, Gabi, Maggie, Itxel Coctecon, Tolentino, Uriel y Jorge** por compartir momentos maravillosos y estar siempre apoyándome, por su cariño y su amistad.

Agradezco a mis tíos, **Humberto Morán y Carmen Gómez**, por su amor, apoyo y consejos proporcionados en todo momento. Gracias por estar conmigo y por extender su mano en momentos difíciles.

Agradezco a **Thalía Oseguera** por su apoyo y conocimiento brindando en el laboratorio, además por su gran amistad y por hacer cada día más divertido poniéndome la canción del día.

Agradezco a **Jorge Román** por su apoyo para el desarrollo de este proyecto, además de brindarme su estimada amistad.

Agradezco a **Cristian Landa, Estefany Vázquez, Anna Lemus, Isabel** por su amistad y apoyo en el laboratorio.

Agradezco a **Juan Colin, Nancy y Juan Alcántara** por su apoyo proporcionado en los laboratorios además de su estimada amistad.

Agradezco a los **Doctores Jesús Hernández, Manuel Carrillo, Inés Chaves y José Luis Rivera** por transmitirme su conocimiento y asesorarme con mis dudas, por estar presente en todos mis seminarios y retroalimentarme con sus preguntas.

Agradezco a **Yuleni Cabrera** por su gran amistad y apoyo incondicional. Gracias por ser como de la familia, por cuidar y preocuparte de mí en todos los momentos, por alimentarme con tus hotcakes y sobre todo por el apoyo en los momentos más difíciles.

Agradezco a la **Doctora Olga Cruz** por su apoyo y paciencia brindada en los tramites durante el desarrollo de la maestría, además de su gran amistad y consejos proporcionados.

Agradezco a **Isaac Torres** por su amistad, por ser una gran persona y brindarme tu apoyo, además por amar a mi persona favorita, pero me caes mal por llevártela.

Agradezco a **Edwin Ortiz** por su apoyo y amistad incondicional, por el conocimiento proporcionado y agradezco que nos encontráramos de nuevo porque eres una gran persona y nos faltan muchas choco-aventuras por vivir.

Agradezco a **Anna Valdivieso** por su apoyo y amistad incondicional, han sido 4 meses con grandes experiencias y a pesar de conocernos poco tiempo ya te considero una gran amiga!.

RESUMEN

Los aceites microbianos unicelulares obtenidos a partir de microorganismos oleaginosos se consideran como una alternativa sustentable a los aceites vegetales para la producción de biodiésel, utilizando para su producción medios de cultivo elaborados a partir de residuos lignocelulósicos. En el presente trabajo se evaluó el crecimiento de la levadura oleaginosa *Clavispora lusitaniae* Hi2 y la producción de lípidos, al cultivarla en medios formulados a partir de los residuos nejayote y bagazo de caña de azúcar.

Se caracterizaron las propiedades nutricionales del nejayote centrifugado (NC), hidrolizado del sólido de nejayote (HSN) e hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (HBC), cuantificando azúcares reductores, carbohidratos totales, almidón, proteína y nitrógeno total; se formularon medios de cultivo binarios en relaciones 25:75, 50:50 y 75:25 y se realizaron cinéticas de crecimiento de *Clavispora lusitaniae* Hi2 en minireactores BioSan, al término de cada cinética se determinó la concentración de biomasa, lípidos y consumo de azúcares reductores.

Los medios formulados a partir de NC:HSN presentaron la mejor producción de biomasa y lípidos a las 20 h de incubación, con una producción de biomasa de 5.60 ± 0.28 g/L y de lípidos de 0.99 ± 0.09 g/L, con las relaciones 25:75 y 50:50, respectivamente.

La utilización de los hidrolizado de nejayote y bagazo de caña de azúcar como medio de cultivo para el crecimiento de *Clavispora lusitaniae* Hi2 es una alternativa para aprovechar estos residuos agroindustriales para generar compuestos biotecnológicos de interés comercial.

ABSTRACT

The single cell oil obtain to oleaginous microorganism is considered like sustainable alternative that a vegetables oils to biodiesel production, using for its production culture medium elaborate to lignocellulosic waste. In these work it was evaluated the grow of oleaginous yeast *Clavispora lusitaniae* Hi2 and the lipid production when grown in mediums formulate to of nejayote and sugarcane bagasse waste.

The nutrition properties of centrifuged nejayote (NC), hydrolyzate of nejayote solid (HSN) and sugarcane bagasse hydrolyzate (HBC) was characterized, quantifying reducing sugars, total carbohydrates, starch, protein and total nitrogen; it was formulated binary culture medium in relation 25:75, 50:50 y 75:25 and it has been made the growth kinetic of *Clavispora lusitaniae* Hi2 in BioSan minireactors, in the end of which kinetic it was determinate the biomass, lipid and consumption of reducing sugar concentration.

The medium formulated from NC:HSN presented the best production of biomass and lipid at 20 h of incubation, with a production of biomass of 5.60 ± 0.28 g/L and of lipid of 0.99 ± 0.09 g/L, with the relation 25:75 y 50:50, respectively.

The utilization of nejayote and sugarcane bagasse hydrolyzate like a culture medium to the grow of *Clavispora lusitaniae* Hi2 is an alternative to approach these agroindustrial waste to generated biotechnology compounds of commercial interest.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Producción de biodiésel en México (Tapia & Valadez, 2017).....	9
Figura 2. Esquema del proceso productivo del aceite refinado (Ganduglia <i>et al.</i> , 2009).	10
Figura 3. Reacción de transesterificación para la obtención de biodiésel (Ganduglia <i>et al.</i> , 2009).....	11
Figura 4. Generación y acumulación de lípidos en microorganismos oleaginosos.	12
Figura 5. Micrografía de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en brotación (Tortora <i>et al.</i> , 2016).....	13
Figura 6. Variabilidad en la morfología de las levaduras (Tortora <i>et al.</i> , 2016).....	14
Figura 7. Morfología del grano de maíz (Nansa, 2012).	18
Figura 8. Participación estatal con respecto al nacional de producción de caña de azúcar molida (CONADESUCA, 2015)	23
Figura 9. Estrategia experimental general desarrollada en el presente proyecto.	30
Figura 10. Concentración de azúcares reductores obtenidas del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar evaluando la relación 1:10 (1 y 2) y 1:5 (3 y 4) g bagazo: mL HCl al 0.7% y el tiempo de 30 (1 y 3) y 60 (2 y 4) min en el proceso de hidrólisis.	39
Figura 11. Concentración de azúcares reductores obtenidas del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar evaluando la relación 1:5 (1 y 2) y 1:15 (3 y 4) g bagazo: mL HCl al 2.5% y el tiempo de 30 (1 y 3) y 60 (2 y 4) min en el proceso de hidrólisis.	40
Figura 12. Cinéticas de crecimiento de la levadura <i>Clavispora lusitaniae</i> Hi2 en los medios de cultivo formulados a partir de los hidrolizado del sólido de nejayote (HSN) e hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (HBC), evaluadas en minireactor RTS BioSan durante 20 h a 30°C.....	42
Figura 13. Cinéticas de crecimiento de la levadura <i>Clavispora lusitaniae</i> Hi2 en los medios de cultivo formulados a partir de los hidrolizado de bagazo de caña (HBC) y nejayote centrifugado (NC), evaluadas en minireactor RTS BioSan durante 20 h a 30°C.	43

Figura 14. Cinéticas y velocidades de crecimiento de la levadura *Clavispora lusitaniae* Hi2 en los medios de cultivo formulados a partir de nejayote centrifugado (NC) e hidrolizado del sólido de nejayote (HSN), evaluadas en minireactor RTS BioSan durante 20 h a 30°C. .44

Figura 15. Gráficos ternarios del comportamiento de la variable de biomasa, utilizando hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (HBC), hidrolizado del sólido de nejayote (HSN) y nejayote centrifugado (NC) como medio de cultivo para *Clavispora lusitaniae* Hi2. El área roja en los gráficos ternarios significa la mejor respuesta posible de la variable buscada en el proceso.....46

Figura 16. Gráfico ternario del comportamiento de la variable lípidos (g/L), utilizando hidrolizado de bagazo de caña de azúcar, hidrolizado del sólido de nejayote y nejayote centrifugado como medio de cultivo para *Clavispora lusitaniae* Hi2. El área roja en los gráficos ternarios significa la mejor respuesta posible de la variable buscada en el proceso.47

Figura 17. Gráficos ternarios del comportamiento de la variable de lípidos por biomasa seca (%), utilizando hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (HBC), hidrolizado del sólido de nejayote (HSN) y nejayote centrifugado (NC) como medio de cultivo para *Clavispora lusitaniae* Hi2. El área roja en los gráficos ternarios significa la mejor respuesta posible de la variable buscada en el proceso.47

Figura 18. Cinética de crecimiento de la levadura *Clavispora lusitaniae* Hi2 en los medios formulados por la combinación de nejayote centrifugado (NC), hidrolizado de los sólidos de nejayote (HSN), hidrolizados de bagazo de caña (HBC) y sus combinaciones. ...48

Figura 19. Cinética de crecimiento de la levadura *Clavispora lusitaniae* Hi2 en los medios formulados a partir de nejayote centrifugado (NC), hidrolizado de los sólidos de nejayote (HSN) e hidrolizado de bagazo de caña (HBC) y combinaciones de NC:HSN, durante 50 horas a 30°C.....50

Figura 20. Demanda química de oxígeno durante el crecimiento de *Clavispora lusitaniae* Hi2 en los medios de nejayote centrifugado (NC), hidrolizado del sólido de nejayote (HSN), hidrolizado de bagazo de caña (HBC), NC:HSN 25:75, NC HSN 50:50 y NC:HSN 75:25 durante 240 h.....53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales aplicaciones de fracciones de petróleo (Reyes Torres, 1999).	4
Tabla 2. Composición de ácidos grasos de diferentes aceites vegetales (Beopoulos <i>et al.</i> , 2011).....	8
Tabla 3. Composición química de las principales partes de los granos de maíz (FAO, 1992)	19
Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas del nejayote (Hernández Martínez , 2014).....	21
Tabla 5. Condiciones utilizadas para el proceso de nixtamalización (Hernández Martínez, 2014).....	26
Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas del nejayote (Hernández Martínez, 2014).	26
Tabla 7. Consumo de azúcares reductores, nitrógeno total y producción de lípidos (% en peso seco) de las cepas Hi2 y FACHp en medio de nejayote y en medio limitado en nitrógeno (Hernández Martínez, 2014).	27
Tabla 8. Experimento 1: Parámetros evaluados en la hidrólisis	32
Tabla 9. Experimento 2: Parámetros evaluados en la hidrólisis	32
Tabla 10. Tamizado del bagazo de caña de azúcar.....	38
Tabla 11. Concentración de azúcares reductores en diferentes tratamientos del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar.....	39
Tabla 12. Concentración de azúcares reductores (AR) en diferentes tratamientos del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar.....	40
Tabla 13. Propiedades nutricionales del nejayote centrifugado (NC), hidrolizado del sólido de nejayote (HSN) e hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (HBC).....	41
Tabla 14. Propiedades nutricionales del hidrolizado del sólido de nejayote (HSN) e hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (HBC) (g de propiedad/ g de sustrato).....	41
Tabla 15. Producción de biomasa, lípidos y consumo de azúcares reductores a las 20 h de crecimiento de <i>Clavispora lusitaniae</i> Hi2 en los diferentes medios formulados. En la tabla se incluye el análisis estadístico de los resultados de biomasa y lípidos para establecer si existen diferencias significativas entre los tratamientos realizados.	45
Tabla 16 Producción de biomasa, lípidos y consumo de azúcares reductores (AR). ...	49
Tabla 17. Concentraciones de azúcares reductores (AR) y nitrógeno total de los medios formulados y su relación carbono:nitrógeno.	51

Tabla 18 Producción de biomasa, lípidos y consumo de azúcares reductores de la levadura <i>Clavispora lusitaniae</i> Hi2 durante 240 horas de incubación.....	52
Tabla 19. Comparación del contenido lipídico por biomasa seca de cepas de <i>Candida</i>	56
Tabla 20. Comparación de biomasa y lípidos obtenidos en este trabajo con los ya reportados	57
Tabla 21 Relación carbono: nitrógeno (C:N), velocidad de crecimiento (μ) y biomasa evaluados en la cinética de <i>Clavispora lusitaniae</i> Hi2 durante 12 h en diferentes medios. ...	69
Tabla 22 Relación carbono: nitrógeno (C:N), velocidad de crecimiento (μ) y biomasa evaluados en la cinética de <i>Clavispora lusitaniae</i> Hi2 durante 12 h en medios formulados por NC y suplementado con diferentes fuentes de nitrógeno.	70

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABLAS	XI
INDICE GENERAL.....	XIII
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO.....	3
1.1 Introducción.....	3
1.1.1 Combustibles fósiles.....	3
1.1.2 Petróleo	4
1.1.3 Impacto ambiental por el uso de combustibles fósiles.....	5
1.1.4 Biocombustibles	7
1.1.4.1 Biodiésel.....	8
1.1.5 Microorganismos oleaginosos.....	11
1.1.6 Generalidades de las levaduras.....	12
1.1.7 Levaduras oleaginosas.....	15
1.1.8 Residuos agroindustriales	15
1.1.8.1 Generalidades del maíz.....	17
1.1.8.1.1 Nixtamalización.....	19
1.1.8.1.2 El nejayote como fuente de carbono para procesos biotecnológicos.....	21
1.1.8.2 Generalidades de la caña de azúcar	22
1.1.8.2.1 El bagazo de caña como materia prima para procesos biotecnológicos.....	24
1.2 Planteamiento del problema	25
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	26
2.1 Antecedentes.....	26
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	28

3.1	Justificación	28
3.2	Hipótesis.....	29
3.3	Objetivos	29
3.3.1	Objetivo general	29
3.3.2	Objetivos específicos.....	29
CAPÍTULO 4.	METODOLOGÍA	30
4.1	Materiales.....	31
4.2	Métodos.....	32
4.2.1	Preparación del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar	32
4.2.2	Proceso de nixtamalización	33
4.2.3	Preparación del hidrolizado del sólido de nejayote	33
4.2.4	Caracterización del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar, hidrolizado del sólido de nejayote y nejayote centrifugado.....	34
4.2.4.1	Cuantificación de azúcares reductores (técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico)...	34
4.2.4.2	Cuantificación de carbohidratos totales (técnica del fenol-ácido sulfúrico)	34
4.2.4.3	Cuantificación de almidón (técnica con yodo).....	35
4.2.4.4	Cuantificación de nitrógeno total	35
4.2.5	Cuantificación de proteínas.....	36
4.2.6	Formulación de medios de cultivo y evaluación del crecimiento de la levadura <i>Clavispora lusitaniae</i> Hi2	36
4.2.7	Extracción y cuantificación de los lípidos acumulados por la levadura oleaginosas <i>Clavispora lusitaniae</i> Hi2 en las formulaciones de medios seleccionadas.....	36
CAPÍTULO 5.	RESULTADOS.....	38
5.1	Tamizaje del bagazo de caña de azúcar.....	38
5.2	Hidrolizado del bagazo de caña de azúcar	38
5.3	Caracterización nutricional de los sustratos	40
5.4	Crecimiento de la levadura <i>Clavispora lusitaniae</i> Hi2 en los medios formulados a partir de los hidrolizados durante 20 horas de incubación en minireactores BioSan.....	41
5.5	Evaluación de crecimiento de la levadura <i>Clavispora lusitaniae</i> Hi2 en los medios formulados a partir de los hidrolizados durante 72 horas de incubación	48

5.6 Evaluación de crecimiento de la levadura <i>Clavispora lusitaniae</i> Hi2 en los medios formulados a partir de los hidrolizados durante 240 horas de incubación	50
CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN.....	54
6.1 Caracterización de los nutrientes de los sustratos	54
6.2 Evaluación de las cinéticas del crecimiento de <i>Clavispora lusitaniae</i> Hi2 en los diferentes medios de cultivo formulados.....	54
6.3 Cuantificación de biomasa y lípidos acumulados por la levadura oleaginosas <i>Clavispora lusitaniae</i> Hi2 en las formulaciones de medios seleccionadas	55
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	59
7.1 Conclusión.....	59
7.2 Perspectivas	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	66
Cuantificación de azúcares reductores de los sustratos.....	66
Cuantificación de carbohidratos totales de los sustratos.....	66
Cuantificación del almidón de los sustratos	67
Crecimiento de la levadura <i>Clavispora lusitaniae</i> Hi2 en medio YPD	67

INTRODUCCIÓN

En la actualidad los combustibles fósiles constituyen el 80% de la energía que se usa en el mundo (32% petróleo, 21% gas y 27% carbón) y cerca del 67% de las fuentes con que se produce electricidad (5% petróleo, 22% gas y 40% carbón) (Ferrari, 2013). En el año 2011, cerca del 93% de la energía utilizada a nivel mundial por el sector del transporte provino de los derivados del petróleo. Las emisiones relacionadas con el uso de la energía incluyen CO₂, CH₄, N₂O, óxidos de nitrógeno (NO_x), monóxido de carbono (CO) y los compuestos orgánicos volátiles distintos del metano (COVDM), así como las emisiones de dióxido de azufre (SO₂) (Bennaceur *et al.*, 2005; López, 2012).

El daño al ambiente que está produciendo el uso de combustibles, así como su limitada obtención, por ser un recurso no renovable, ha generado un aumento en el precio, convirtiéndolos en una de las problemáticas críticas a nivel global. La producción de biocombustibles, se está convirtiendo en un área en desarrollo de gran importancia, ya que es una alternativa de producción sustentable de combustibles líquidos o gaseosos producidos a partir de biomasa, entendiendo por tal la materia orgánica biodegradable (OCDE/FAO, 2017)..

Actualmente sólo se encuentra disponible, a nivel comercial, la tecnología de biocombustibles de primera generación, siendo los mayores productores de bioetanol: Brasil, que emplea principalmente caña de azúcar y Estados Unidos, que utiliza maíz. (Castillo Vázquez *et al.*, 2011). Sin embargo, el uso de semillas oleaginosas y caña de azúcar han generado un impacto en los suministros y precios de alimentos primarios. Por otro lado, la producción de biodiésel, utiliza aceite de colza como materia prima principal y, una vez más, existe preocupación por el aumento de los precios de la colza por la desviación de su aceite para la producción de biodiésel (Foust *et al.*, 2009). Debido a estas preocupaciones y a las limitaciones generales de la tecnología de biocombustibles de primera generación, por la competencia con la producción de alimentos, se requerirán tecnologías avanzadas para la producción de biocombustibles para cumplir con los objetivos de un volumen agresivo para el despliegue de los biocombustibles como opción comercial.

El uso de microorganismos para la producción de biocombustibles es un tema de transcendencia, debido a que los microorganismos oleaginosos, como levaduras, bacterias, hongos filamentosos y microalgas son capaces de acumular lípidos, que pueden ser

transformados en biocombustible. Las ventajas de la producción de aceite microbiano en comparación con el aceite vegetal es el corto ciclo de vida de los microorganismos y la posibilidad de un proceso de producción *in vitro* no influenciado por factores externos como el lugar, la estación o el clima, por lo cual ha sido una alternativa viable para su uso Schulze *et al.*, 2014; Ageitos *et al.*, 2011).

Por otro lado, los residuos agroindustriales han sido de gran interés, debido a que es un material rico en nutrientes, tales como, carbohidratos, proteínas y minerales que pueden ser aprovechados como fuente de carbono para el crecimiento de microorganismos de interés comercial (Saval, 2012).

Debido a lo anterior en el presente proyecto se llevará a cabo la formulación de un medio de cultivo a partir de los residuos agroindustriales nejayote e hidrolizado de bagazo de caña de azúcar para la producción de aceites unicelulares a partir del crecimiento de la levadura oleaginosa *Clavispora lusitaniae* Hi2.

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

1.1 Introducción

1.1.1 Combustibles fósiles

Los combustibles fósiles son fuentes de energía no renovables que generan contaminantes y están vinculados al calentamiento global, el cambio climático e incluso algunas enfermedades incurables (Aransiola *et al.*, 2013).

Existen tres tipos de combustibles fósiles que pueden usarse para el suministro energético: petróleo, gas y carbón, los cuales son recursos finitos. La energía química contenida en ellos es energía solar del pasado geológico, capturada por medio de la fotosíntesis de plantas que posteriormente se acumularon junto con otra materia orgánica en cuencas marinas someras; donde por el sepultamiento progresivo en las capas geológicas aumentó paulatinamente la presión y la temperatura hasta provocar su transformación. Una vez formados, petróleo y gas tienden a migrar hacia la superficie debido a su contraste de densidad, pero en condiciones geológicas apropiadas pueden acumularse en rocas porosas constituyendo reservorios con un volumen importante de hidrocarburo. La formación, migración y acumulación de carbón, petróleo y gas son procesos que duran entre centenares de miles de años hasta millones de años. Por lo tanto, son recursos no renovables ya que lo que existe en el planeta no puede aumentar, por lo menos no en el arco de la civilización humana. Por otro lado, la formación de un yacimiento petrolero necesita una serie de eventos geológicos que no ocurren de manera constante ni ocurren en todos los lugares, sino que solo se dieron en ciertos periodos geológicos y en determinadas regiones del planeta. En la actualidad los combustibles fósiles constituyen el 80% de la energía que se usa en el mundo (32% petróleo, 21% gas y 27% carbón) y cerca del 67% de las fuentes con que se produce electricidad (5% petróleo, 22% gas y 40% carbón) (Ferrari, 2013).

Hay diferentes factores limitantes que confirman que los combustibles fósiles no son viables para seguir utilizándose en un futuro (Marín Quemada & San Martín González, 2011):

- La problemática ambiental en general y el cambio climático en particular.
- La inestabilidad geopolítica de las principales regiones productoras de hidrocarburos.
- El posible agotamiento de los combustibles fósiles.

1.1.2 Petróleo

Es un aceite mineral de color oscuro, olor fuerte y formado por mezclas en proporciones diferentes de sustancias orgánicas; compuestas, casi en su totalidad, por carbono e hidrógeno denominadas hidrocarburos. La era del petróleo se inició cuando la demanda de aceite para lámparas durante la revolución industrial agotó los recursos tradicionales: las grasas animales y el aceite de ballena. En respuesta a este aumento en la demanda, Edwin Drake perforó el primer pozo petrolero en 1859 en Titusville, Pennsylvania. El petróleo de este pozo se refinó para producir queroseno (fracción C_{10} - C_{18}), que sirvió como excelente aceite para lámparas. La fracción de gasolina (C_5 - C_{12}) empezó a adquirir importancia tiempo después, cuando surgen los “carruajes sin caballos”, señalando el nacimiento de la edad de la gasolina y que hasta la actualidad es de gran importancia, siendo el combustible la base del funcionamiento de la industria automovilística, aviones, barcos y en general de todos aquellos elementos que se relacionen con la industria petroquímica. Su combustión produce desechos tóxicos que afectan el ambiente (Zumdahl, 2007; Reyes Torres, 1999). En la Tabla 1 se indican las principales aplicaciones de las diversas fracciones de petróleo.

Tabla 1. Principales aplicaciones de fracciones de petróleo (Reyes Torres, 1999).

Fracción de petróleo*	Aplicaciones principales
$C_5 - C_{12}$	Gasolina
$C_{10} - C_{18}$	Queroseno Combustibles para aviones a chorro
$C_{15} - C_{25}$	Combustible diésel Aceite para calefacción Aceite lubricante
$>C_{25}$	Asfalto

*Indica la longitud de cadenas presente en cada fracción.

En el 2011 el petróleo representó el 31.5% del suministro mundial de energías primarias, los derivados del petróleo constituyeron el 40.8% del consumo mundial de energía

final. Por sectores, el consumo mundial de derivados del petróleo se desglosó del siguiente modo:

- 62.3%: transporte
- 16.8%: usos no-energéticos (principalmente petroquímica)
- 12.0%: agricultura, pesca, servicios públicos y comerciales, residencial y otros usos (incluida la generación de electricidad)
- 08.9%: industria

En el año 2011 cerca del 93% de la energía utilizada mundialmente por el sector del transporte provino de los derivados del petróleo. Los biocombustibles representaron aproximadamente el 2%, el gas natural cerca del 3% y la electricidad poco más del 2%. Estos datos nos dan una idea de la importancia que el petróleo tiene en la actualidad, sin embargo, el uso del petróleo es limitado debido a que es un recurso no renovable y en unos años se agotara.

1.1.3 Impacto ambiental por el uso de combustibles fósiles

El calentamiento global es una de las principales problemáticas ambientales mundialmente, es la secuela de emisiones de Gases de Efecto Invernadero (GEI). Los GEI pueden definirse como componentes gaseosos en la atmósfera, tanto naturales como producidos por el hombre, que absorben y liberan radiación a longitudes de onda específicas. Esto se produce dentro del espectro de radiación infrarroja emitida por la superficie de la Tierra, la atmósfera y nubes. Los principales GEI en la atmósfera de la Tierra son el vapor de agua (H_2O), dióxido de carbono (CO_2), óxido nitroso (N_2O), metano (CH_4) y el ozono (O_3) (GrundfosX,2020.).

México emitió 683 millones de toneladas de bióxido de carbono equivalente ($MtCO_2e$) de gases efecto invernadero (GEI) en el 2015. También se detectan las emisiones de metano, óxido nitroso, hidrofluorocarbonos, perfluorocarbonos, hexafloruro de azufre y carbono negro. El gas más relevante que emite nuestro país es el bióxido de carbono con 71% de las emisiones, seguido del metano con 21%. Del total de las emisiones, 64% correspondieron al consumo de combustibles fósiles; 10% se originaron por los sistemas de producción pecuaria; 8% provinieron de los procesos industriales; 7% se emitieron por el manejo de residuos; 6% por las emisiones fugitivas por extracción de petróleo, gas y minerías y 5% se generaron por actividades agrícolas (INECC, 2018).

Las emisiones de dióxido de carbono proceden de la oxidación del carbono de los combustibles durante la combustión. En condiciones de combustión óptimas, el contenido total de carbono de los combustibles debería convertirse en CO₂. Sin embargo, los procesos de combustión reales no son perfectos y la consecuencia de ello es que se producen pequeñas cantidades de carbono parcialmente oxidado y no oxidado. Una pequeña fracción del carbono no se oxida a CO₂ inmediatamente. La mayor parte de esta fracción se emite en forma de gases distintos del CO₂ tales como el metano (CH₄), el monóxido de carbono (CO) y los compuestos orgánicos volátiles diferentes del metano (COVDM). En el caso del petróleo, alrededor del 1.5 ± 1 % del carbono pasa a través de los quemadores sin oxidarse. En el año 2002, se emitieron a la atmósfera más de 24,000 millones de toneladas métricas de CO₂ como resultado de la quema de combustibles. Por una tonelada de petróleo se producen tres toneladas de CO₂ (Bennaceur *et al.*, 2005; López, 2012).

Se define por contaminación al aumento o aparición de sustancias perjudiciales o ciertas formas de energía (calor, ruido o radioactividad) en el ambiente, cuya cantidad es mayor a la que éste es capaz de admitir y neutralizar. Se denominan contaminantes a los factores que dañan o perjudican el entorno. En muchos sitios la contaminación del aire es un grave problema que no sólo afecta a la salud, sino que impide el desarrollo de la vegetación, deteriora edificios y monumentos. La mayor parte de los contaminantes del aire se originan al quemar combustibles fósiles (carbón y petróleo), y procesados (gasolinas) y, en menor proporción el gas natural. De esta acción se producen diversas sustancias como las siguientes (Campos Bedolla *et al.*, 2003):

- Monóxido de carbono. Se origina cuando un combustible no se quema completamente, convirtiéndose en un gas tóxico para las personas.
- Dióxido de carbono. Se genera por los procesos de combustión, la mayoría de las veces, en cantidades que no pueden ser absorbidas por las plantas a través de la fotosíntesis. Aunque no es una sustancia peligrosa para los seres vivos, su exceso puede provocar cambios climáticos en el planeta.
- Óxidos de azufre y de nitrógeno. Estas sustancias ocasionan la lluvia ácida y algunos problemas respiratorios.

1.1.4 Biocombustibles

Los biocombustibles, se están convirtiendo en un área en desarrollo de gran importancia, ya que es una alternativa de producción sustentable de combustibles.

Los biocombustibles son combustibles líquidos, gaseosos o sólidos producidos a partir de biomasa, entendiendo por tal la materia orgánica biodegradable y que no se encuentra en estado fósil, y que generan energía mediante un proceso de transformación (fermentación alcohólica, ácidos grasos, descomposición anaeróbica o biomasa) (Carreras, 2010). Los biocombustibles se utilizan, mayoritariamente, en el sector del transporte como:

- Biodiésel: producido a partir de la reacción de los aceites vegetales o grasas animales con alcohol.
- Bioetanol: se produce a partir de la fermentación de materia orgánica con altos contenidos en almidón (como cereales, caña de azúcar y remolacha).
- Biogás: es un gas compuesto principalmente por metano, formado por la degradación anaerobia de materia orgánica.

Dependiendo de la materia prima utilizada para la obtención de biocombustibles, éstos se clasifican en cuatro generaciones. La primera generación está compuesta por aquellos obtenidos de cultivos alimenticios como maíz, sorgo, trigo, cebada, etc.; la segunda generación consiste de los producidos a partir de residuos de procesos agroindustriales o forestales; la tercera generación abarca el biocombustible extraído a partir de microalgas y otras fuentes microbianas; y los de cuarta generación la cual aún se encuentra en desarrollo, se basa en la utilización de bacterias genéticamente modificadas, capaces de transformar anhídrido carbónico (CO₂) en biocombustibles (Castillo Vázquez *et al.*, 2011).

Actualmente, sólo se encuentra disponible a nivel comercial la tecnología de biocombustibles de primera generación, siendo los mayores productores de bioetanol: Brasil, que emplea principalmente caña de azúcar y Estados Unidos, que utiliza maíz (Castillo Vázquez *et al.*, 2011). En el 2018, Estados Unidos y Brasil fueron los principales países productores de biocombustibles a nivel mundial. En el primero, la producción fue de aproximadamente 38 millones de toneladas equivalentes de petróleo. En el segundo, esta se situó en torno a 21,4 millones de toneladas (statista, 2019).

1.1.4.1 Biodiésel

El biodiésel se define como ésteres de alquilo (normalmente metilo o etilo) de ácidos grasos de cadena larga derivados de grasas vegetales o animales, puede ser útil como fuente alternativa para reemplazar el diésel refinado del combustible fósil. La producción mundial de biodiésel alcanzó 7 952 millones de galones (26.8 millones de toneladas) en 2015, siendo USA el líder en producción, seguido de Brasil, Indonesia, Alemania, Francia y Argentina, este último es el mayor exportador actualmente (Cluster Biodiésel Avanzado, 2017). Se obtiene por medio de ácidos grasos transesterificados (ésteres metílicos de ácidos grasos-FAME), es biodegradable, no tóxico y esencialmente libre de azufre y componentes aromáticos (Beopoulos *et al.*, 2011).

Los aceites vegetales más utilizados para la producción de biodiésel son la palma, la soja, la colza y el aceite de tung (Beopoulos *et al.*, 2011). En la Tabla 2 se muestra la composición de diferentes aceites vegetales.

Tabla 2. Composición de ácidos grasos de diferentes aceites vegetales (Beopoulos *et al.*, 2011).

Aceite vegetal	Porcentaje de composición de los ácidos grasos en peso									Índice de acidez	Fos (ppm)	Valor del peróxido
	16:1	18:0	20:0	22:0	24:0	18:1	22:1	18:2	18:3			
Maíz	11.67	1.85	0.24	0.00	0.00	25.16	0.00	60.60	0.48	0.11	7	18.4
Semilla de algodón	28.33	0.89	0.00	0.00	0.00	13.27	0.00	57.51	0.00	0.07	8	64.8
Crambe	20.7	0.70	2.09	0.80	1.12	18.86	58.51	9.00	6.85	0.36	12	26.5
Maní	11.38	2.39	1.32	2.52	1.23	48.28	0.00	31.95	0.93	0.20	9	82.7
Colza	3.49	0.85	0.00	0.00	0.00	64.4	0.00	22.30	8.23	1.14	18	30.2
Soja	11.75	3.15	0.00	0.00	0.00	23.26	0.00	55.53	6.31	0.20	32	44.5
Girasol	6.08	3.26	0.00	0.00	0.00	19.93	0.00	73.73	0.00	0.15	15	10.7

Se prevé que la producción mundial de biodiésel llegará a 40.5 Mml para 2026, lo que equivale a un aumento de 12% con respecto al nivel de 2016 (36 Mml). Más que las fuerzas del mercado, la política seguirá influyendo en los patrones de producción. Se estima que la Unión Europea permanezca como el productor más importante de biodiésel, por un gran margen. La producción llegará a 13 Mml para 2026, por debajo de los 13.3 Mml de 2016 y los 14.3 Mml de 2020, cuando se supone que se cumplirá el objetivo de la RED. Lo anterior se relaciona con las menores perspectivas de uso de diésel (OCDE/FAO , 2017).

En México operan seis plantas productoras de biodiésel, que en conjunto poseen una capacidad de producción de alrededor de 4,182 metros cúbicos al año (Figura 1). Dos de estas compañías se ubican en Puebla, mientras que el resto se encuentran en Baja California, Durango, Estado de México y Oaxaca. En tres de estas plantas se utilizan grasas animales, en dos aceite de la higuera y en una aceite comestible usado (Tapia & Valadez, 2017).

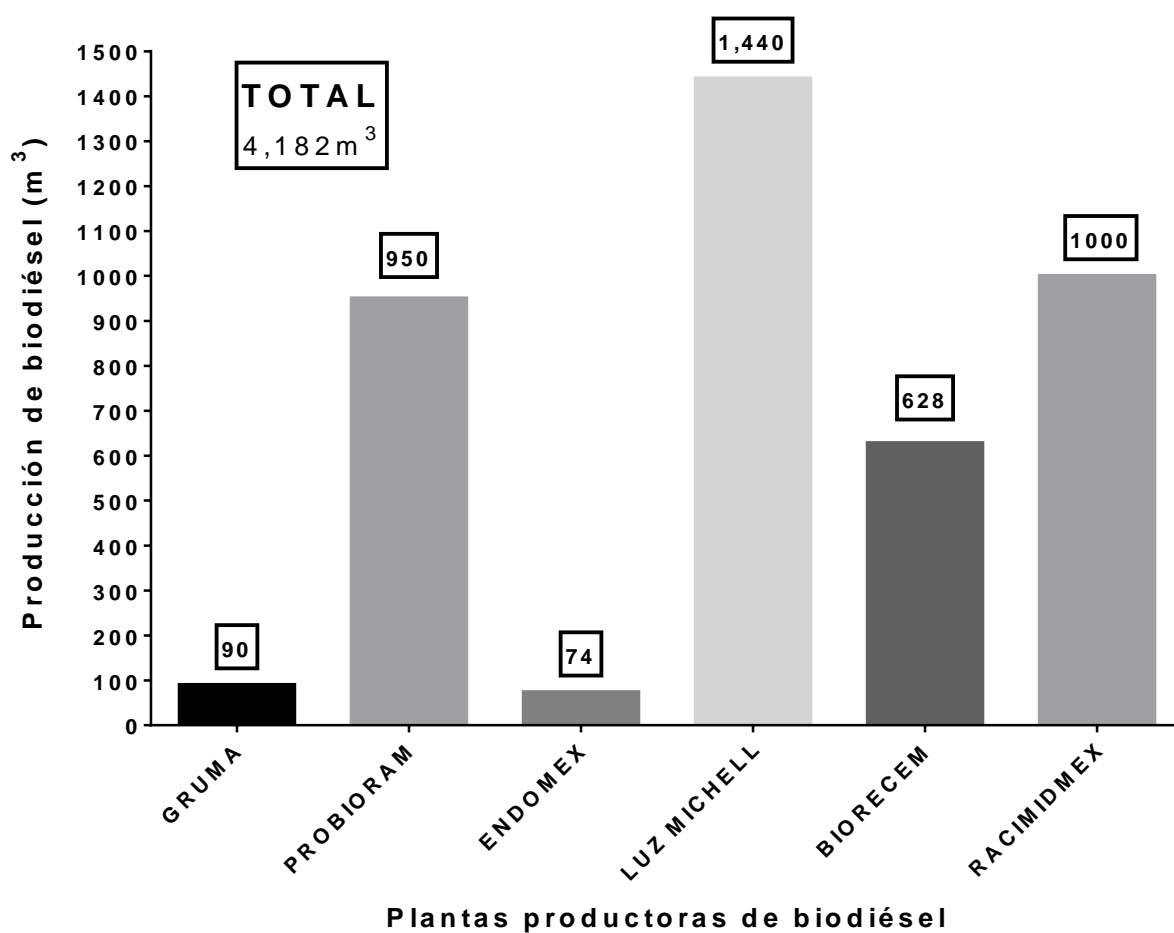


Figura 1. Producción de biodiésel en México (Tapia & Valadez, 2017)..

La materia prima utilizada para el proceso de fabricación del biodiésel es variada, se emplean aceites vegetales, grasas animales, aceites reciclados, residuos agroindustriales, entre otros. También existen diferentes tipos de catalizadores, básicos como hidróxidos de sodio o potasio, ácidos como ácido sulfúrico, lipasas y fluidos supercríticos (Marchetti *et al.*, 2007).

El primer paso para la producción es la conversión de la materia prima en aceite bruto, posteriormente es sometido a un desgomado, filtrado, neutralizado y secado obteniéndose un aceite refinado sin sólidos en suspensión, con un mínimo de acidez y humedad aptos para su transesterificación en biodiésel (Figura 2) (Ganduglia *et al.*, 2009).

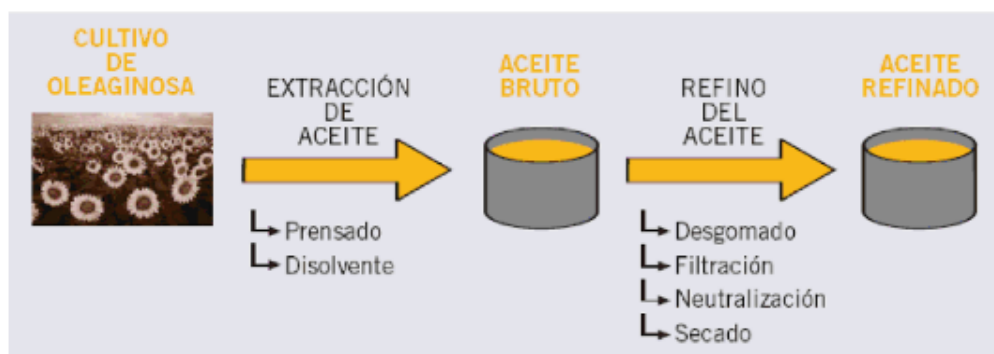


Figura 2. Esquema del proceso productivo del aceite refinado (Ganduglia *et al.*, 2009).

Una vez obtenido el aceite refinado se hace reaccionar con un alcohol monovalente como el metanol en presencia de un catalizador básico (condiciones de presión y temperatura). La reacción química de transesterificación para obtener el biodiésel consiste en la reacción de un triglicérido (molécula de glicerol esterificada por tres moléculas de ácidos grasos), que está contenido en el aceite refinado y un alcohol ligero (etanol o metanol), obteniéndose como producto glicerina y mono ésteres derivados de los tres ácidos grasos que es el biodiésel (Figura 3) (Ganduglia *et al.*, 2009).

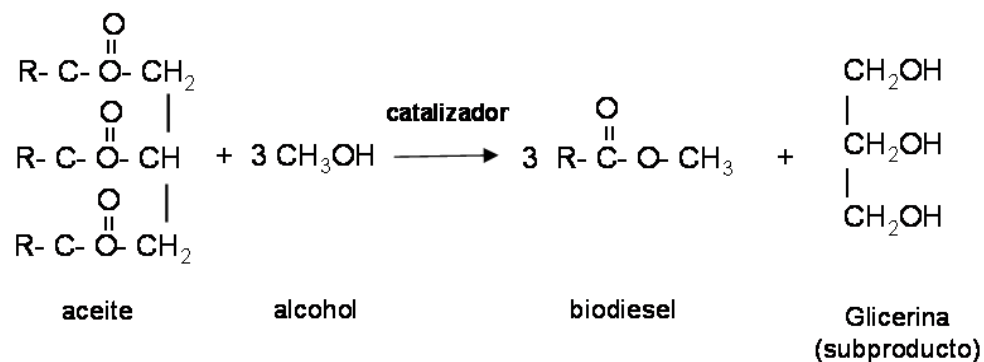


Figura 3. Reacción de transesterificación para la obtención de biodiésel (Ganduglia *et al.*, 2009).

1.1.5 Microorganismos oleaginosos

Todos los microorganismos por lo general producen alrededor del 6 a 8% de lípidos por biomasa seca como componentes de la membrana celular. Sin embargo, los microorganismos oleaginosos, como levaduras, bacterias, hongos filamentosos y microalgas son capaces de acumular al menos un 20% de aceite intracelular en peso seco. Estos lípidos son llamados aceites unicelulares y se almacenan en forma de gotitas de lípidos dentro de las células (Schulze *et al.*, 2014; Garay *et al.*, 2016).

El proceso de acumulación de lípidos comienza cuando existe un exceso de fuente de carbono y hay una limitación de nitrógeno en el medio de cultivo, produciendo un cambio importante en el metabolismo, se deprime la síntesis de proteínas y se activa la síntesis y acumulación de ácidos grasos (Figura 4). El lípido que se produce en las especies oleaginosas suele estar en forma de triacilgliceroles (TAG) y es un suministro de reserva intracelular de carbono y energía para ser utilizado en tiempos de agotamiento de nutrientes (Wynn & Ratledge, 2005).

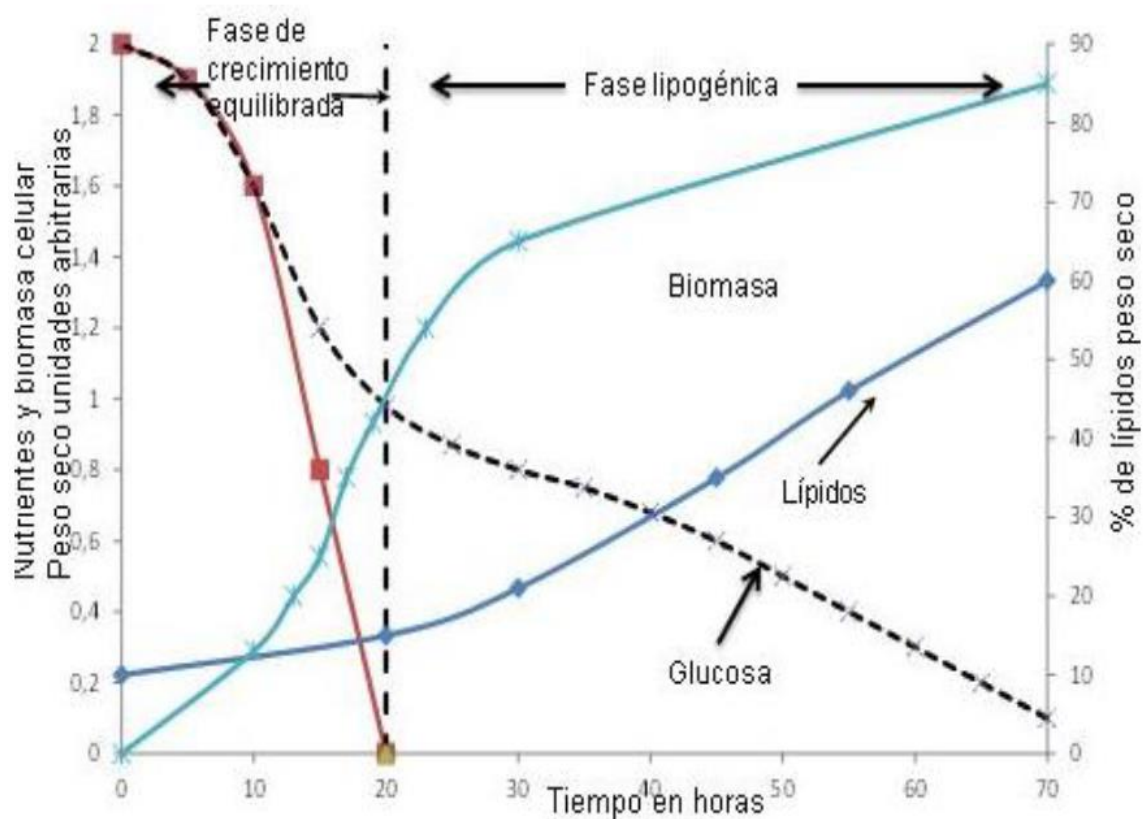


Figura 4. Generación y acumulación de lípidos en microorganismos oleaginosos.

El rendimiento y el tipo de lípido dependen de varios factores incluyendo el tipo de microorganismo, las condiciones de cultivo y los sustratos elegidos. Las ventajas de la producción de aceite microbiano, en comparación con el aceite vegetal, es el corto ciclo de vida de los microorganismos y la posibilidad de un proceso de producción *in vitro* no influenciado por factores externos como el lugar, la estación o el clima (Schulze *et al.*, 2014).

1.1.6 Generalidades de las levaduras

Las levaduras han sido utilizadas por el hombre durante muchos siglos para fermentar jugos de frutas, pan o elaborar muchos y nutritivos alimentos. Su importancia es aún mayor en la actualidad porque se utilizan en muchos procesos fermentativos y para sintetizar algunas vitaminas, grasas y proteínas a partir de azúcares simples y amoníaco. El primer hombre que observó levaduras al microscopio fue Antonie van Leeuwenhoek (Pelczar *et al.*, 1996).

Las levaduras son hongos unicelulares no filamentosos con forma esférica u oval típica. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza y con frecuencia se encuentran como

una cubierta polvorienta color blanco en frutas y hojas. Generalmente se reproducen por gemación (Tortora et al., 2016).

En la brotación o gemación (Figura 5) la célula parental forma una protuberancia (un brote) en su superficie externa. Cuando el brote se alarga el núcleo de la célula parental se divide y un núcleo migra al interior del brote. El material de la pared celular se deposita entre el brote y la célula parental y por último el brote se separa. Las levaduras en brotación, como *Saccharomyces*, se dividen de manera irregular. Una célula de levadura puede formar hasta 24 células hijas por brotación. Algunas levaduras producen brotes que no pueden separarse y forman una cadena corta de células denominadas pseudohifas. *Candida albicans* se adhiere a las células epiteliales humanas como una levadura, pero suele requerir la formación de pseudohifas para invadir los tejidos profundos (Tortora et al., 2016).

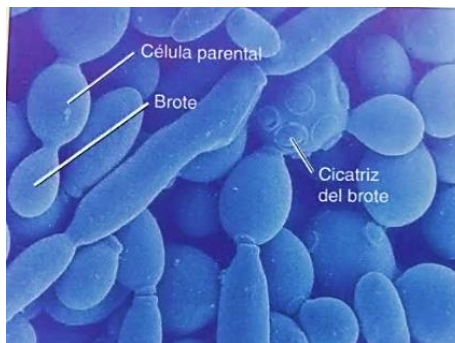


Figura 5. Micrografía de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en brotación (Tortora *et al.*, 2016).

Las levaduras de fisión, como *Schizosaccharomyces*, se dividen de modo uniforme para producir dos células nuevas. Durante la fisión la célula parental se alarga, su núcleo se divide y se producen dos células hijas. El aumento del número de células sobre un medio sólido produce una colonia similar a las colonias bacterianas (Tortora et al., 2016).

Las levaduras pueden crecer como anaerobias facultativas. Pueden utilizar el oxígeno o un compuesto orgánico como aceptor final de electrones; éste es un atributo valioso por que permiten que estos hongos sobrevivan en diversos ambientes. Si tienen acceso al oxígeno las levaduras llevan a cabo la respiración aeróbica para metabolizar los hidratos de carbono a dióxido de carbono y agua; en ausencia de oxígeno fermentan los hidratos de

carbono y producen etanol y dióxido de carbono. Esta fermentación se utiliza en la industria de la cerveza, del vino y de la panadería (Tortora *et al.*, 2016).

Hay aproximadamente 600 especies de levaduras, separadas en unos 39 géneros. Son clasificadas principalmente en 3 grupos taxonomicos (Pelczar *et al.*, 1996; Ageitos *et al.*, 2011):

1. Las levaduras ascoporogenas y ascomicéticas (esporas resultantes de la cariogenia y meiosis que nacen en ascas).
2. Las levaduras basidiomicéticas (las esporas son resultado de las cariogamia y meiosis que nacen en basidios).
3. Las levaduras que no tienen estadios perfectos pertenecen a los hongos imperfectos (deuteromicetos).

En general, las células de las levaduras son más grandes que las de la mayor parte de las bacterias, pero las más pequeñas no son tan grandes como las bacterias mayores. Las levaduras varían considerablemente de tamaño, pudiendo tener entre 1 a 5 micrómetros de ancho por 5 a 30 micrómetros de largo. Generalmente son ovoides, si bien algunas son esféricas y otras alargadas. Cada especie tiene su aspecto característico (Figura 6), pero aún en cultivo puro existen variaciones considerables de tamaño y forma de las células individuales, dependiendo de la edad y del medio. Las levaduras no tienen flagelos u otros organelos de locomoción (Tortora *et al.*, 2016).

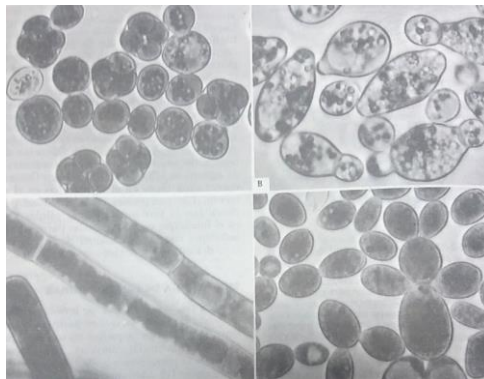


Figura 6. Variabilidad en la morfología de las levaduras (Tortora *et al.*, 2016).

Las levaduras se encuentran muy difundidas en la naturaleza y son diseminadas por los insectos o el viento. La mayor parte son saprófitas que viven sobre la materia orgánica muerta, pero algunas son parásitas dependientes de huéspedes vivos o son parásitas

facultativas u obligadas que producen enfermedades a las personas, animales o plantas. En muchas clases de suelos hay varias especies de levaduras. Ello demuestra su gran capacidad para sobrevivir en ambientes tan distintos en los que varían la composición del suelo, temperatura, luz, humedad y otros factores. Las levaduras que habitan usualmente en el suelo, producen un limo extracelular que les permite resistir la desecación. También son capaces de aprovechar un gran número de compuestos del carbono (Tortora *et al.*, 2016).

El carbono es el elemento mayoritario presente en la célula de la levadura, alrededor del 50% del peso seco, por tal motivo es indispensable que lo adquiera para su crecimiento, también es indispensable el nitrógeno, algunas requieren vitaminas como la tiamina, biotina, inositol, ácido pantoténico, etc., requieren de azufre para la síntesis de ciertos aminoácidos, de potasio para la estimulación de la fermentación y la respiración, de magnesio para el funcionamiento de enzimas, síntesis de proteínas y el rendimiento celular en general; requieren calcio para favorecer el mantenimiento de la integridad celular en entornos severos, y de zinc para la síntesis de vitaminas (Uribe Gutiérrez, 2007).

1.1.7 Levaduras oleaginosas

De las 600 especies de levaduras, sólo 30 se han caracterizado como capaces de acumular más del 20% de su peso seco como lípidos (Ageitos *et al.*, 2011). Las levaduras oleaginosas son generalmente no patógenas y son capaces de sintetizar y acumular lípidos con una composición similar a los aceites y grasas vegetales (Beopoulos *et al.*, 2011). *Cryptococcus* sp., *Yarrowia* sp., *Candida* sp., *Rhodotorula* sp., *Rhodospiridium* sp., *Trichosporon porosum* y *Lipomyces* sp. son géneros de levaduras oleaginosas (Schulze *et al.*, 2014; Ageitos *et al.*, 2011).

Presentan ventajas para la producción de lípidos sobre otras fuentes, entre ellas, sus tiempos de duplicación suelen ser inferiores a una hora, son mucho menos afectados que las plantas según la estación o las condiciones climáticas y sus cultivos son más fácilmente escalables que los de las microalgas. Además, los biosurfactantes de levaduras oleaginosas presentan mejores propiedades que sus contrapartes químicas en términos de biodegradabilidad y amplia gama de propiedades biológicas, pueden ser utilizados en cosméticos, alimentos y biorremediación (Ageitos *et al.*, 2011).

1.1.8 Residuos agroindustriales

La agroindustria se basa en la transformación de productos agrícolas, pecuarios o forestales en productos de interés comercial, ya sea como alimento o como materia prima.

Entre los productos que se industrializan se encuentran: frutas, verduras, raíces, semillas, hojas, tubérculos y vainas; algunos se comercializan en fresco y otros son transformados en néctares, jugos, mermeladas, ensaladas, harinas, aceites, vinos, concentrados en polvo, conservas, etc. Derivado de una producción excesiva de estos productos comercializables, se provoca un crecimiento en la generación de residuos agroindustriales, los cuales son materiales en estado sólido o líquido que ya no son de utilidad para el proceso que los generó, pero que son susceptibles de aprovechamiento o transformación para generar otro producto con valor económico, de interés comercial y/o social (Saval, 2012).

En el 2006 se produjeron en México 75.73 millones de toneladas de materia seca proveniente de 20 cultivos, de los cuales 60.13 millones de toneladas corresponden a residuos primarios, obtenidos al momento de la cosecha, entre los que están: hojas y tallos del maíz, tallos y vainas de sorgo, puntas y hojas de caña de azúcar, paja de trigo, cebada y frijol, así como cáscara de algodón. El resto, 15.60 millones de toneladas corresponden a residuos secundarios obtenidos del procesamiento post-cosecha, entre los que están: bagazo de caña de azúcar, mazorcas y olotes, bagazo de maguey o agave, así como pulpa de café (Saval, 2012).

Las características de los residuos agroindustriales son muy variadas, dependen de la materia prima y del proceso que los generó, no obstante, comparten una característica principal que es el contenido de materia orgánica, constituida por diferentes porcentajes de celulosa, lignina, hemicelulosa y pectina. Se han definido criterios de selección de los residuos para ser aprovechados con fines biotecnológicos, entre ellos los descritos a continuación (Saval, 2012):

- Que el componente principal del residuo pueda ser utilizado como sustrato para la producción fermentativa de insumos de procesos industriales.
- Que el residuo esté disponible localmente y en las cantidades necesarias para asegurar la fabricación de un producto de interés.
- Que no tenga otras aplicaciones o usos que compitan con el proceso que se pretende promover.
- Que no requiera pretratamiento, y en caso de requerirlo, que éste sea sencillo y económico.

Los residuos agroindustriales son ricos en nutrientes y de gran importancia, ya que pueden ser aprovechados para la producción de diferentes productos, como es el caso de enzimas, entre las que destacan: las celulasas, las hemicelulasas, las xilanasas y las pectinasas, también se han utilizado residuos agroindustriales para la producción de biosurfactantes, bioplaguicidas, metabolitos secundarios, como el ácido láctico, polihidroxitirato, polihidroxicarbonato y uno de los productos de gran relevancia es la producción de bioenergéticos, como el biohidrógeno, biogás, biodiésel y bioetanol (Saval, 2012). Sin embargo, cuando los residuos no son reutilizados y se abandonan en el lugar donde se generaron, se convierten en contaminantes de suelos y aguas subterráneas.

1.1.8.1 Generalidades del maíz

Maíz, palabra de origen indio caribeño, significa literalmente “lo que sustenta la vida”. El maíz que es junto con el trigo y el arroz uno de los cereales más importantes del mundo, suministra elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales y es una materia prima básica de la industria de transformación, con la que se producen almidón, aceite y proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y, desde hace poco, combustible (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1993).

Es el cereal con mayor demanda de consumo en México, aproximadamente 23,200 Mt anualmente. Se estima que para el 2020 las cifras aumenten a 24,600 Mt; esto debido a la gran cantidad de productos que se derivan del mismo, tales como tortillas, totopos, tostadas, tacos, harinas, entre otros (Díaz Montes *et al.*, 2016). El cultivo del maíz tuvo su origen en América Central, especialmente en México, de donde se difundió hacia el norte hasta el Canadá y hacia el sur hasta Argentina. La evidencia más antigua de la existencia del maíz, de unos 7,000 años de antigüedad, ha sido encontrada por arqueólogos en el valle de Tehuacán (Puebla, México) pero es posible que hubiese otros centros secundarios de origen en América (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1993).

Los granos de maíz se desarrollan mediante la acumulación de los productos de la fotosíntesis, la absorción a través de las raíces y el metabolismo de la planta de maíz en la inflorescencia femenina denominada espiga. Esta estructura puede contener de 300 a 1,000 granos según el número de hileras y el diámetro y longitud de la mazorca. El peso del grano puede variar mucho, de aproximadamente 19 a 30 g por cada 100 granos.

La composición química del grano de maíz, y por ende su valor nutritivo, dependen del genotipo de la variedad, el ambiente y las condiciones de siembra.

La cubierta seminal o pericarpio se caracteriza por un elevado contenido de fibra cruda, aproximadamente el 87 %, la que a su vez está formada fundamentalmente por hemicelulosa (67 %), celulosa (23 %) y lignina (0.1 %). El endospermo (Figura 7), en cambio, contiene un nivel elevado de almidón (87 %), aproximadamente 8 por ciento de proteínas y un contenido de grasas crudas relativamente bajo (Tabla 3) (Díaz Montes *et al.*, 2016).

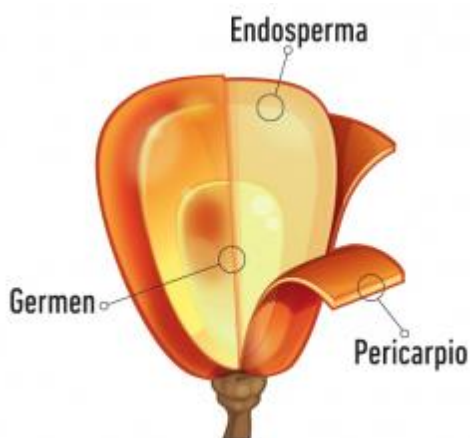


Figura 7. Morfología del grano de maíz (Nansa, 2012).

La calidad nutritiva del maíz está definida en buena medida por el tipo de sus proteínas y ésta, a su vez, la establece el contenido de los llamados aminoácidos esenciales. Las proteínas contenidas en el grano se clasifican en cuatro tipos, de acuerdo con su solubilidad: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones de sales), prolaminas (solubles en soluciones alcohólicas) y glutelinas (solubles en soluciones alcalinas o ácidas diluidas). En cuanto al contenido de lípidos, el grano de maíz contiene alrededor de 5 %, principalmente en el germen; el aceite de maíz contiene bajos niveles de grasas saturadas. En cuanto a vitaminas, se sabe que el maíz amarillo contiene principalmente dos vitaminas solubles en grasa, β -caroteno o provitamina A y α -tocoferol o vitamina E, y la mayoría de las vitaminas solubles en agua. En relación con el almidón, el grano maduro del maíz presenta en promedio 72 %, y prácticamente todo está presente en las células del endospermo. En un maíz normal, el gránulo de almidón contiene aproximadamente 27 % de amilosa —una molécula esencialmente lineal formada aproximadamente por 1 000 unidades de glucosa— y

73 % de amilopectina —una molécula ramificada que posee aproximadamente 40,000 o más unidades de glucosa (Paredes López *et al.*, 2008).

Tabla 3. Composición química de las principales partes de los granos de maíz (FAO, 1992)

Componente	Pericarpio (%)	Endospermo (%)	Germen (%)
Proteínas	3.7	8.0	18.4
Extracto etéreo (grasa cruda)	1.0	0.8	33.2
Fibra cruda (Hemicelulosa, celulosa y lignina)	86.7	2.7	8.8
Cenizas	0.8	0.3	10.5
Almidón	7.3	87.6	8.3
Azúcar	0.34	0.62	10.8

1.1.8.1.1 Nixtamalización

La nixtamalización es un proceso térmico-alkalino autóctono de México y efectuado en América Central, el norte de Estados Unidos y parte de Europa y Asia. El proceso de la nixtamalización se ha transmitido de generación en generación en Mesoamérica, y todavía se utiliza como en tiempos prehispánicos. Del náhuatl “nixtli” (cenizas) y “tamalli” (masa). Se inicia con la adición de dos partes de una solución de cal aproximadamente al 1% a una porción de maíz. Esta preparación se cuece de 50 a 90 minutos, y se deja remojando en el agua de cocción de 14 a 18 horas. Posterior al remojo, el agua de cocción, conocida como nejayote, se retira y el maíz se lava dos o tres veces con agua, sin retirar el pericarpio ni el germen del maíz. Se obtiene así el llamado maíz nixtamalizado o nixtamal, que llega a tener hasta 45% de humedad. Dicho proceso mejora las características nutricionales y sensoriales del maíz, ya que permite la remoción parcial del pericarpio, la gelificación del almidón y la hidrólisis de las fibras. (Díaz Montes *et al.*, 2016;Paredes López *et al.*, 2008).

La cocción alcalina y el remojo provocan la disolución y el hinchamiento de las capas del pericarpio, esto hace que las paredes celulares y los componentes de la fibra dietaria de esta parte del grano se vuelvan frágiles, facilitando su remoción, lo cual obviamente disminuye el contenido de fibra dietaria insoluble (Paredes López *et al.*, 2008). En dicho proceso, la acción del hidróxido de calcio genera dos productos: el nixtamal, que es el grano suave disponible para la elaboración de masa o productos derivados, y el nejayote, que es el

agua de cocimiento y cuyas propiedades físico-químicas resultan de los componentes presentes en el maíz (Díaz Montes *et al.*, 2016).

El nejayote es un subproducto del proceso de nixtamalización en la industria de procesamiento de maíz. Este subproducto es considerado como un agua residual altamente contaminante debido a su alta alcalinidad ($\text{pH}=10\text{-}14$), alta demanda biológica de oxígeno ($2,692\text{-}7,875\text{ mg O}_2/\text{L}$), alta demanda química de oxígeno ($10,200\text{-}22,000\text{ mg O}_2/\text{L}$), además de la concentración de sólidos en suspensión y materiales orgánicos disueltos ($2,540\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (Ramírez Romero *et al.*, 2013; Sánchez Gonzales *et al.*, 2011; Castro Muñoz *et al.*, 2015; Díaz Montes *et al.*, 2016).

Por cada kilogramo de maíz procesado se producen entre 2 y 3 litros de nejayote dependiendo del proceso (Ramírez Romero *et al.*, 2013). Se ha estimado que una planta procesadora de maíz, productora de nixtamal, con capacidad de $600\text{ t}\cdot\text{día}^{-1}$, llega a generar entre $1,500$ y $2,000\text{ m}^3$ de nejayote por día. Díaz Montes *et al.*, 2016 señala que el nejayote industrial se vierte en cuerpos de agua (ríos o lagos), en suelos o en el alcantarillado público, y pocas veces se le aplica algún tratamiento previo. Debido a sus propiedades físico-químicas (Tabla 4), rara vez se ha intentado darle alguna aplicación.

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas del nejayote (Hernández Martínez , 2014).

Propiedad	Parámetro
Contenido total de solidos (g.L ⁻¹)	11.68
Solidos solubles totales (°brix)	1.53
Carbón orgánico total (mg.L ⁻¹)	2,984.10
Demanda química de oxígeno (mg.L ⁻¹)	25,000-30,000
Polifenoles totales (mg ácido gálico. L ⁻¹)	1,190
pH	12-14
Densidad (kg.m ⁻³)	1,003.54
Viscosidad (pa.s)	0.002301
Nitrógeno libre (ppm)	200-300
Calcio (mg.l ⁻¹)	1,526.21
Humedad (%)	97.72
Cenizas (%)	0.767
Proteína (%)	7.42
Grasa (%)	1.48
Fibra (%)	19.3
Carbohidratos (%)	0.862

1.1.8.1.2 El nejayote como fuente de carbono para procesos biotecnológicos

Existen varias metodologías que describe Díaz Montes y colaboradores en 2016, viables para generar aplicaciones tecnologicas del nejayote, que ayuden a recuperar componentes de alto valor agregado como polifenoles, carbohidratos, azúcares, gomas y componentes de calcio de interés en las áreas alimenticia, farmacéutica y biotecnológica.

Los usos que se le han dado al nejayote están encaminados a la recuperación de componentes de alto valor agregado, como fuente de enriquecimiento para alimentos funcionales o como medio de cultivo para crecimiento de bacterias. También se ha indagado cómo tratar el efluente con materiales floculantes, mediante tecnología de membranas o sistemas biológicos, para disminuir la acción contaminante que este extracto genera.

Sánchez y colaboradores, en 2011, utilizaron el nejayote como medio de cultivo de las cepas de *B. flexus* NJY2 y NJY4 para sintetizar actividades enzimáticas comercialmente importantes como amilasas, xilanasas, proteasas y esterases de ácido fenólico.

Ramírez Romero y colaboradores, en 2013, emplearon el nejayote como medio de cultivo de bacterias ácido lácticas para generar probióticos con producción de bacteriocinas.

1.1.8.2 Generalidades de la caña de azúcar

La caña de azúcar, *Saccharum officinarum* L., es una gramínea originaria de Nueva Guinea; se cultivó por primera vez en el sureste asiático y la India occidental. A México llegó en la época de la conquista (1522 aprox.), fue así como la primera plantación se llevó a cabo en el estado de Veracruz, instalándose posteriormente los primeros ingenios azucareros en las partes cálidas del país como parte de la colonización (CONADESUCA, 2015).

En México son quince estados productores de caña de azúcar, en la Figura 8 se observan los porcentajes de participación correspondientes respecto a la producción nacional, destacando Veracruz como el estado con mayor volumen de producción y con el mayor número de ingenios azucareros con 22 de los 54 en el país (CONADESUCA, 2015).

La agroindustria azucarera es de suma importancia para la economía del país, al constituir una fuente significativa de empleos directos e indirectos, con más de dos millones de empleos generados. Produce más de 60 millones de toneladas de caña y casi 7 millones de toneladas de azúcar para la zafra 2012-13 (Sagarpa et al., 2015).

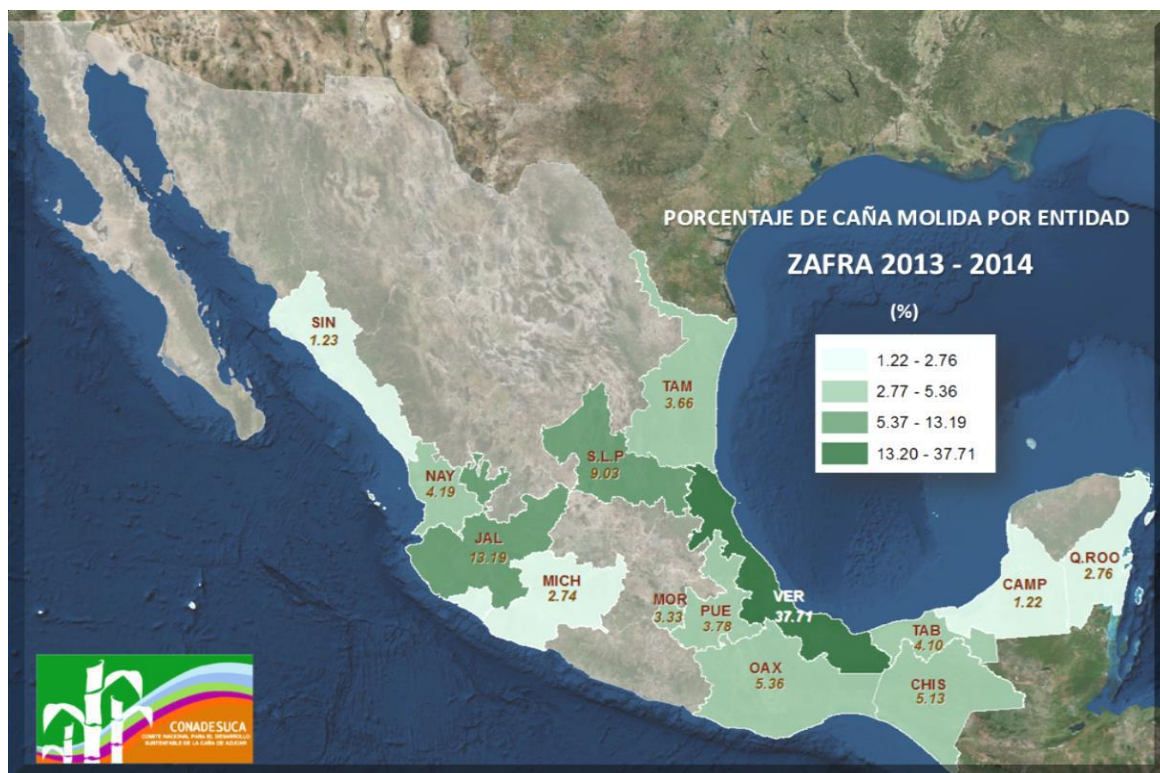


Figura 8. Participación estatal con respecto al nacional de producción de caña de azúcar molida (CONADESUCAR, 2015)

La caña de azúcar está constituida por jugo y fibra. La fibra es la parte insoluble en agua y está formada principalmente por celulosa, la cual, a su vez, está constituida por azúcares sencillos como glucosa (dextrosa). En la caña, el agua representa entre 73 % y 76 %, los sólidos totales solubles (brix, % caña) varían entre 10 % y 16 %, y la fibra (% de caña) oscila entre 11 % y 16 %. Entre los azúcares más sencillos se encuentran la glucosa y la fructosa entre 1 % y 5 % (Larrahondo, 1995).

El bagazo de caña es un material lignocelulósico constituido principalmente por celulosa (38-50 %), hemicelulosa (17-32 %) y lignina (15-30 %). Se obtiene como subproducto de la molienda de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en los centros azucareros y representa aproximadamente entre el 25 y 40 % del total de materia procesada, dependiendo del contenido de fibra de la caña y la eficiencia en la extracción del jugo (Chandler *et al.*, 2012). Este material es de naturaleza química muy compleja y requiere ser tratado previamente para permitir su degradación (Carreón *et al.*, 2009).

1.1.8.2.1 El bagazo de caña como materia prima para procesos biotecnológicos

El uso de residuos agroalimentarios como sustratos en procesos biotecnológicos es una alternativa sostenible y adecuada que permite la producción de nuevos alimentos, productos químicos y farmacéuticos. En este sentido, residuos procedentes de la industria azucarera, como el bagazo de caña, presenta diversas opciones desde el punto de vista biotecnológico, entre ellas la producción de xilosa, a partir de *Pichia pastoris*, papel, enzimas, principalmente de aquellas que son inducibles, entre las que destacan: las celulasas, las hemicelulasas, las xilanasas y las pectinasas, xilitol y biocombustibles, siendo el bioetanol uno de los que actualmente se produce a nivel industrial (Basanta *et al.*, 2007; Saval, 2012; Schulze *et al.*, 2014).

La primera etapa de pretratamiento de un residuo lignocelulósico para la producción de bioetanol es una molienda para aumentar la superficie de contacto y hacer más accesible el material. Después se pueden aplicar métodos físicos como la explosión con vapor y la termohidrólisis, o bien, métodos químicos como la hidrólisis ácida y alcalina (Saval, 2012).

Asteraye Tsigie y colaboradores, en el 2011, evaluaron la producción de lípidos por *Yarrowia lipolytica* Po1g cultivada en hidrolizado de bagazo de caña de azúcar, obtuvieron un rendimiento de 11.42 g/L de biomasa, 58.5 % (g/g) de lípidos por biomasa seca y 6.68 g/L de rendimiento de lípidos en un medio de cultivo compuesto de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar como fuente de carbono y peptona como fuente de nitrógeno durante 4 días; el hidrolizado de bagazo de caña fue neutralizado con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a un pH de 6.5, lo cual hizo que se redujeran compuestos inhibidores, tales como, el 5-hidroximetilfurfural y el fufural redujeron un 21.31% y 21.84% respectivamente. El hidrolizado tenía una composición de 21.38 % de azúcares reductores, 13.51 g/L de xilosa, 2.58 g/L de arabinosa, 3.93 g/L de glucosa, 0.48 g/L de 5-hidroximetilfurfural y 0.09 g/L de fufural.

Por otro lado, en el 2012 Huang, y colaboradores mejoraron la producción de lípidos a partir del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar con *Trichosporon fermentans* por metodología de superficie de respuesta. Obtuvieron una concentración de lípidos de 15.8 g/L bajo condiciones óptimas como relación 165 C/N, 11% de concentración de inóculo, pH inicial de 7.6 y con 9 días de fermentación; el hidrolizado de bagazo de caña se trató con ácido sulfúrico al 1.5% v/v en relación 1:10 de bagazo de caña de azúcar y ácido sulfúrico, y emplearon carbón activado para la destoxificación del hidrolizado de bagazo de caña. Los lípidos de *T.fermentans* contienen principalmente ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico y ácido linoleico.

1.2 Planteamiento del problema

El daño al ambiente que genera el uso de combustibles fósiles y a su limitada obtención por ser un recurso no renovable, son una de las problemáticas críticas a nivel global. Los biocombustibles, se están convirtiendo en un área en desarrollo de gran importancia, actualmente, sólo se encuentra disponible a nivel comercial la tecnología de biocombustibles de primera generación, sin embargo, estos son obtenidos de cultivos alimenticios como maíz, sorgo, trigo, cebada, etc. compitiendo por el espacio de siembra entre la generación de alimentos o para la producción de biocombustibles.

Por otra parte, en las agroindustrias ha incrementado la producción provocando un crecimiento en la generación de residuos, los cuales son de naturaleza química muy compleja y requieren ser tratados previamente para permitir su degradación, cuando los residuos se abandonan en el lugar donde se generaron, se convierten en contaminantes de suelos y aguas subterráneas.

Con el fin de aprovechar y transformar los residuos agroindustriales para generar otro producto con valor económico, de interés comercial, social y ambiental, y cubrir las problemáticas anteriormente mencionadas, se desarrolló el presente proyecto para formular un medio de cultivo a partir de los residuos agroindustriales, nejayote y bagazo de caña de azúcar. El medio formulado a partir de estos residuos se utilizó, para la obtención de aceites unicelulares a través del cultivo de levaduras oleaginosas capaces de almacenar lípidos por arriba del 20% para transformarlos en biodiésel y generar una alternativa a los biocombustibles de primera generación.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1 Antecedentes

En la Universidad Politécnica del Estado de Morelos (UPEMOR) se lleva a cabo el aislamiento y caracterización de levaduras oleaginosas para la obtención de aceites unicelulares empleando residuos agroindustriales como medio de cultivo para el crecimiento de dichas levaduras; esta línea de investigación está a cargo del Dr. Luis Gerardo Treviño Quintanilla, en donde se han obtenido resultados favorables. Martínez Burgos, 2013, aisló, seleccionó e identificó cepas de levadura capaces de producir aceites microbianos, obteniendo como resultado cuatro cepas capaces de producir lípidos por arriba del 20%, las cepas Hi2 y FACHp, identificadas como *Clavispora lusitaniae* y las cepas FACHb y FP5 identificadas como *Pichia kluyveri*. Hernández Martínez, 2014, evaluó la producción de aceites unicelulares por levaduras en el residuo de la nixtamalización (nejayote), en donde obtuvo las condiciones para la nixtamalización, dichas condiciones se muestran en la Tabla 5; en la Tabla 6 se presentan las propiedades físico-químicas del nejayote evaluadas en el proyecto.

Tabla 5. Condiciones utilizadas para el proceso de nixtamalización (Hernández Martínez, 2014).

Maíz (g)	Agua (mL)	Cal (g)	Tiempo de cocción (min)	Tiempo de reposo (h)	Agua de lavado (mL)
200 ± 0.1	636 ± 80.9	4 ± 0.03	53 ± 4.7	24 ± 0.0	909 ± 130

Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas del nejayote (Hernández Martínez, 2014).

Propiedad	Valor
pH	11.7 ± 0.81
Sólidos totales en suspensión (%) p/p	2.18 ± 0.78
Sólidos sedimentados (mL/L)	250 ± 50
Azúcares totales nejayote completo (g/L)	6.5 ± 0.04
Azúcares totales nejayote filtrado (g/L)	4.2 ± 0.2
Azúcares reductores nejayote completo (g/L)	0.89 ± 0.026
Azúcares reductores nejayote filtrado (g/L)	0.67 ± 0.008
Concentración del almidón nejayote completo (g/L)	4.35 ± 0.05
Concentración del almidón nejayote filtrado (g/L)	1.38 ± 0.01
Concentración de nitrógeno (g/L)	0.198 ± 0.055

Se utilizaron las cepas *Clavispora lusitanae* Hi2 y FACHp para la producción de lípidos en medio de nejayote y se evaluaron los parámetros mencionados en la Tabla 6 después de 10 días de incubación obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 7.

Tabla 7. Consumo de azúcares reductores, nitrógeno total y producción de lípidos (% en peso seco) de las cepas Hi2 y FACHp en medio de nejayote y en medio limitado en nitrógeno (Hernández Martínez, 2014).

Parámetro evaluado	FACHp		Hi2	
	Medio de nejayote	Medio con nitrógeno limitado	Medio de nejayote	Medio con nitrógeno limitado
Consumo de azúcares reductores	61%	89%	66%	89%
Consumo de nitrógeno total	36%	60%	36%	47%
Producción de lípidos	69%	17%	86%	23%

Flores, 2015, aisló 25 cepas de levaduras y evaluó mediante una prueba semicuantitativa el nivel de producción de lípidos, de las cuales, seleccionaron sólo las cepas con mayor concentración de aceites microbianos unicelulares, que fueron catalogadas como C0, M2, MR1 y M1; obteniendo un rendimiento en biomasa y porcentaje de lípidos de 3.928 g/L, 69.30 % en peso seco; 6.676 g/L, 57.14 %; 2.928 g/L, 97.85 %; 4.856 g/L y 44.08 % respectivamente. También se realizó la identificación molecular de las cepas antes mencionadas, mediante la secuenciación de DNA ribosomal 26S D1/D2 5'-GCATATCAAAAGCGGAGGAAAAG-3' y 5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3', obteniendo que la levadura C0 es una cepa del género *Kluyveromyces marxianus*, la levadura M2 es una cepa del género *Issatchenkia orientalis*, la levadura MR1 es una cepa del género *Candida glabrata*, y la levadura M1 es una cepa del género *Pichia kudriavsevii*.

CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Justificación

Actualmente se comercializan en el mercado los biocombustibles de primera generación, produciendo un incremento de los precios de los productos alimenticios de los que se derivan, además de que exista una competencia por el uso de las tierras de labranza, tanto para siembra con fines alimenticios como para la producción de biocombustibles. Este proyecto de investigación tiene como finalidad la obtención de aceites unicelulares por medio del cultivo de levaduras oleaginosas, capaces de almacenar más del 20% de lípidos, en medios de cultivo elaborados a partir de los residuos agroindustriales, ricos en nutrientes, nejayote y bagazo de caña de azúcar.

La importancia del presente proyecto recae en el uso y combinación de diferentes residuos agroindustriales como fuente de nutrientes para el crecimiento de levaduras oleaginosas y la obtención de altos porcentajes de lípidos para poder transformarlos, en un futuro, en biodiésel e implementarlo como un biocombustible sustentable, generando un aporte a la biotecnología ambiental.

3.2 Hipótesis

Se obtendrá una mayor concentración de lípidos a partir de levaduras oleaginosas mediante su crecimiento en un medio de cultivo formulado a partir de la combinación de los residuos nejayote y bagazo de caña de azúcar, con respecto a los residuos evaluados por separado.

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo general

Evaluar el crecimiento de la levadura oleaginosa *Clavispora lusitaniae* Hi2 y la producción de lípidos al cultivarlas en un medio formulado a partir de los residuos nejayote y bagazo de caña de azúcar.

3.3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar las propiedades nutricionales del nejayote, hidrolizado del sólido de nejayote e hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (cuantificación de azúcares reductores, carbohidratos totales, almidón, proteínas y nitrógeno total).
- Evaluar las tasas de crecimiento de levaduras oleaginosas en medios formulados a partir de nejayote e hidrolizado de bagazo de caña de azúcar con diferentes relaciones carbono/nitrógeno.
- Valorar la producción de lípidos acumulados por la levadura oleaginosa *Clavispora lusitaniae* Hi2 en las formulaciones de medio de cultivo seleccionadas.

CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA

De manera general se planteó la siguiente estrategia experimental desarrollada en el presente proyecto (Fig. 9). Se inició preparando los sustratos, el nejayote, obtenido de la nixtamalización utilizando una relación 1 g de maíz: 3 mL de agua: 0.02 g de cal, y el bagazo de caña de azúcar, proporcionado por el ingenio azucarero de Zacatepec. Se prepararon los hidrolizados y se neutralizaron los sustratos. Posteriormente se caracterizaron los nutrientes y se formularon diferentes relaciones de los medios de cultivo. Finalmente se realizaron cinéticas de crecimiento para evaluar la tasa de crecimiento y al mismo tiempo se evaluó la producción de lípidos y biomasa.

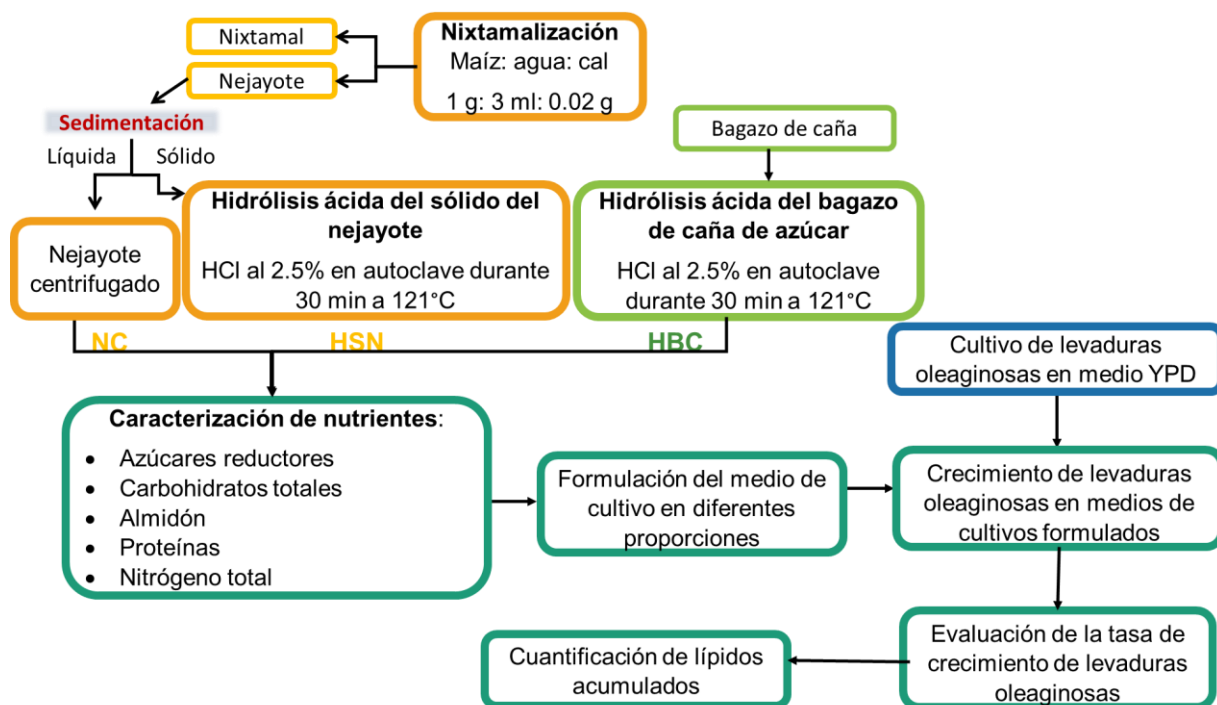


Figura 9. Estrategia experimental general desarrollada en el presente proyecto.

4.1 Materiales

A continuación se enlistan los materiales utilizados en el proyecto.

Levaduras oleaginosas:

- *Cándida lusitaniae* Hi2

Nejayote:

- Cal
- Maíz

Hidrolizado de bagazo de caña:

- Ácido clorhídrico

Acido 3,5-Dinitrosalicílico:

- Hidróxido de Sodio (NaOH)
- Tartrato de sodio (Na) y Potasio (K)
- Ácido 3.5-dinitrosalicílico

Fenol-sulfúrico:

- Fenol (C_6H_6O)
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4)

Reactivo yodo:

- Yodo (I_2)
- Yoduro de Potasio (KI)

Cuantificación de nitrógeno Kjeldahl

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4)
- Tabletas digestoras de 4.98g de K_2SO_4 Y 0.02g de $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$
- Hidróxido de sodio (NaOH) al 32%
- Ácido bórico (H_3BO_3) al 4%

Cuantificación de lípidos

- HCl 4M
- Cloroformo:Metanol 1:1

4.2 Métodos

4.2.1 Preparación del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar

El bagazo de caña de azúcar fue proporcionado por el Corporativo Azucarero Emiliano Zapata, el cual se pasó por una serie de tamices para pruebas físicas, utilizando mallas del número 4, 12, 16, 60 y 140 obteniéndose los rendimientos de cada fracción y siendo las fracciones del tamiz 12 y 16 las empleadas para la hidrólisis.

Se evaluó la extracción de azúcares reductores mediante el análisis de las variables de tiempo (30 y 60 min), concentración del HCl (0.7 y 2.5%) y la proporción g de bagazo de caña de azúcar: mL de HCl (Tabla 8 y 9).

Tabla 8. Experimento 1: Parámetros evaluados en la hidrólisis

Tratamiento	HCl (% v/v)	Relación bagazó:HCl (g:mL)	Tiempo (min)
1	0.7	1:10	30
2	0.7	1:10	60
3	0.7	1:5	30
4	0.7	1:5	60

Tabla 9. Experimento 2: Parámetros evaluados en la hidrólisis

Tratamiento	HCl (% v/v)	Relación bagazó:HCl (g:mL)	Tiempo (min)
1	2.5	1:5	30
2	2.5	1:5	60
3	2.5	1:15	30
4	2.5	1:15	60

El bagazo se colocó en matraces Erlenmeyer y se añadió una solución de ácido clorhídrico (HCl) al 2.5% v/v en proporciones 1:5 (1g de bagazo de caña de azúcar por 5 mL de solución). La hidrólisis se llevó acabo en el autoclave, los matraces fueron sometidos a temperatura de 121°C a 15 psi durante 30 min. Una vez que se finalizó la hidrólisis se recuperó el líquido por decantación, sin embargo, no se logró recuperar el volumen inicial ya que el bagazo de caña absorbe casi el 70% de la solución de HCl, por lo que se realizaron lavados con agua destilada hasta obtener el volumen inicial, después se centrifugó la

muestra obteniendo solamente el sobrenadante, se ajustó el pH a 6.5 y finalmente se guardó en refrigeración hasta su uso.

4.2.2 Proceso de nixtamalización

La obtención del nejayote se realizó siguiendo la metodología del proceso de nixtamalización desarrollada por Hernández (2016), en donde utilizó la relación 1 g maíz: 3 mL agua: 0.02 g cal.

Primero se limpió el maíz, eliminando la tierra y maíz podrido, después se disolvieron 4g de cal en 636 mL de agua hasta desaparecer todos los grumos, posteriormente se agregaron 200g de maíz a la mezcla y se calentó hasta ebullición y se mantuvo así por un periodo de 30 a 60 min (hasta que el pericarpio se desprenda fácilmente), se dejó reposar la mezcla durante un tiempo de 12 a 24 h. Después se drenó el nejayote y en un recipiente se realizó el lavado con 909 mL de agua y con giros suaves para desprender las partículas de la cal, el almidón y restos del pericarpio, posteriormente se dejó que precipitaran los sólidos para después decantar la fase líquida y centrifugar a 7800 rpm durante 30 min (centrifuga 5430 R, rotor F-35-6-30) y por último se guardó en refrigeración hasta su uso (Hernández, 2016).

4.2.3 Preparación del hidrolizado del sólido de nejayote

El nejayote total de la nixtamalización se dejó sedimentar por aproximadamente 30 min, se decantó el sobrenadante, el precipitado se vertió en cápsulas de porcelana y se secó en el horno a 60°C durante aproximadamente 2 días (hasta llegar a peso constante), posteriormente se extrajo el sólido de nejayote con una espátula y se colocó en un frasco hasta su uso.

El sólido de nejayote se colocó en matraces Erlenmeyer y se añadió una solución de ácido clorhídrico (HCl) al 2.5% v/v en proporciones 5:1 (5 mL de solución por 1g del sólido de nejayote). La hidrólisis se llevó a cabo en el autoclave, los matraces fueron sometidos a temperatura de 121°C a 15 psi durante 30 min. Una vez que finalizó la hidrólisis se recuperó el líquido por decantación, sin embargo, no se logró recuperar el volumen inicial ya que el sólido de nejayote absorbe casi toda la solución de HCl, por lo que se realizaron lavados con agua destilada hasta obtener el volumen inicial, después se centrifugó la muestra obteniendo solamente el sobrenadante, se ajustó el pH a 6.5 y finalmente se guardó en refrigeración hasta su uso.

4.2.4 Caracterización del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar, hidrolizado del sólido de nejayote y nejayote centrifugado

Las propiedades nutricionales de los hidrolizados de bagazo de caña de azúcar y nejayote utilizados como medio de cultivo fueron caracterizados mediante la cuantificación de azúcares reductores, carbohidratos totales, almidón, nitrógeno y proteínas; siguiendo las técnicas mencionadas a continuación.

4.2.4.1 Cuantificación de azúcares reductores (técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico)

Para la preparación del reactivo del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) se pesaron: 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 150 g de tartrato de Na-K y 8 g de NaOH. Primero se disolvió el NaOH en 200 mL de agua destilada y se añadió lentamente y en agitación el tartrato de Na-K. Después se aforó con agua destilada hasta 400 mL y se añadió lentamente el ácido 3,5 dinitrosalicílico, se dejó en agitación toda la noche. Al otro día se aforó a 500 mL, se filtró y se guardó en refrigeración (Miller, 1959).

Para el desarrollo de la reacción del DNS con la muestra, se adicionaron 500 µl de muestra y 500 µl del reactivo de DNS en un tubo de ensayo y se colocaron en baño de agua a 100°C durante 5 min. Posteriormente se detuvo la reacción con un baño de agua y hielo. Se le añadieron 5 mL de agua destilada, se agitó y se realizó la lectura a 540 nm en espectrofotómetro (Miller, 1959; Bello Gil *et al.*, 2006; Ávila Núñez *et al.*, 2012).

La concentración de azúcares reductores se determinó utilizando una curva de calibración de absorbancia en función de la concentración. La curva se obtuvo preparando soluciones de 0.5-2 g/L, utilizando glucosa como estándar.

4.2.4.2 Cuantificación de carbohidratos totales (técnica del fenol-ácido sulfúrico)

Se agregó 1 mL de la muestra en un tubo de ensayo, se añadió 1 mL de fenol al 5 % y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, el ácido se colocó en el centro del tubo para obtener una mezcla homogénea. Los tubos se dejaron reposar 10 minutos, posteriormente se agitaron y se colocaron durante 10 minutos en un baño de agua de 25° a 30°C antes de tomar las lecturas. El color es estable por varias horas y las lecturas pueden hacerse más tarde si es necesario. La absorbancia del color amarillo anaranjado característico se midió a 480 nm para las pentosas y los ácidos urónicos (Dubois *et al.*, 1956). Todas las soluciones se prepararon por triplicado para minimizar los errores que resultan de la contaminación accidental.

La cantidad de azúcar se determinó por referencia a una curva patrón previamente construida utilizando dextrosa a concentraciones de 0.25-2 g/L.

4.2.4.3 Cuantificación de almidón (técnica con yodo)

La preparación del reactivo de yodo (I_2 5 mM: KI 50 mM) se realizó adicionando unas gotas de agua destilada, 0.83 g de yoduro de potasio (KI) a un vaso precipitado, después se añadió 0.13 g de yodo I_2 , se disolvió la mezcla a una temperatura no mayor a 20°C, se mezcló hasta disolver por completo agregando poco a poco gotas de agua destilada hasta que todo el yodo quedó homogenizado y finalmente se pasó la solución a un matraz de 100 mL y se aforo (Fuwa, 1954; Xiao *et al.*, 2006).

La cuantificación de almidón se realizó añadiendo 1 mL de muestra con 2.5 mL de reactivo de yodo, se diluyó con 1.5 mL de H_2O destilada y se realizó la lectura de absorbancia a 580 nm.

4.2.4.4 Cuantificación de nitrógeno total

El método Kjeldahl consistió de tres pasos, primero se realizó una digestión, todos los enlaces de nitrógeno orgánico se rompen y se convierten en amonio (NH_4), para esto 10 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) se mezclaron con 20 mL de muestra y se utilizó una pastilla catalizadora compuesta de 4.98 g de K_2SO_4 y 0.02 g de $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$, posteriormente se realizó la destilación, en donde los iones amonio (NH_4^+) se convierten en amoniaco (NH_3) mediante la adición de un álcali (NaOH al 32%), el amoniaco (NH_3) es arrastrado al vaso receptor por medio de una corriente de vapor de agua, el vaso receptor para el destilado se llenó con una solución absorbente de ácido bórico (H_3BO_3 al 4%) y el amoniaco fue capturado cuantitativamente por la solución formando iones amonio solvatados y finalmente se hace la valoración, en donde la concentración de los iones de amonio capturados son determinados por medio de una valoración ácido-base y se calcula el resultado mediante la siguiente formula:

$$\% N = (ceq * (V - VBL) * M * 100 \%) / E$$

donde:

ceq Concentración equivalente de la disolución valorante [mol/l]

V Consumo disolución valorante muestra [l]

VBL Consumo disolución valorante con valor del blanco [l]

M Peso molar nitrógeno [g/mol]

E Peso de la muestra [g]

4.2.5 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó por el método Kjeldahl, previamente descrito, en donde una vez obtenido la concentración de nitrógeno se multiplicó por el factor de proteínas de 6.25.

4.2.6 Formulación de medios de cultivo y evaluación del crecimiento de la levadura *Clavispora lusitaniae* Hi2

Se formularon medios de cultivo a partir del nejayote centrifugado (NC), hidrolizado del sólido de nejayote (HSN) e hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (HBC), así como las mezclas de NC:HSN, HBC:HSN y HBC:NC en relaciones 25:75, 50:50 y 75:25 de cada combinación, se esterilizaron en autoclave por 15 min a 121 °C, posteriormente se centrifugaron en condiciones estériles a 600 rcf durante 20 min para clarificar los medios.

Las primeras cinéticas se realizaron en minireactores RTS-1 y RTS-2 BioSan durante 20 h utilizando un volumen de operación de 25 mL a 2000 rpm y 30 °C midiendo la D.O. a 850 nm. Para esto se preparó un precultivo de *Clavispora lusitaniae* Hi2 en medio YPD de 12 h, posteriormente se ajustó el cultivo a 0.1 de D.O. a 600 nm y se inoculó en relación 1:10, colocando 2.5 mL del precultivo ajustado a 0.1 D.O. en tubo falcón para minireactores RTS Biosan que contenía 22.5 mL de medio.

Posteriormente se evaluaron otras cinéticas a mayores tiempos, 72 y 240 h, se realizaron en matraces de 1 L utilizando un volumen de operación de 250 mL a 200 rpm y 30 °C midiendo la D.O. a 600 nm. Para esto se preparó un precultivo de *Clavispora lusitaniae* Hi2 en medio YPD de 12 h, posteriormente se ajustó el cultivo a 0.1 de D.O. a 600 nm y se inoculó en relación 1:10.

4.2.7 Extracción y cuantificación de los lípidos acumulados por la levadura oleaginosas *Clavispora lusitaniae* Hi2 en las formulaciones de medios seleccionadas

Transcurridos 10 días de cultivo se cuantificó la producción de lípidos mediante la técnica modificada de Bligh y Dyer, 1959 y se llevó a cabo a la par, con la prueba de peso seco del paquete celular con el fin de realizar la determinación del porcentaje de producción de lípidos.

La extracción de lípidos se realizó mediante solventes orgánicos, usando una mezcla de cloroformo y metanol (1:1). Para llevar a cabo la extracción se pesaron 25 mL del cultivo de 10 días y se centrifugó a 4,000 rpm durante 10 minutos a 21°C (centrifuga 5430 R, rotor






F-35-6-30), se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado por triplicado con 6 mL de H₂O destilada fría. Posteriormente se añadieron 5 mL de HCl 4 M y se hidrolizaron a 60 °C durante 2 horas. Transcurrido el tiempo, se agregaron 10 mL de la mezcla de cloroformo/metanol (1:1) y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante un intervalo de 2 a 3 horas. Luego se centrifugaron a 4,000 rpm por 5 minutos a 21°C (centrifuga 5430 R, rotor F-35-6-30), se observó la formación de un sistema trifásico, del cual se extrajo la fase inferior –orgánica- que contiene los lípidos disueltos en cloroformo y se colocó en tubos falcón de 50 mL previamente pesados, se tuvo cuidado de no transferir parte de la fase intermedia integrada por restos celulares ni de la parte superior compuesta por metanol y compuestos hidrosolubles. posteriormente se calientan los tubos destapados en baño caliente a 60 °C hasta evaporar en su totalidad los solventes y se llevó la pasta de lípidos a peso constante, una vez obtenida la diferencia de los pesos se extrapolo el valor con el obtenido de la prueba del peso seco del paquete celular para 25 mL y se obtuvo el porcentaje de lípidos con respecto al peso seco del paquete celular.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS

5.1 Tamizaje del bagazo de caña de azúcar

Con el fin de obtener una materia prima homogénea para la hidrólisis se obtuvieron diferentes tamaños de partícula del bagazo de caña de azúcar, como se muestra en la Tabla 10, las fracciones de bagazo de la malla número 12 y 16 presentan un tamaño de partícula de 1.70 y 1.18 mm, constituyen el 29.14 y 21.10 % del total del bagazo tamizado, respectivamente, y debido a su fácil manipulación son ideales para realizar la hidrólisis ácida.

Tabla 10. Tamizado del bagazo de caña de azúcar.

Malla #4 (4.75mm)	Malla #12 (1.70mm)	Malla #16 (1.18mm)	Malla #60 (106µm)	Malla #140 (250µm)
15.07 %	29.14 %	21.10%	28.64 %	6.03 %
				

5.2 Hidrolizado del bagazo de caña de azúcar

Se probaron diferentes condiciones de hidrólisis para el bagazo de caña de azúcar, en la Tabla 9 se muestran los diferentes tratamientos evaluados, en donde se varió la relación g de bagazo/ mL de HCl (1:5 y 1:10) y el tiempo de hidrólisis (30 y 60 min), la concentración del HCl utilizada fue al 0.7%. En la Figura 10 se observan los resultados de estos ensayos, donde los tratamientos 1 y 2 fueron superiores a los tratamientos 3 y 4, es decir, al duplicar la cantidad de HCl se observó un aumento del 50% en la concentración de azúcares reductores, sin embargo aún era muy poca la cantidad de azúcares reductores obtenida, por lo que se aumentó la concentración del HCl al 2.5%, se modificó la relación g de bagazo/ mL HCl (1:5 y 1:15) y el tiempo de hidrólisis se evaluó a 30 y 60 min (Tabla 10), los resultados

obtenidos se presentan en la Figura 11, donde se puede apreciar que la concentración de azúcares reductores en el tratamiento 1 es similar a los tratamientos 3 y 4, sin embargo en éstos se utiliza una mayor cantidad de HCl y en el tratamiento 2 donde se utiliza la misma relación de g de bagazo/mL de HCl (1:5) pero se aumenta el tiempo de hidrólisis, se obtuvo una disminución de azúcares reductores, por lo que se decidió trabajar con el tratamiento 1.

Tabla 11. Concentración de azúcares reductores en diferentes tratamientos del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar.

Tratamiento	HCl (% v/v)	Relación bagazo:HCl (g:mL)	Tiempo (min)	Concentración de AR/bagazo (g/g)
1	0.7	1:10	30	0.060 ± 0.0007
2	0.7	1:10	60	0.061 ± 0.0004
3	0.7	1:5	30	0.030 ± 0.0004
4	0.7	1:5	60	0.030 ± 0.0005

AR= azúcares reductores

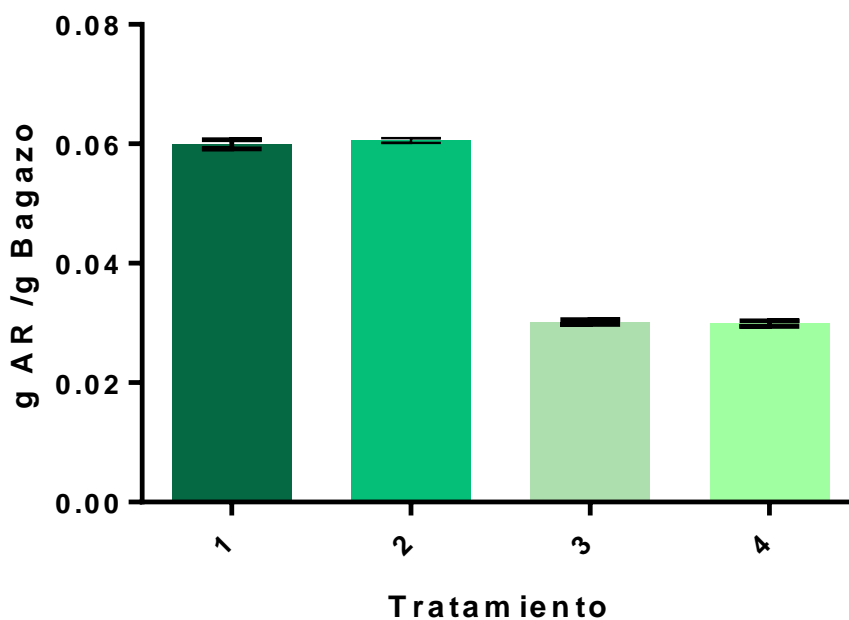


Figura 10. Concentración de azúcares reductores obtenidas del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar evaluando la relación 1:10 (1 y 2) y 1:5 (3 y 4) g bagazo: mL HCl al 0.7% y el tiempo de 30 (1 y 3) y 60 (2 y 4) min en el proceso de hidrólisis.

Tabla 12. Concentración de azúcares reductores (AR) en diferentes tratamientos del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar.

Tratamiento	HCl (% v/v)	Relación bagazó:HCl (g:mL)	Tiempo (min)	Concentración de AR/bagazo (g/g)
1	2.5	1:5	30	0.11 ± 0.02
2	2.5	1:5	60	0.08 ± 0.01
3	2.5	1:15	30	0.12 ± 0.00
4	2.5	1:15	60	0.12 ± 0.00

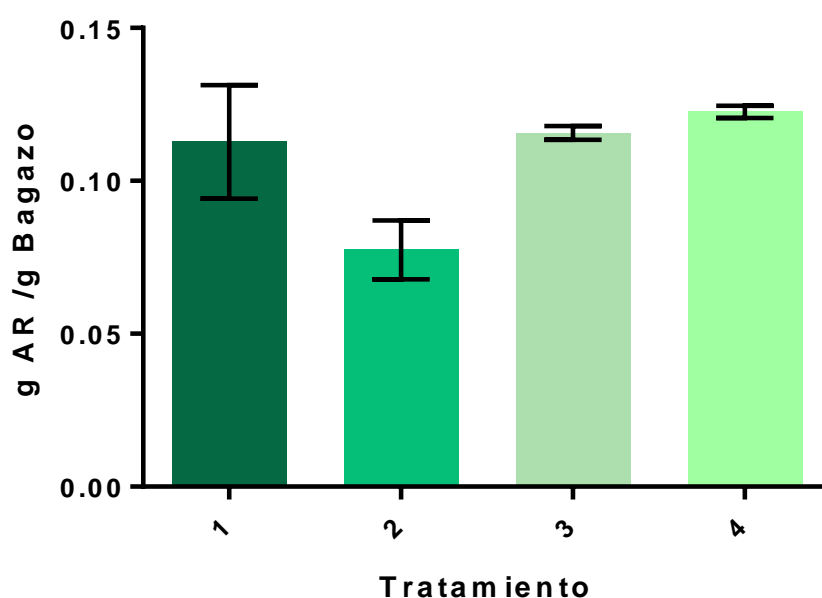


Figura 11. Concentración de azúcares reductores obtenidas del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar evaluando la relación 1:5 (1 y 2) y 1:15 (3 y 4) g bagazo: mL HCl al 2.5% y el tiempo de 30 (1 y 3) y 60 (2 y 4) min en el proceso de hidrólisis.

5.3 Caracterización nutricional de los sustratos

Las propiedades nutricionales del nejayote centrifugado (NC), hidrolizado del sólido de nejayote (HSN) e hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (HBC) se presentan en la Tabla 13, mostrando la concentración de azúcares reductores, carbohidratos totales, almidón, proteína y nitrógeno total, todas las cuantificaciones se realizaron por triplicado.

Al hidrolizar el sólido de nejayote se aumenta la producción de azúcares reductores más de 100 veces con respecto al nejayote centrifugado, superando también al HBC, la cantidad de carbohidratos totales del HBC es dos veces menor que el HSN, la cantidad del

almidón es similar en el NC y HSN, la cantidad de nitrógeno es mayor en el HSN con respecto al NC y HBC (Tabla 13 y 14). En general el HSN presentó un contenido de nutrientes superior a los otros dos sustratos (HBC y NC), por lo que puede concluirse que al hidrolizar los sólidos de nejayote se puede obtener una mayor cantidad de azúcares reductores que en el NC, lo que hace que este residuo sea más atractivo para el desarrollo de fermentaciones de interés comercial.

Tabla 13. Propiedades nutricionales del nejayote centrifugado (NC), hidrolizado del sólido de nejayote (HSN) e hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (HBC).

Propiedad	NC	HSN	HBC
Azúcares reductores (g/L)	0.11 ±0.01	40.50 ±1.70	27.20 ±3.17
Azúcares totales (g/L)	18.88 ±2.00	67.54 ±10.50	38.00 ±5.30
Almidón (g/L)	0.23 ±0.03	0.25 ±0.07	0.15 ±0.03
Proteína (g/L)	0.70 ±0.10	4.12 ±0.66	0.95 ±0.03
Nitrógeno total (g/L)	0.11 ±0.02	0.65 ±0.01	0.15 ±0.00

Tabla 14. Propiedades nutricionales del hidrolizado del sólido de nejayote (HSN) e hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (HBC) (g de propiedad/ g de sustrato).

Propiedad	HSN	HBC
Azúcares reductores (g/g)	0.202 ±0.008	0.14 ±0.01
Azúcares totales (g/g)	0.34 ±0.0525	0.20 ±0.03
Almidón (mg/g)	1.2 ±0.37	0.8 ±0.00
Proteína (mg/g)	20 ±3.31	4.79 ±0.18
Nitrógeno total (g/g)	2.29 ±0.53	0.76 ±0.0

5.4 Crecimiento de la levadura *Clavispora lusitaniae* Hi2 en los medios formulados a partir de los hidrolizados durante 20 horas de incubación en minireactores BioSan.

Las cinéticas de crecimiento obtenidas de la levadura *Clavispora lusitaniae* Hi2 en los medios YPD, NC, HSN e HBC en minireactores RTS BioSan, se presentan en las Figuras 12, 13 y 14.

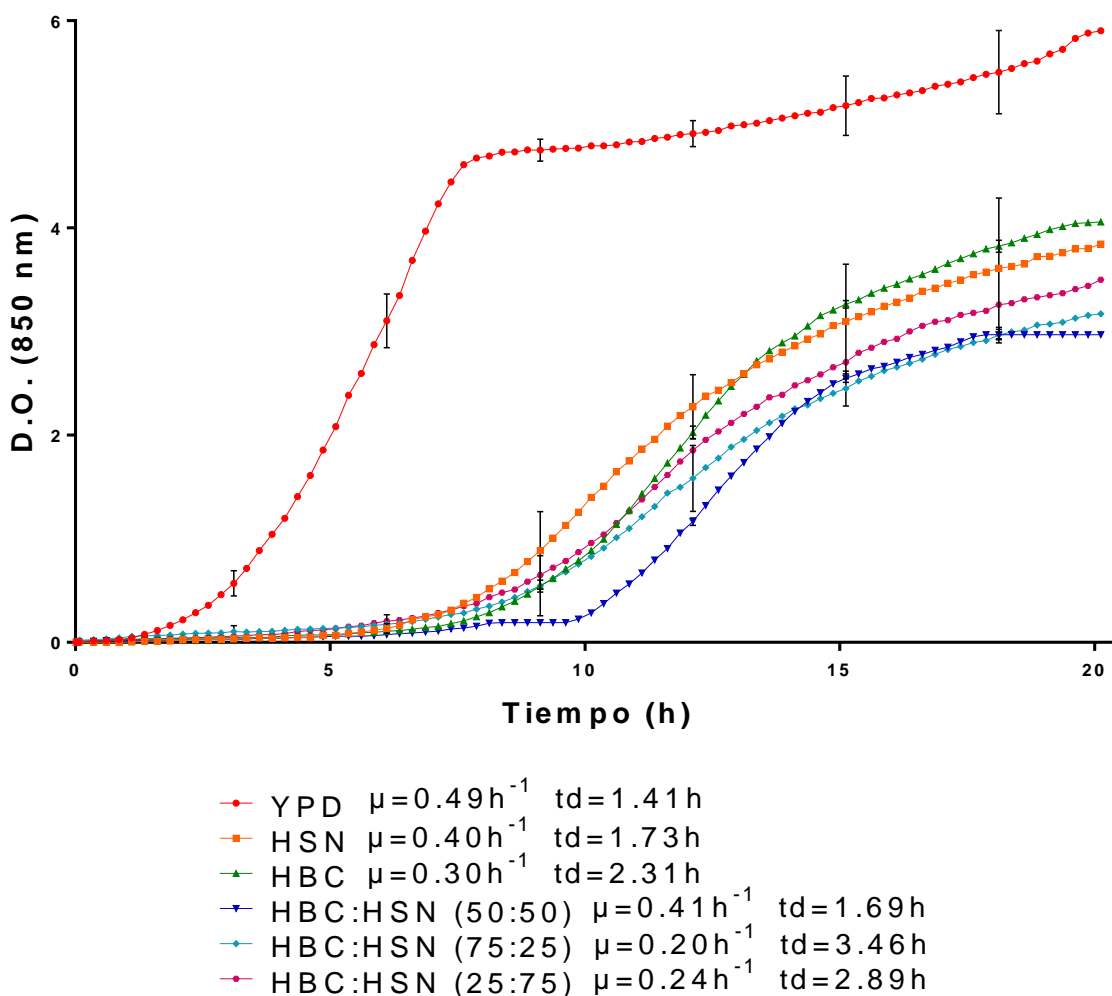


Figura 12. Cinéticas de crecimiento de la levadura *Clavispora lusitanae* Hi2 en los medios de cultivo formulados a partir de los hidrolizado del sólido de nejayote (HSN) e hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (HBC), evaluadas en minireactor RTS BioSan durante 20 h a 30°C.

Las cinéticas de crecimiento de *Clavispora lusitanae* Hi2 en los medios de cultivo formulados a partir de la combinación del HBC con el HSN en relaciones 25:75, 50:50 y 75:25 se presentan en la Figura 12, el medio en donde se observa la mayor velocidad de crecimiento fue el HBC:HSN (50:50) con 0.41 h^{-1} y un tiempo de duplicación de 1.69 h, en contraste con el medio HBC:HSN (75:25) que presenta la menor velocidad de crecimiento de 0.20 h^{-1} , aumentando así el tiempo de duplicación a 3.46 h. En la Figura 13 podemos observar el crecimiento de *Clavispora lusitanae* Hi2 en los medios de cultivo formulados a partir de la combinación del HBC con NC en las mismas relaciones (25:75, 50:50 y 75:25),

en donde el medio formulado por HBC:NC (25:75) presentó la menor velocidad de crecimiento de 0.05 h^{-1} , en las combinaciones del HBC con NC se observó una complementación de nutrientes al adicional al NC el HBC, sin embargo, el crecimiento máximo en las otras dos formulaciones es inferior al observado en el medio que sólo contiene HBC.

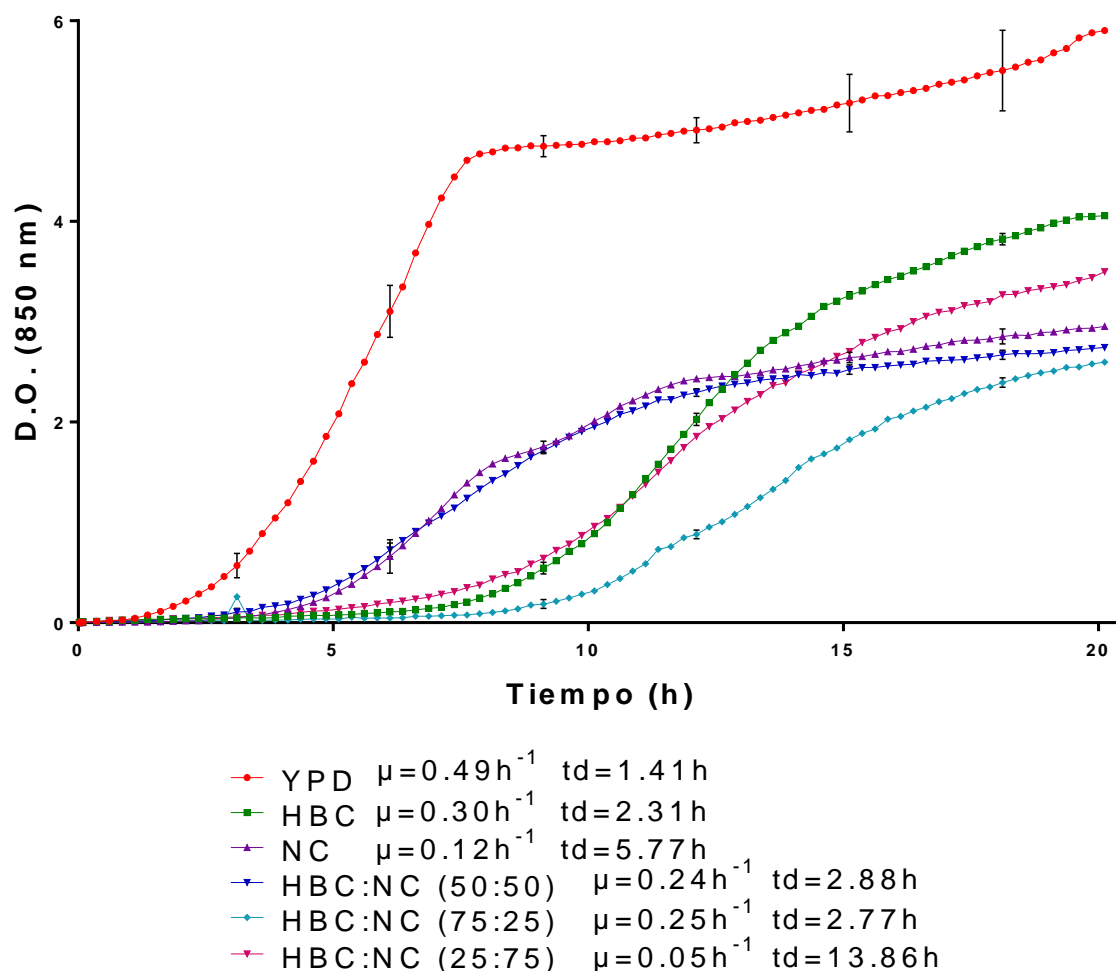


Figura 13. Cinéticas de crecimiento de la levadura *Clavispora lusitanae* Hi2 en los medios de cultivo formulados a partir de los hidrolizado de bagazo de caña (HBC) y nejayote centrifugado (NC), evaluadas en minireactor RTS BioSan durante 20 h a 30°C .

Las cinéticas de crecimiento de *Clavispora lusitanae* Hi2 en los medios de cultivo formulados a partir de la combinación del NC e HSN en relaciones 25:75, 50:50 y 75:25, se muestran en la Figura 14. El medio donde se presentó la mayor velocidad de crecimiento fue el NC:HSN (75:25) con 0.45 h^{-1} y un tiempo de duplicación de 1.54 h, datos muy cercanos al

medio YPD. Al combinar estos dos hidrolizados se obtuvieron formulaciones de medios de cultivo que favorecieron el crecimiento, superando a los medios formulados a partir de los hidrolizados por separado.

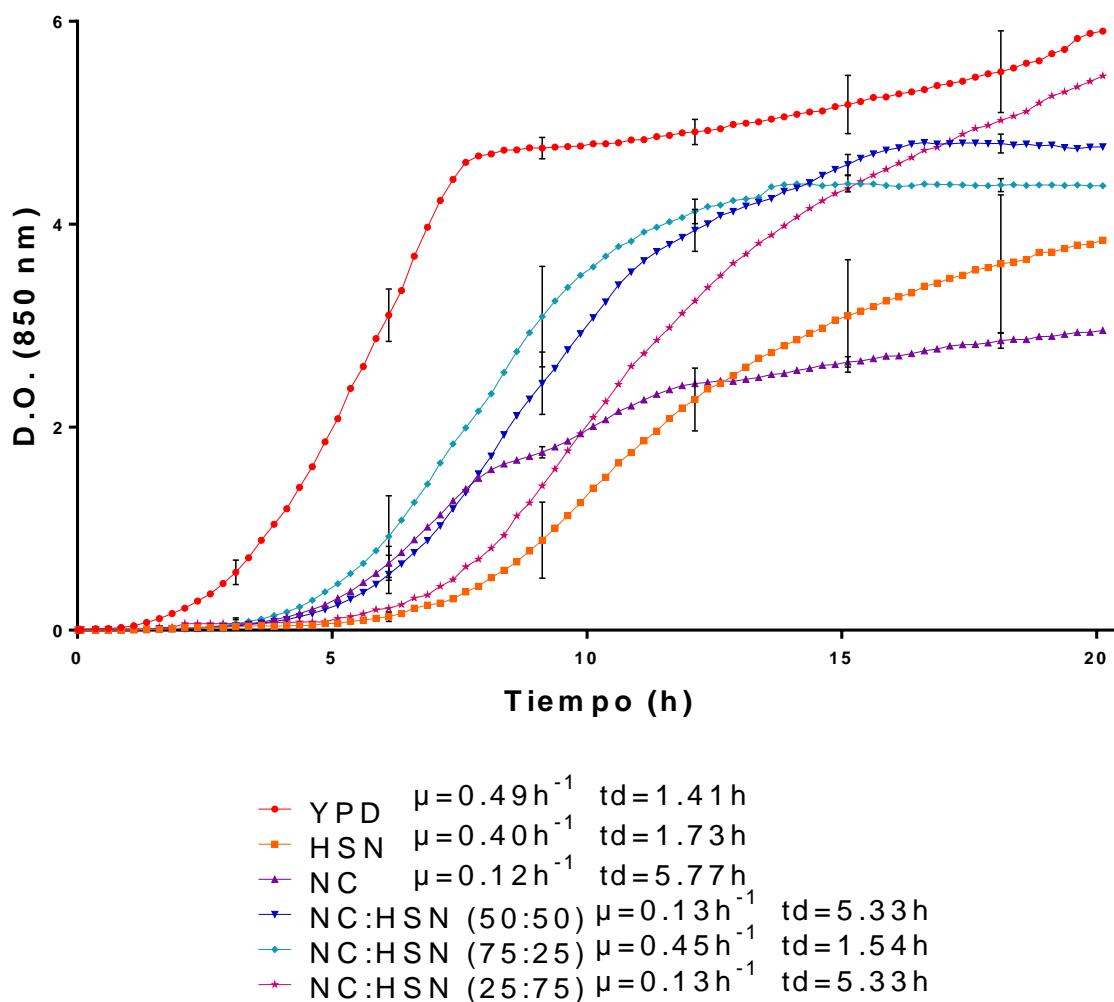


Figura 14. Cinéticas y velocidades de crecimiento de la levadura *Clavispora lusitanae* Hi2 en los medios de cultivo formulados a partir de nejayote centrifugado (NC) e hidrolizado del sólido de nejayote (HSN), evaluadas en minireactor RTS BioSan durante 20 h a 30°C.

A partir de la revisión de las cinéticas obtenidas se puede concluir que *Clavispora lusitanae* Hi2 adquirió del NC, HSN e HBC las fuentes de carbono y nitrógeno para su crecimiento, lo cual se verificó mediante la cuantificación de azúcares reductores y producción de biomasa a las 20 h como se reporta en la Tabla 15.

Tabla 15. Producción de biomasa, lípidos y consumo de azúcares reductores a las 20 h de crecimiento de *Clavispora lusitaniae* Hi2 en los diferentes medios formulados. En la tabla se incluye el análisis estadístico de los resultados de biomasa y lípidos para establecer si existen diferencias significativas entre los tratamientos realizados.

MEDIO	BIOMASA (g/L) (X±DS)	LÍPIDOS (g/L) (X±DS)	LÍPIDOS (%) (X±DS)	CONSUMO DE AZÚCARES REDUCTORES (%) (X±DS)
YPD	5.67 ± 0.71 ^a	0.84 ± 0.11 ^{ab}	15 ± 0.01	90.9 ± 0.13
HSN	3.80 ± 0.49 ^{cd}	0.77 ± 0.08 ^{abc}	21 ± 0.04	59.04 ± 1.85
HBC	3.07 ± 0.73 ^{cde}	0.55 ± 0.42 ^{abcd}	16 ± 0.11	11.22 ± 5.22
NC	1.93 ± 0.24 ^e	0.71 ± 0.07 ^{abcd}	37 ± 0.05	1.01 ± 0.00
NC:HSN (50:50)	3.84 ± 0.21 ^{bcd}	0.99 ± 0.09 ^a	26 ± 0.01	69.82 ± 1.21
NC:HSN (75:25)	3.14 ± 0.45 ^{cde}	0.93 ± 0.16 ^{ab}	31 ± 0.00	78.28 ± 2.32
NC:HSN (25:75)	5.60 ± 0.28 ^{ab}	0.67 ± 0.44 ^{abcd}	12 ± 0.08	91.36 ± 11.21
HSN:HBC (50:50)	4.10 ± 0.36 ^{bcd}	0.73 ± 0.11 ^{abcd}	18 ± 0.04	15.96 ± 4.36
HSN:HBC (75:25)	4.45 ± 0.48 ^{abc}	0.19 ± 0.11 ^{bcd}	4 ± 0.03	74.83 ± 0.65
HSN:HBC (25:75)	2.63 ± 0.66 ^{de}	0.17 ± 0.09 ^{cd}	7 ± 0.06	82.93 ± 2.66
HBC:NC (50:50)	1.93 ± 0.10 ^e	0.15 ± 0.08 ^d	8 ± 0.05	92.03 ± 0.71
HBC:NC (75:25)	2.38 ± 0.45 ^e	0.36 ± 0.11 ^{bcd}	15 ± 0.03	30.80 ± 20.41
HBC:NC (25:75)	4.29 ± 0.09 ^{abc}	0.13 ± 0.0 ^{cd}	3 ± 0.00	82.07 ± 2.01

Medias con letras iguales dentro de la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

La mayor producción de biomasa se obtuvo en el medio YPD con 5.67 g/L, seguido de los medios de NC:HSN (25:75) y HSN:HBC (75:25) con 5.60 ± 0.28 y 4.45 ± 0.48 g/L, respectivamente. En los medios formulados a partir de NC:HSN y HSN:HBC se observa la tendencia de que a mayor proporción de HSN mayor es la biomasa que se obtiene. Por otro lado, el medio compuesto por NC:HSN (50:50) es el que presentó la mayor producción de lípidos con 0.99 ± 0.09 g/L, seguido de los medios NC:HSN (75:25) y YPD con 0.93 ± 0.16 y 0.84 ± 0.11 g/L, respectivamente. Sin embargo, en cuestión de rendimiento lípidos/biomasa el mayor porcentaje con un 37 %, se presenta en el medio NC seguido de NC:HSN (75:25) y NC:HSN (50:50) con 31 y 26 %, respectivamente. En la mayoría de los medios formulados

no se presentó, a las 20 h de incubación, el consumo total de las azúcares reductores (Tabla 15).

Mediante la elaboración de gráficos ternarios se evaluó el comportamiento en respuesta a las variables de biomasa (g/L) (Figura 15), lípidos (g/L) (Figura 16) y porcentaje de lípidos por biomasa seca (%) (Figura 17) que presentan los hidrolizados (HBC, HSN y NC) de manera individual y al combinarse en mezclas binarias, utilizándolos como medios de cultivo para *Clavispora lusitaniae* Hi2, en donde el área roja en los gráficos indican la mejor respuesta posible de la variable evaluada en el experimento. En la Figura 15 se evaluó la producción de biomasa (g/L) obteniendo la mejor respuesta en una concentración mayor al 56.5 % y menor al 78 % del HSN, mayor al 8 % y menor al 31.5 % del NC y menor al 24 % para el HBC. En la Figura 16 se evaluó la producción de lípidos (g/L) consiguiendo la mayor producción a concentraciones mayores al 24 % y menores al 77 % del HSN, mayores al 33 % y menores al 77 % del NC y menores al 13 % para el HBC y en la Figura 17 se evaluó la producción de lípidos por biomasa seca (%) logrando la mejor respuesta en concentraciones menores al 17 % del HSN, mayores al 84 % del NC y menores al 6 % del HBC. A partir de estos resultados se pueden formular mejores medios, a partir de los residuos agroindustriales evaluados, para el cultivo de *Clavispora lusitaniae* Hi2 y la producción de biomasa y lípidos, ya sea mediante una mezcla binaria o ternaria de los residuos.

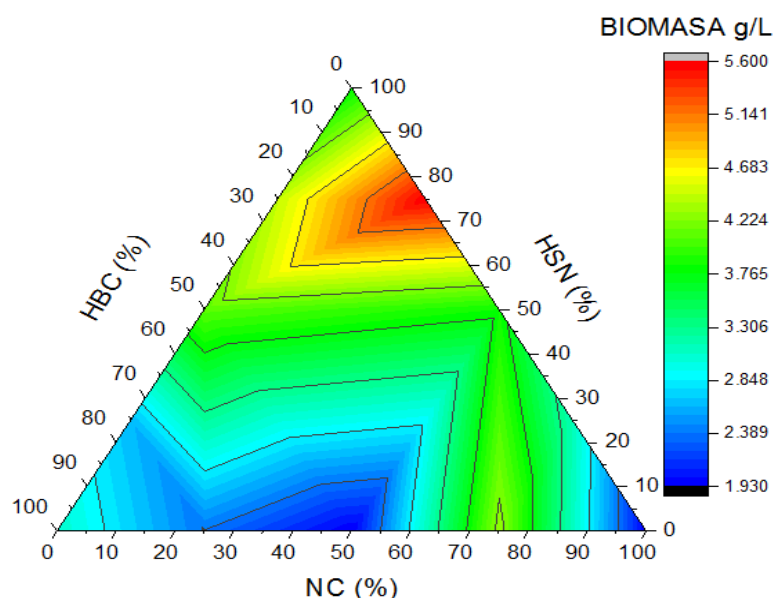


Figura 15. Gráficos ternarios del comportamiento de la variable de biomasa, utilizando hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (HBC), hidrolizado del sólido de nejayote (HSN) y nejayote centrifugado (NC) como medio de cultivo para *Clavispora lusitaniae* Hi2. El área roja en los gráficos ternarios significa la mejor respuesta posible de la variable buscada en el proceso.

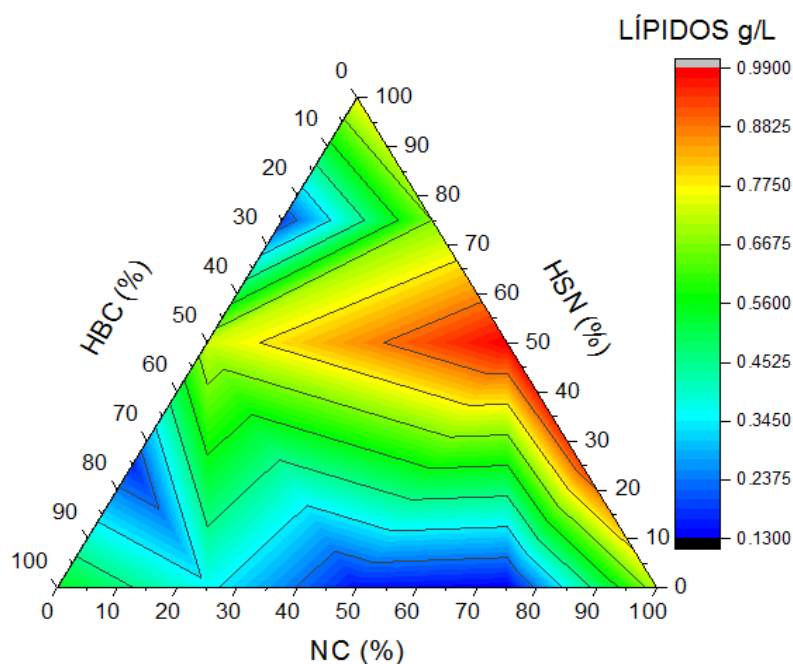


Figura 16. Gráfico ternario del comportamiento de la variable lípidos (g/L), utilizando hidrolizado de bagazo de caña de azúcar, hidrolizado del sólido de nejayote y nejayote centrifugado como medio de cultivo para *Clavispora lusitaniae* Hi2. El área roja en los gráficos ternarios significa la mejor respuesta posible de la variable buscada en el proceso.

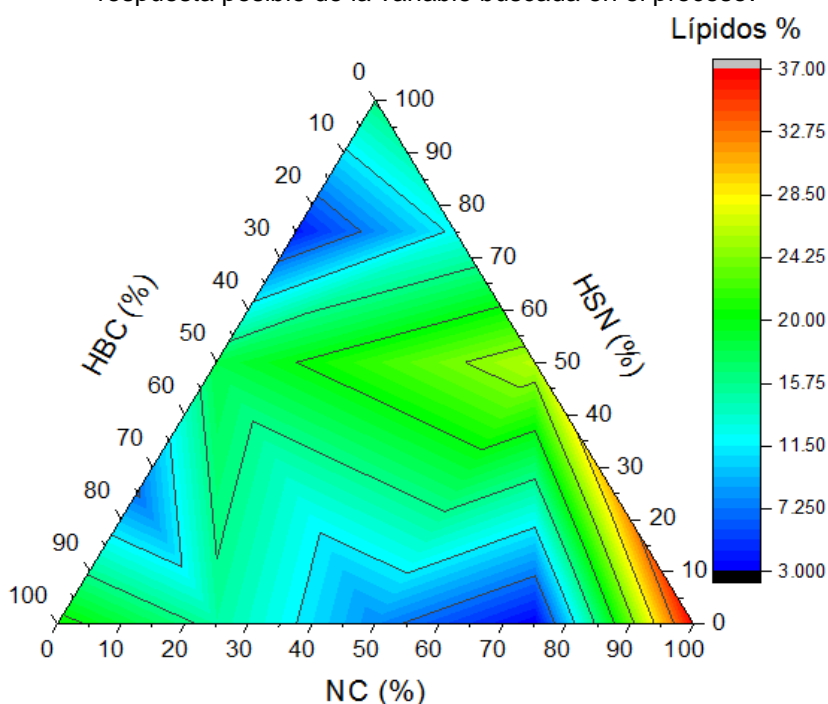


Figura 17. Gráficos ternarios del comportamiento de la variable de lípidos por biomasa seca (%), utilizando hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (HBC), hidrolizado del sólido de nejayote (HSN) y nejayote centrifugado (NC) como medio de cultivo para *Clavispora lusitaniae* Hi2. El área roja en los gráficos ternarios significa la mejor respuesta posible de la variable buscada en el proceso.

5.5 Evaluación de crecimiento de la levadura *Clavispora lusitaniae* Hi2 en los medios formulados a partir de los hidrolizados durante 72 horas de incubación

Las cinéticas de crecimiento de *Clavispora lusitaniae* Hi2 durante 72 h en diferentes medios se muestra en la Figura 18, se evaluaron los medios formulados por la combinación de nejayote centrifugado (NC), hidrolizado de los sólidos de nejayote (HSN) e hidrolizado de bagazo de caña (HBC). El HSN (línea naranja) presenta un crecimiento diauxico debido a que se observan tres fases de crecimiento exponencial, lo mismo paso con la cinética de NC:HSN (75:25), que presenta dos fases de crecimiento exponencial, esto se debe a que el medio tiene diferentes tipos de fuentes de carbono como: xilosa, arabinosa, glucosa, galactosa, entre otros carbohidratos que se liberan durante la hidrólisis a partir de la hemicelulosa y celulosa y que la cepa *Clavispora lusitaniae* Hi2 fue capaz de consumir para su crecimiento.

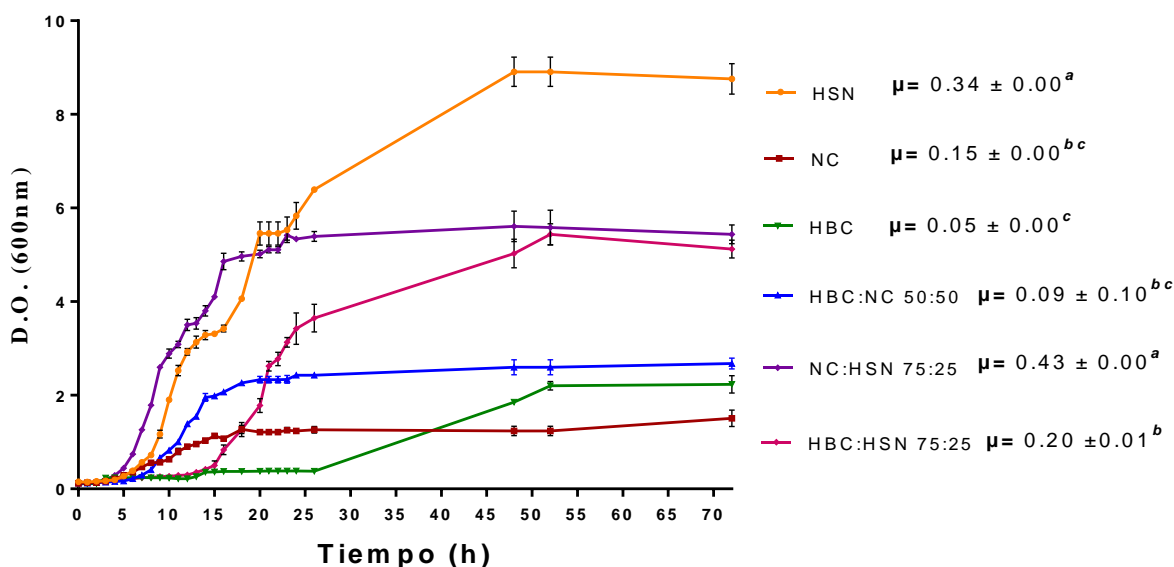


Figura 18. Cinética de crecimiento de la levadura *Clavispora lusitaniae* Hi2 en los medios formulados por la combinación de nejayote centrifugado (NC), hidrolizado de los sólidos de nejayote (HSN), hidrolizados de bagazo de caña (HBC) y sus combinaciones.

El medio de HSN es en el que se obtuvo la mayor producción de biomasa y de lípidos 10.61 ± 0.07 y 0.43 ± 0.12 respectivamente, sin embargo, no presenta un alto porcentaje de producción de lípidos (4%), por otro lado el NC es el medio en el que se presentan los mayores porcentajes de lípidos, de 57, 20 y 33% a las 24, 48 y 72 h respectivamente, hubo una disminución de lípidos a las 48 h, sin embargo, a las 72 h aumenta pero sin alcanzar la cantidad que presentó a las 24 h pero con respecto a la concentración en g/L la producción de lípidos si aumentó rebasando la concentración inicial. Con respecto al consumo de

azúcares reductores, después de 72 h, se presenta una disminución de la concentración de estos azúcares reductores de entre 38 y 68% lo que indica que la levadura podría seguir consumiendo el remanente de azúcares reductores, después de las 72 h, y obtener una mayor concentración de lípidos (Tabla 16).

Tabla 16 Producción de biomasa, lípidos y consumo de azúcares reductores (AR).

HORA	MEDIO	BIOMASA g/L (X±DS)	LÍPIDOS g/L (X±DS)	LÍPIDOS % (X±DS)	CONSUMO DE AR % (X±DS)
24	NC	0.42 ±0.19	0.32 ±0.06	57%	44%
	HSN	5.46 ±0.26 ^b	0.35 ±0.11	7%	46%
	HBC	1.25 ±0.02	0.02 ±0.01	2%	21%
	HBC:NC (50:50)	1.51 ±0.15	0.26 ±0.02	15%	59%
	NC:HSN (75:25)	2.92 ±0.05	0.13 ±0.08	4%	54%
	HBC:HSN (75:25)	3.36 ±0.05	0.19 ±0.08	6%	31%
48	NC	1.06 ±0.01	0.21 ±0.03	20%	45%
	HSN	9.05 ±0.16 ^a	0.21 ±0.09	2%	58%
	HBC	2.90 ±0.14	0.21 ±0.10	8%	26%
	HBC:NC (50:50)	2.61 ±0.10	0.18 ±0.11	7%	64%
	NC:HSN (75:25)	3.17 ±0.12	0.18 ±0.01	6%	58%
	HBC:HSN (75:25)	4.48 ±0.23	0.21 ±0.03	5%	44%
72	NC	1.14 ±0.01	0.38 ±0.07	33%	41%
	HSN	10.61 ±0.07 ^a	0.43 ±0.12	4%	68%
	HBC	2.72 ±2.33	0.13 ±0.04	3%	34%
	HBC:NC (50:50)	2.58 ±0.14	0.32 ±0.13	12%	66%
	NC:HSN (75:25)	3.42 ±0.22	0.14 ±0.04	4%	60%
	HBC:HSN (75:25)	5.62 ±0.73 ^b	0.13 ±0.04	3%	46%

Medias con letras iguales dentro de la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

5.6 Evaluación de crecimiento de la levadura *Clavispora lusitaniae* Hi2 en los medios formulados a partir de los hidrolizados durante 240 horas de incubación

El crecimiento de *Clavispora lusitaniae* Hi2 en los medios formulados a partir de nejayote centrifugado (NC), hidrolizado de los sólidos de nejayote (HSN), hidrolizados de bagazo de caña (HBC) y combinaciones de NC:HSN se presentan en la Figura 19, las cinéticas compuestas de HSN presentan un crecimiento aparentemente diaúxico, se observan tres crecimientos exponenciales lo que indica que la cepa es capaz de asimilar diferentes fuentes de carbono, así mismo el medio de HBC presenta un crecimiento diaúxico, sin embargo, en este medio la levadura presenta una fase de adaptación muy larga además su crecimiento fue menor en comparación con los medios formulados a partir de HSN.

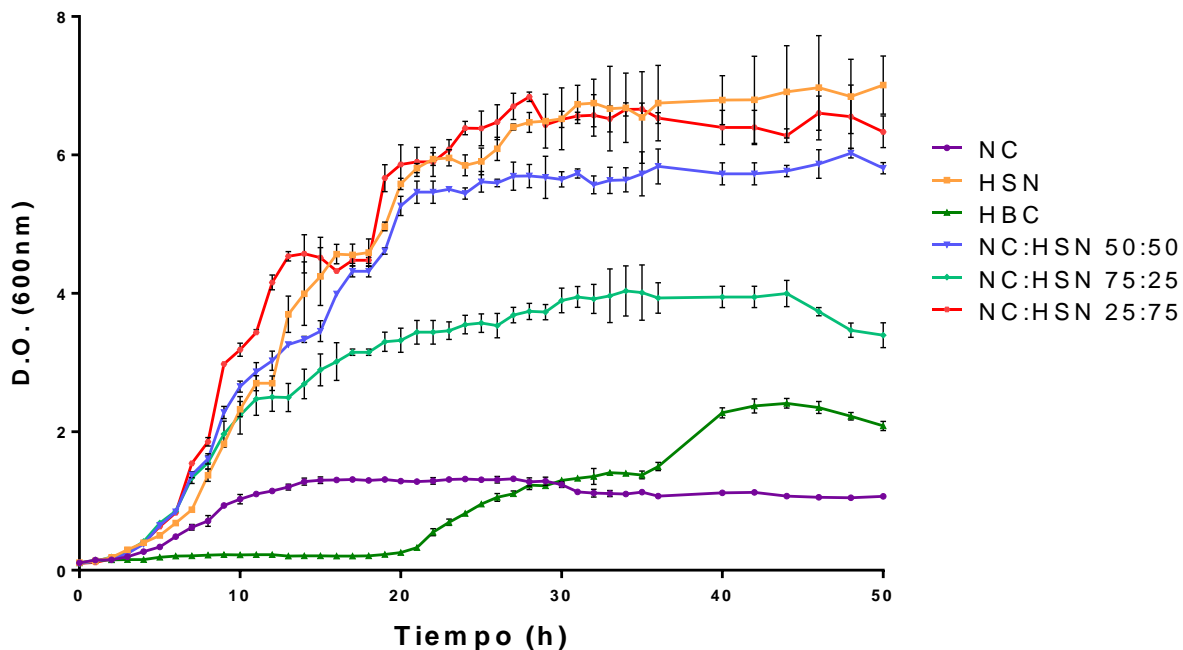


Figura 19. Cinética de crecimiento de la levadura *Clavispora lusitaniae* Hi2 en los medios formulados a partir de nejayote centrifugado (NC), hidrolizado de los sólidos de nejayote (HSN) e hidrolizado de bagazo de caña (HBC) y combinaciones de NC:HSN, durante 50 horas a 30°C.

El HBC presentó la mayor relación C:N con 110.55 mol:mol (tabla 17), sin embargo, fue en el que se presentó el menor crecimiento, a las 240 h se obtuvo una biomasa de 3.09 ± 0.25 g/L y 0.26 ± 0.17 g/L de lípidos (tabla 18), en comparación con el medio formulado de HSN que presentó una relación C:N 10 veces menor (tabla 17), se obtuvo mayor biomasa 7.80 ± 1.39 g/L (tabla 18). La gran diferencia de biomasa y lípidos que existe entre estos medios pudo deberse a la cantidad de tóxico, tales como el fufural y el 5-hidroximetilfufural,

que podría presentarse en el HBC debido a que es un material con mayor proporción de lignina en comparación del HSN. Papanikolaou *et al.*, 2003 y Fakas *et al.*, 2009 reportan altas relaciones de C:N, de 175 y 117 respectivamente, obteniendo rendimiento de 11.4 y 4.0 g/L de biomasa y 3.4 y 1.9 g/L de lípidos respectivamente, sin embargo, Pan *et al.*, 2009. utiliza una relación C:N de 38 mol:mol, menor a las reportadas por Papanikolaou *et al.*, 2003 y Fakas *et al.*, 2009, obteniendo en algunos casos una producción mayor, la relación C:N va depender tanto de la cepa y la condiciones de crecimiento para obtener altos rendimiento de biomasa y lípido.

Tabla 17. Concentraciones de azúcares reductores (AR) y nitrógeno total de los medios formulados y su relación carbono:nitrógeno.

Medio	Azúcares reductores (g/L)	Nitrógeno (g/L)	C:N (mol:mol)
NC	0.10	0.10	0.48
HBC	37.90	0.16	110.55
HSN	13.38	0.54	11.60
NC:HSN 50:50	4.02	0.32	5.90
NC:HSN 25:75	6.68	0.43	7.28
NC:HSN 75:25	2.17	0.21	4.88

Tabla 18 Producción de biomasa, lípidos y consumo de azúcares reductores de la levadura *Clavispora lusitaniae* Hi2 durante 240 horas de incubación.

Horas	Medio	Biomasa (g/L) (X±DS)	Lípidos (g/L) (X±DS)	Lípidos (%) (X±DS)	Consumo de AR (%) (X±DS)
72	NC	0.71 ±0.22 ^d	0.15 ±0.05 ^a	23	0.00
	HSN	6.53 ±1.30 ^a	0.55 ±0.30 ^a	8	60.53
	HBC	2.92 ±0.56 ^{bc}	0.13 ±0.08 ^a	4	48.84
	NC:HSN (25:75)	5.24 ±0.05 ^{ab}	0.38 ±0.16 ^a	7	69.44
	NC:HSN (50:50)	3.79 ±0.33 ^{bc}	0.50 ±0.44 ^a	13	73.39
	NC:HSN (75:25)	2.49 ±0.23 ^{cd}	0.18 ±0.12 ^a	7	57.66
120	NC	0.89 ±0.11 ^e	0.10 ±0.03 ^a	11	0.00
	HSN	7.58 ±0.33 ^a	0.29 ±0.15 ^a	4	63.97
	HBC	2.92 ±0.30 ^{cd}	0.29 ±0.23 ^a	12	60.42
	NC:HSN (25:75)	4.63 ±0.80 ^b	0.23 ±0.05 ^a	5	71.24
	NC:HSN (50:50)	4.22 ± 0.67 ^{bc}	0.41 ±0.15 ^a	11	75.13
	NC:HSN (75:25)	2.63 ±0.23 ^d	0.20 ±0.13 ^a	8	59.04
192	NC	0.89 ±0.14 ^d	0.17 ±0.01 ^c	20	0.00
	HSN	8.31 ±1.50 ^a	0.68 ±0.07 ^a	8	64.12
	HBC	2.79 ±0.37 ^c	0.44 ±0.05 ^{ab}	16	70.48
	NC:HSN (25:75)	5.13 ±0.08 ^b	0.32 ±0.03 ^{bc}	6	73.49
	NC:HSN (50:50)	4.98 ±0.23 ^b	0.21 ±0.10 ^{bc}	3	76.38
	NC:HSN (75:25)	3.14 ±0.22 ^c	0.28 ±0.17 ^{bc}	9	75.61
240	NC	0.99 ±0.20 ^e	0.19 ±0.13 ^a	19	0.00
	HSN	7.80 ±1.39 ^a	0.30 ±0.19 ^a	4	64.57
	HBC	3.09 ±0.25 ^d	0.26 ±0.17 ^a	8	72.90
	NC:HSN (25:75)	5.04 ±0.16 ^b	0.19 ±0.15 ^a	4	92.96
	NC:HSN (50:50)	4.81 ±0.29 ^{bc}	0.13 ±0.03 ^a	3	97.02
	NC:HSN (75:25)	3.19 ±0.22 ^{cd}	0.27 ±0.23 ^a	9	95.86

Medias con letras iguales dentro de la misma columna en la misma hora no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

La disminución de la demanda química de oxígeno con respecto al crecimiento de *Clavispora lusitaniae* Hi2 durante diez días de incubación en los medios NC, HSN, HBC, NC:HSN 25:75, NC:HSN 50:50 y NC:HSN 75:25 se presentan en la Figura 20, donde se observa una disminución de más del 35% de la demanda química de oxígeno, esto nos indica que *Clavispora lusitaniae* Hi2 fue capaz de oxidar la materia orgánica e inorgánica contenida en los sustratos para su crecimiento.

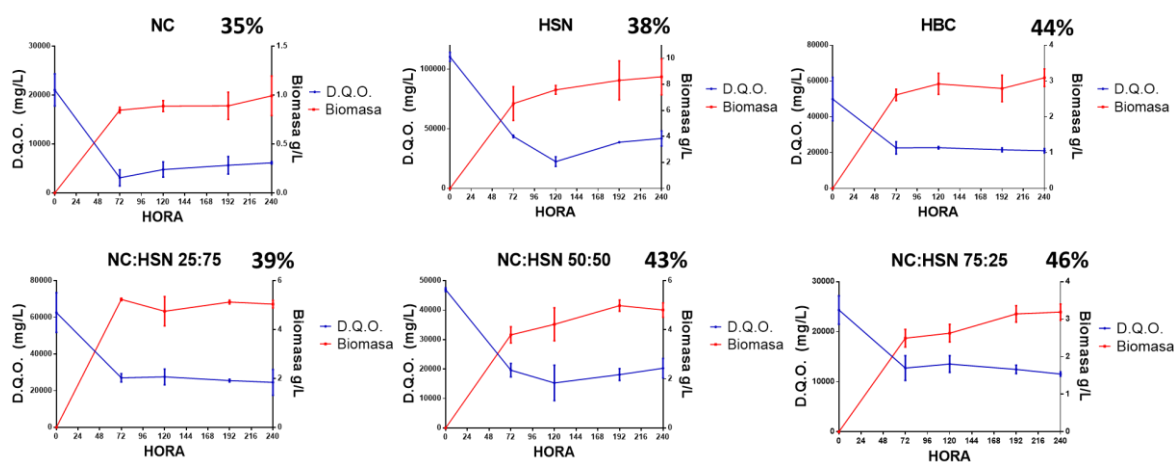


Figura 20. Demanda química de oxígeno durante el crecimiento de *Clavispora lusitaniae* Hi2 en los medios de nejayote centrifugado (NC), hidrolizado del sólido de nejayote (HSN), hidrolizado de bagazo de caña (HBC), NC:HSN 25:75, NC HSN 50:50 y NC:HSN 75:25 durante 240 h.

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN

6.1 Caracterización de los nutrientes de los sustratos

El nejayote centrifugado presentó bajo contenido de azúcares reductores (0.11 ± 0.01 g/L), esto también fue reportado por García Depraect *et al.*, 2016 y Ramírez Romero *et al.*, 2013 obteniendo concentraciones de 0.148 y 0.16-0.88 g/L, respectivamente. Esto puede deberse a que las condiciones del proceso alcalino al que se somete al maíz no hidrolizan la celulosa y hemicelulosa del pericarpio, que al centrifugar el nejayote se separan obteniendo sólo el sobrenadante, que representa una gran cantidad de agua y poca materia orgánica. En cambio al realizar la hidrólisis ácida de los sólidos del nejayote se obtuvo una mayor concentración de azúcares reductores (40.50 ± 1.70 g/L) y carbohidratos totales (67.54 ± 10.50 g/L), debido al rompimiento de la celulosa y hemicelulosa del pericarpio del maíz. En cuanto al nitrógeno total obtenido del nejayote centrifugado éste presentó concentraciones bajas (0.11 ± 0.02 g/L) en comparación con los resultados de España Gamboa *et al.*, 2018 y García Depraect *et al.*, 2016 que obtuvieron 0.209 y 0.359 g/L, respectivamente, López Pacheco *et al.*, 2019 presentó resultados similares a los obtenidos en este trabajo, con una concentración de 0.12 g/L de nitrógeno. Estas diferencias se pueden atribuir al proceso de elaboración del nixtamal, en este proyecto se presentan las cantidades empleadas para realizarlo, sin embargo, en las otras referencias fueron muestras obtenidas de empresas que producen masa de maíz nixtamalizado.

Por otro lado, el HBC presentó una mayor concentración de azúcares (27.20 ± 3.17 g/L) que los reportados por Domínguez *et al.*, 2011 (0.98 g/L) y similar a las obtenidas por Tsigie *et al.*, 2011 y Hernández Salas *et al.*, 2009 de 21.38 y 29.9 g/L, respectivamente, las diferencias observadas pueden deberse a las condiciones (tiempo de hidrólisis, tipo y concentración del ácido, relación ácido:bagazo) que se emplearon en cada una de las referencias mencionadas para llevar a cabo la hidrólisis.

6.2 Evaluación de las cinéticas del crecimiento de *Clavispora lusitaniae* Hi2 en los diferentes medios de cultivo formulados

Los medios compuestos de la mezcla del HBC e HSN presentaron crecimiento similares, no se favoreció el crecimiento al combinar estos hidrolizados, además que en los medios formulados a partir de HBC:HSN 75:25 y 25:75 presentaron una menor velocidad de crecimiento en comparación con los hidrolizados evaluados por separado, esto puede

deberse a que ambos medios de cultivo provenientes de una hidrólisis ácida presentan compuestos tóxicos para la levadura, tales como el fufural y el 5-hidroximetilfufural afectando su crecimiento, como reporta Tsigie *et al.* 2011 (Figura 10). De la misma manera al evaluar los medios formulados a partir de HBC con NC en relaciones 25:75, 50:50 y 75:25 no se favoreció el crecimiento de *Clavispora lusitaniae* Hi2, sin embargo al combinarlo en relación 50:50 se presentó una menor fase de adaptación, similar a la obtenida en el medio NC (Figura 11).

Al combinar NC:HSN se obtuvo una complementación de nutrientes debido a que las cinéticas presentan mayor crecimiento a las evaluadas por separado, aproximándose al crecimiento en el medio YPD. Cabe mencionar que la tendencia que se presenta al combinar estos hidrolizados es que a mayor cantidad de HSN mayor es su crecimiento, sin embargo la fase de adaptación es más larga y a mayor cantidad de NC menor es su fase de adaptación y menor su crecimiento, como se muestra en la Figura 12.

Clavispora lusitaniae Hi2 presentó un crecimiento diaúxico al aumentar el tiempo de incubación, lo que nos indica que consumió diferentes fuentes de carbono, en especial en el medio de HSN, el cual puede estar compuesto de diferentes tipos de azúcares, tales como glucosa, xilosa, arabinosa, maltosa, celobiosa etc. El consumo de diferentes azúcares concuerda con lo reportado por Gutierrez Contreras *et al.*, 2011, Hours *et al.*, 2005 y también por Freer & Greene, 1990, donde reportan que *Clavispora lusitaniae* Hi2 tiene la capacidad de consumir glucosa, fructosa, xilosa, galactosa y celobiosa.

6.3 Cuantificación de biomasa y lípidos acumulados por la levadura oleaginosas

Clavispora lusitaniae Hi2 en las formulaciones de medios seleccionadas

Los medios compuestos de NC e HSN presentaron la mayor concentración de biomasa y lípidos. El cultivo en el medio NC:HSN (50:50) fue el que obtuvo la mayor cantidad de lípidos (0.99 ± 0.09 g/L y 26 %) seguido del medio NC:HSN (75:25) con 0.97 ± 0.16 g/L y 31 %, cabe mencionar que es el primer trabajo en el que se utiliza el residuo de nejayote como medio de cultivo y la levadura *Clavispora lusitaniae* Hi2 para la producción de lípidos, sin embargo, se ha reportado que levaduras del mismo género que son oleaginosas como *Candida lipolytica*, *Candida tropicalis*, *Candida lambica*, *Candida membranaefaciens*, *Candida* sp. y *Candida* sp. que presentaron 13.8 ± 1.5 , 23.1 ± 2.6 , 34.8 ± 3.4 , 29.6 ± 3.3 , 36 ± 3.2 , 21 ± 1.4 % de lípidos por biomasa seca, respectivamente, al segundo día de incubación en un medio de melaza suplementado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y KH_2PO_4 con relación C:N 20 mol:mol (estimado estequiométricamente) (Karatay & Dönmez, 2010) (tabla 19).

Tabla 19. Comparación del contenido lipídico por biomasa seca de cepas de *Candida*

Cepa	Lípidos (%)	Condiciones	C/N (mol/mol)
<i>Candida lipolytica</i>	13.8 ±1.5	Medio de melaza (equivale a 10 g/L de sucosa), NH ₄ SO ₄ y KH ₂ PO ₄	20
<i>Candida tropicalis</i>	23.1 ±2.6		
<i>Candida lambica</i>	34.8 ±3.4		
<i>Candida membranaefaciens</i>	29.6 ±3.3		
<i>Candida</i> sp.	36.0 ±3.2		
<i>Candida</i> sp.	21.0 ±1.4		

Así mismo Pan *et al.*, 2009 reportan a *Candida pulcherrima*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis* y *Candida utilis* con producción de 6.50, 20.50, 20.90 y 10.40 g/L de biomasa, 1.95, 5.10, 4.9 y 2.54 g/L de lípidos y 30, 24.9, 23.4, 24.5 % de lípidos por biomasa seca, respectivamente, en un medio limitado de nitrógeno (relación C:N estimada de 38 mol:mol) durante 5 días de incubación (Tabla 20).

Por otro lado, utilizando un medio de hidrolizado de bagazo de caña, Brar *et al.*, 2017, obtuvieron 10.25 g/L de lípidos de la cepa *Trichosporon* sp. en un cultivo de 120 h, así mismo, Tsigie *et al.*, 2011 utilizó hidrolizado de bagazo de caña de azúcar como medio de cultivo para *Yarrowia lipolytica* Po1g obteniendo 1.76 g/L por día, en este trabajo se obtuvo 0.55 g/L de lípidos en el medio HBC y al combinarlo con HSN en relación 50:50 aumenta la producción a 0.73 ± 0.11 g/L (tabla 20).

Tabla 20. Comparación de biomasa y lípidos obtenidos en este trabajo con los ya reportados

Biomasa (g/L)	Lípidos (g/L)	Lípidos (%)	Condiciones	C/N (mol/mol)	Cepa	Referencia
5.60	0.67	12	NC:HSN (25:75) en 21h, 200rpm, 30°C y pH 6.5	7.28	<i>Clavispora lusitaniae</i>	Este trabajo
10.61	0.43	23	HSN en 72h, 200rpm, 30°C y pH 6.5	11.60	<i>Clavispora lusitaniae</i>	Este trabajo
8.31	0.68	8	HSN en 8 días, 200rpm, 30°C y pH 6.5	11.60	<i>Clavispora lusitaniae</i>	Este trabajo
11.40	3.4	30	Estearina y glicerol en 5 días pH=6.5, T=28°C	175	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Papanikolaou et al., 2003
10.3	1.6	15	Estearina, glicerol y glucosa en 5 días pH=6.5, T=28°C	110	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Papanikolaou et al., 2003
9.7	2.6	27	Estearina y glicerol en 5 días pH=6.5, T=28°C	55	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Papanikolaou et al., 2003
11.42	6.68	58.5	HBC en 4 días, 160 rpm, 26°C en matraz de 500 mL con volumen de operación de 250 mL.	20 g/L AR y 5g/L peptona	<i>Yarrowia lipolytica</i> Po1g	Tsigie et al., 2011
3.6	1.2	25.0	Xilosa 144 h, pH=6, 28°C, 180 rpm, matraz de 250 mL en volumen de operación de 50 mL.	78	<i>Cunninghamella echinulata</i>	Fakas et al., 2009
4.0	1.9	32.2	Xilosa 144 h, pH=6, 28°C, 180 rpm, matraz de 250ml en volumen de operación de 50 mL.	117	<i>Cunninghamella echinulata</i>	Fakas et al., 2009
25.28	10.25	40.50	HBC detoxificado, 120 h, pH=5	71.6 g/L AR	<i>Trichosporon</i> sp.	Brar et al., 2017
6.50	1.95	30	Medio Limitado en nitrógeno, 28°C, 180rpm	38	<i>Candida pulcherrima</i>	Pan et al., 2009.
20.50	5.10	24.88			<i>Candida tropicalis</i>	
20.90	4.9	23.44			<i>Candida utilis</i>	
10.40	2.54	24.50			<i>Candida utilis</i>	

El uso de estos residuos agroindustriales como medio de cultivo para *Clavispora lusitaniae* Hi2 es una alternativa atractiva para el aprovechamiento de los mismos, proporcionándoles un valor agregado por la producción de lípidos y biomasa, se ha reportado que los lípidos microbianos son similares a los aceites vegetales y podrían ser utilizados como materia prima para la producción de biodiésel (Leiva-Candia *et al.*, 2014), además se ha reportado que cepas del mismo género y especie a la levadura utilizada en este proyecto (*Clavispora lusitaniae* Hi2) tiene la capacidad de asimilar diferentes tipos de azúcares lo que la hace más atractiva para usarla en el aprovechamiento de residuos agroindustriales (Gutiérrez Contreras *et al.*, 2011; Martínez Burgos, 2013).

Al aumentar del tiempo de incubación de *Clavispora lusitaniae* Hi2 presentó una disminución de lípidos, sin embargo, la producción de biomasa aumentó esto se atribuye a su capacidad de consumir diferentes azúcares.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

7.1 Conclusión

La hidrólisis de los sólidos del nejayote permitió obtener una mayor concentración de azúcares reductores en comparación con el nejayote centrifugado, cabe mencionar que este es el primer reporte en el que se emplean el nejayote y el hidrolizado del sólido de nejayote para la producción de lípidos, además de que se ha implementado como medio de cultivo para el crecimiento de la levadura *Clavispora lusitaniae* Hi2. Por otra parte, la combinación de los diferentes hidrolizados favoreció el crecimiento y producción de lípidos por la levadura *Clavispora lusitaniae* Hi2 al contrastarlos con los resultados obtenidos de los hidrolizados por separado (con excepción de la combinación de HBC y HSN), siendo los medios formulados a partir de NC:HSN los que presentaron los mejores resultados para la producción de biomasa y lípidos.

El uso de los residuos de la nixtamalización (NC e HSN) pueden ser utilizados como medios de cultivo para la producción de biomasa ya sea para *Clavispora lusitaniae* Hi2 u otra cepa de interés biotecnológico, además de producir algún metabolito de interés industrial. También con respecto a los resultados obtenidos sobre la disminución de la demanda química de oxígeno, *Clavispora lusitaniae* Hi2 es una herramienta biológica para disminuir la DQO en los residuos de la nixtamalización.

7.2 Perspectivas

El uso de enzimas celulasas y hemicelulasas es una alternativa favorable para la hidrólisis de los residuos agroindustriales y así obtener mayor liberación de azúcares reductores. Por otro lado, para obtener un mayor crecimiento de *Clavispora lusitaniae* Hi2 en el medio de HBC se propone detoxificar con carbón activado y para aumentar la producción de biomasa y lípidos en los medios formulados se propone suplementar con otras fuentes de nutrientes como nitrógeno, fósforo, azufre, entre otras.

Al obtener los mejores rendimientos en los medios NC y NC:HSN (50:50), debido a que se obtuvo una complementación de nutrientes, se propone evaluar el crecimiento de otros microorganismos de interés biotecnológico, ya sea para la obtención de biomasa o un metabolito de interés comercial, y para la obtención de aceites microbianos se podrían evaluar los medios formulados con cepas de levaduras oleaginosas previamente reportadas, tales como *Yarrowia lipolytica*, *Trichosporon porosum*, *Cryptococcus sp.*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Veiga-Crespo, P., & Villa, T. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Springer*, 1219-1227.
- Aransiola, E., Ojumu, T., Oyekola, O., Madzimbanuto, T., & Ikhu-Omoregbe, D. (2013). A review of current technology for biodiesel production: State of the art. *BIOMASS & BIOENERGY. ELSEVIER*, 276-297.
- Asteraye Tsigie, Y., Wang, C.-Y., Truong, C.-T., & Ju, Y.-H. (2011). Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. *Elsevier*, 9216-9222.
- Ávila Núñez, R., Rivas, P., Hernández Motzezak, R., & Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease. *Multiciencias*, 129-135.
- Bello Gil, D., Carrera Bocourt, E., & Díaz Maqueira, Y. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 45-50.
- Bennaceur, K., Gupta, N., Monea, M., Ramakrishnan, T., Randen, T., Sakurai, S., & Whittaker, S. (2005). Captación y almacenamiento de CO₂: Una solución al alcance de la mano.
- Beopoulos, A., Nicaud, J.-M., & Gallardin, C. (2011). An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Springer*, 1193-1206.
- Campos Bedolla, P., Bazán Perkins, B., Sanmartí Puig, N., Torres Lobejón, M., Fernández Esteban, M., Boixaderas Sáez, N., . . . Gullón Lopez-Puigcever, M. (2003). *Biología*. Carreras, & Torres. (2010). *Biocombustibles*.
- Castillo Vázquez, N., Siqueiros Cendón, T., & Rascón Cruz, Q. (2011). Biocombustibles: Estrategias limpias para combatir la crisis energética. *Tecnociencia*, 61-66.
- Castro Muñoz, R., Cerón Montes, G., Barragán Huerta, B., & Yañz Fernández, J. (2015). Recovery of carbohydrates from nixtamalization waste (nejayote) by ultrafiltration. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 735-744.
- Chandler, C., Villalobos, N., González, E., Arenas, E., Mármol, Z., Ríos, J., & Aiello Mazzarri, C. (2012). Hidrólisis ácida diluida en dos etapas de bagazo de caña de azúcar para la producción de azúcares fermentables. *Multiciencias*, 245-253.

- Climático, I. N. (2018). *Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático*. Recuperado el Enero de 2020, de <https://www.gob.mx/inecc/acciones-y-programas/inventario-nacional-de-emisiones-de-gases-y-compuestos-de-efecto-invernadero>
- Cluster Biodiésel Avanzado. (2017). *Biosiesel su situación en México y el mundo*. Recuperado el Noviembre de 2019, de <https://bdavanzado.org/la-carrera-por-la-energia-solar-espacial/>
- CONADESUCA. (2015). Ficha técnica del cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). México: SAGARPA.
- Díaz, E., Castro Muñoz, R., & Yáñez Fernández, J. (2016). Exploración del subproducto de la nixtamalización, nejayote: un panorama. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 41-60.
- Dominguez, M., Álvarez Castillo, A., Castrejon Rosales, T., Granados Baeza, M., Hernández Campos, F., Alcalá Octaviano, V., & Tapia Picazo, J. (2011). Estudio de la cinética de la hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar sin oretratamiento para la obtención de azúcares reductores. *Revista Iberoamericana de polimeros*, 12(3), 153-159.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 350-356.
- FAO. (1992). *Maize in human nutrition*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Recuperado el Noviembre de 2017, de <http://www.fao.org/3/t0395e/T0395E00.htm>
- Ferrari, L. (2013). Energías fósiles: diagnóstico, prespectivas e implicaciones económicas. *Revista Mexicana de Física*, 36-43.
- Flores, A. (Enero de 2015). Aislamiento y caracterización de levaduras oleaginosas de muestras de frutas y desechos agroindustriales del estado de morelos. *Tesis de grado de Maestría*. Jiutepec, Morelos.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1992). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Recuperado el Noviembre de 2017, de <http://www.fao.org/3/t0395e/T0395E01.htm#Preface>
- Foust, T., Aden, A., Dutta, A., & Phillips, S. (2009). An economic and enviromental comparison of a biochemical and a thermochemical lignocelulosic ethanol conversion processes. *Springer*, 547-565.
- Freer, S., & Greene, R. (1990). Transport of Glucose and Cellobiose by *Candida zuickerhamii* and *Clavispora lusitaniae*. *The journal of biological chemistry*, 265(22), 12864-12868.

- Fuwa, H. (1954). A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *The Journal of Biochemistry*, 583-603.
- Ganduglia , F., León, J., Gasparini, R., Rodríguez, M., Huarte , G., Estrada , J., & Filgueiras, E. (2009). *Manual de biocombustibles*. arpel: Asociacion Regional de Empresas de Petroleo y Gas Natural en Latinoamerica y el Caribe.
- Garay, L., Sitepu, I., Cajka, T., Chandra , I., Shi Ting Lin, S., Bruce German, J., . . . Boundy-Mills, K. (April de 2016). Eighteen new oleaginous yeast species. *Springer*.
- Gonzáles Merino, A., & Castañeda Zalvala, Y. (2008). Biocombustibles, biotecnología y alimentos. *DOSSIER*.
- GrundfosX. (s.f.). *Gases de efecto invernadero (GEI) (GHG)*. Recuperado el 2020, de <https://mx.grundfos.com/service-support/encyclopedia-search/ghg.html>
- Gutierrez Contreras, A., Torres Taborda, M., Ramirez Carmona, M., Velez Salazar, Y., Cardona Aristizabal, M., & Vasco Echeverri, O. (2011). Fermentación alcohólica de jugo de fique con *Candida lusitanae*. *Revista Investigaciones Aplicadas*, 5(2), 51-58.
- Gutiérrez Ramírez, L., & Gómez Rave, A. (2008). Determinación de proteína total de *Candida utilis* y *Sacharomyces cerevisiae* en bagazo de caña. *Revista lasallista de investigación* , 61-64.
- Hernández Martínez , A. (Agosto de 2014). Evaluación de la producción de aceites unicelulares por levaduras en el residuo de la nixtamalización (nejayote). *Tesis* . Jiutepec Morelos.
- Hernández Salas, J., Villa Ramírez , M., Veloz Rendón, J., Rivera Hernández , K., González César , R., Plascencia Espinosa , M., & Trejo Estrada, S. (2009). Comparative Hhydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *ELSEVIER*, 1238-1245.
- Hours, R., Ferreyra, M., Schvab, M., Gerard, L., Zapata, L., & Davies, C. (2005). Caracterización fisicoquímica y microbiológica de jugos de naranja destinados a vinificación. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, XVI(031), 219-239.
- Huang, C., Wu, H., Li, R.-f., & Zong, M.-h. (2012). Improving lipid production from bagasse hydrolysate with *Trichosporon fermentans* by response surface methodology. *Elsevier*, 29(3), 372-378.
- INECC. (2018). *Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático*. Recuperado el Enero de 2020, de <https://www.gob.mx/inecc/acciones-y-programas/inventario-nacional-de-emisiones-de-gases-y-compuestos-de-efecto-invernadero>

- Larrahondo, J. (1995). Calidad de la caña de azúcar. *CENICAÑA*, 337-354.
- López Marijuan, D. (Noviembre de 2012). *Refinando el petróleo y contaminando el mundo*.
Obtenido de Ecologistas en acción:
<http://www.ecologistasenaccion.org/article11161.html>
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 265-275.
- Marchetti, J., Miguel, V., & Errazu, A. (2007). Possible methods for biodiesel production . *elsevier*, 1300-1311.
- Marín Quemada, J., & San Martín González, E. (2011). *El futuro de los combustibles fósiles*.
Obtenido de Canal UNED:
<https://canal.uned.es/uploads/materials/resources/pdf/4/1/1319025174814.pdf>.
- Martínez Burgos, A. (2013). *Aislamiento, selección e identificación de una cepa de levadura capaz de producir aceites microbianos*. Jiutepec, Morelos.
- Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 426-428.
- Montes Ponce de León, J. (2001). *Medio ambiente y desarrollo sostenido*.
- Nansa, M. d. (2012). *Maices del Nansa* . Recuperado el Noviembre de 2017, de
<http://maicesdelnansa.blogspot.com/2012>
- OCDE/FAO . (2017). *"Biocombustibles", en OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2017-2026*.
Recuperado el 2019, de http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2017-13-es
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (1993). *El maíz en la nutrición humana*. Roma: Colección FAO: Alimentación y Nutrición.
- Paredes López, O., Guevara Lara, F., & Bello Pérez, L. (2008). La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz.
- Pelczar, M. J., Reid, R., & Chan, E. (1996). *Microbiología*. McGRAW-HILL.
- Ramírez Romero, G., Reyes Velazquez, M., & Cruz-Guerrero, A. (2013). Estudio del nejayote como medio de crecimiento de probióticos y producción de bacteriocinas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(3), 463-471.
- Reyes Torres, P. (1999). Combustibles Fósiles y contaminación. *Revista de la facultad de ingeniería*.
- SAGARPA; CONADESUCA; Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar. (2015). *Ficha técnica del cultivo de la caña de azúcar (Saccharum officinarum L.)*. México.

- Sanchez Gonzales, M., Blanco Gamez , A., Escalante , A., Valladares , A., & Olvera, C. (2011). Isolation and characterization of new facultative alkaliphilic *Bacillus flexus* strain from maize processing waste water (nejayote). *Letters in Applied Microbiology*, 413-419.
- Saval, S. (2012). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. *BioTecnología*, 16(2), 14-46.
- Saval, S. (2012). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y futuro. *BioTecnología*, 14-46.
- Schulze, I., Hansen, S., GroBhans, S., Rudsuck, T., Ochsenreither, K., Syldatk, C., & Neumann, A. (2014). Characterization of newly isolated oleaginous yeasts- *Cryptococcus podzolicus*, *Trichosporon porosum* and *Pichia segobiensis*. *Springer*, 4:24.
- statista. (2019). *Ranking mundial de los principales países productores de biocombustible en 2018(en miles de toneladas equivalentes de petróleo)*. Recuperado el Enero de 2020, de <https://es.statista.com/estadisticas/635730/paises-lideres-en-la-produccion-de-biocarburante/>
- Tapia, P., & Valadez , R. (12 de Febrero de 2017). Biodiésel, a la espera de brillar en México. *Milenio*.
- Tortora , G., Funke, B., & Case , C. (2016). *Microbiology An introduction*. Pearson.
- Uribe Gutiérrez , L. (2007). Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora. Bogota, Colombia.
- Wynn, J., & Ratledge, C. (2005). Oils from microorganisms. En *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*.
- Xiao, Z., Storms, R., & Tsang, A. (2006). A quantitative starch- iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Analytical Biochemistry*.
- Zumdahl, S. (2007). *Fundamentos de química*. McGraw-Hill.

ANEXOS

Cuantificación de azúcares reductores de los sustratos

Se realizó la curva patrón para la cuantificación de azúcares reductores del HBC, HSN y NC en la que se aplicó el método ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959) utilizando dextrosa como estándar en soluciones de 0.25 a 2.0 g/L (Figura 18).

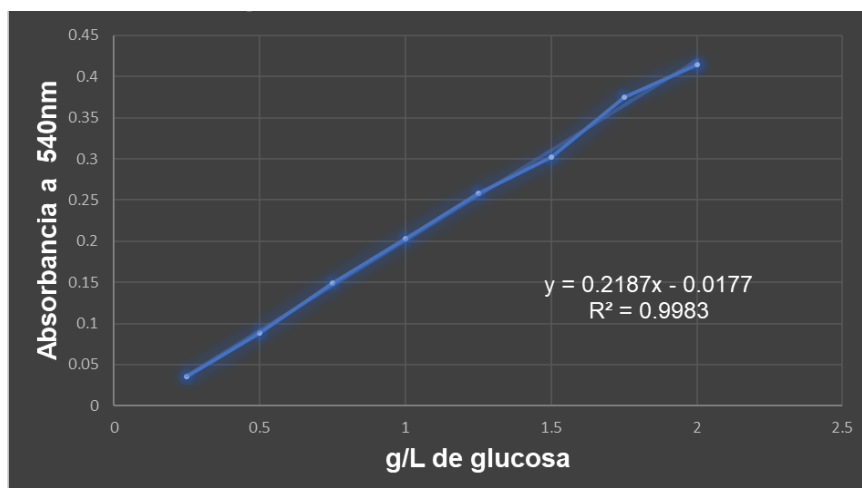


Figura 18. Curva patrón de azúcares reductores.

Cuantificación de carbohidratos totales de los sustratos

Se cuantificaron los carbohidratos totales por medio de una curva patrón elaborada con la metodología fenol-ácido sulfúrico desarrollada por Dubois y colaboradores en 1956 utilizando dextrosa como estándar en soluciones de 10 a 100 mg/L (Figura 19).

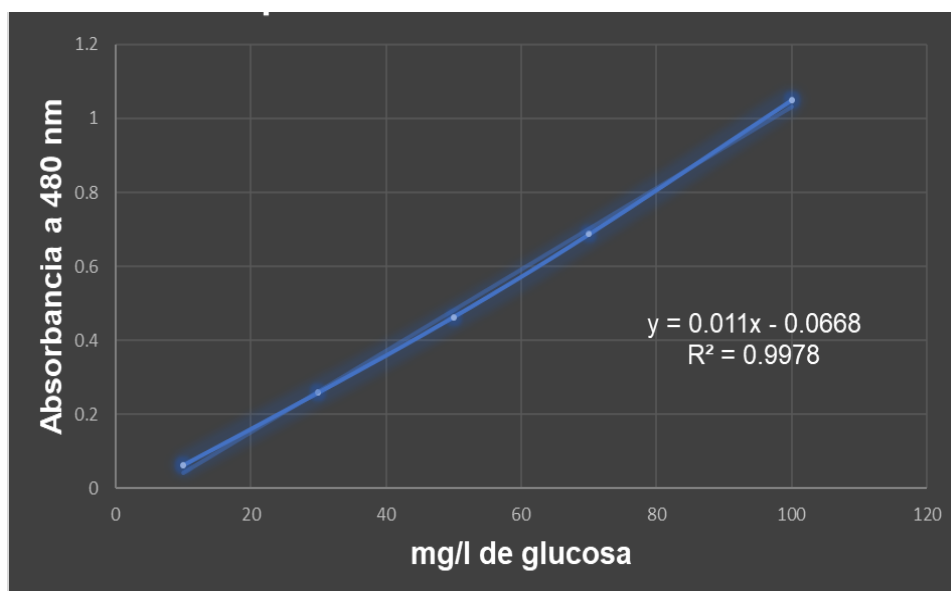


Figura 19. Curva patrón de carbohidratos totales.

Cuantificación del almidón de los sustratos

La concentración de almidón se cuantificó mediante el reactivo de Yodo (I₂ 5mM: KI 50 mM) (Fuwa 1954; Xiao *et al.*, 2006) utilizando una curva patrón con almidón como estándar en soluciones de 0.25 a 2.0 g/L (Figura 20).

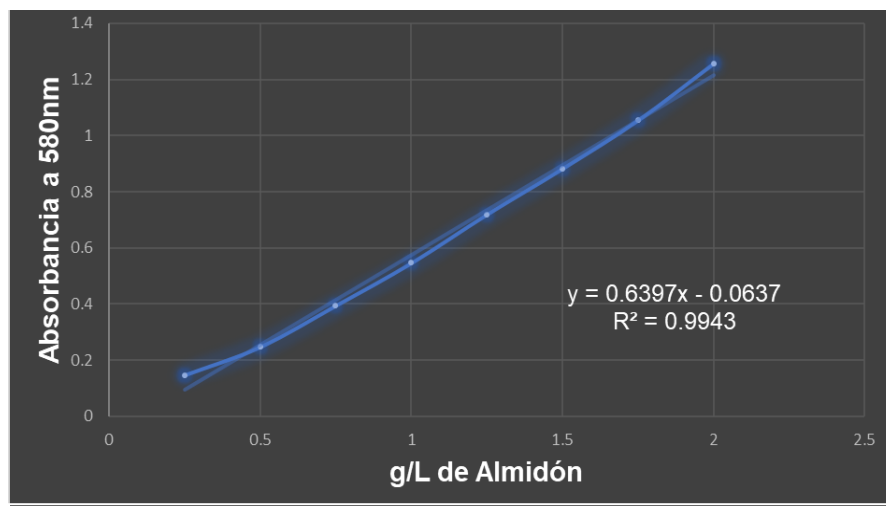


Figura 20. Curva patrón de almidón.

Crecimiento de la levadura *Clavispora lusitaniae* Hi2 en medio YPD

Se evaluó el crecimiento de la levadura *Clavispora lusitaniae* Hi2 en medio YPD, utilizando un preinóculo de 24 h posteriormente se preparó el preinóculo de 12 h y se ajustó la absorbancia a 0.100 ± 0.04 en longitud de onda a 600 nm, se utilizaron relaciones de inóculo:medio de cultivo YPD 1:1000 (líneas verdes), 1:100 (líneas azules) y 1:10 (líneas roja y naranja), con el fin de evaluar diferentes concentraciones de inóculo y observar su crecimiento; como se observa en la figura 21 la cinética con mejor crecimiento fue la inoculada con una relación 1:10 inóculo: medio de cultivo YPD (línea verde), debido a que presenta menor tiempo de adaptación al medio, sin embargo las velocidades de crecimiento para las tres cinéticas son similares (Figura 22) .

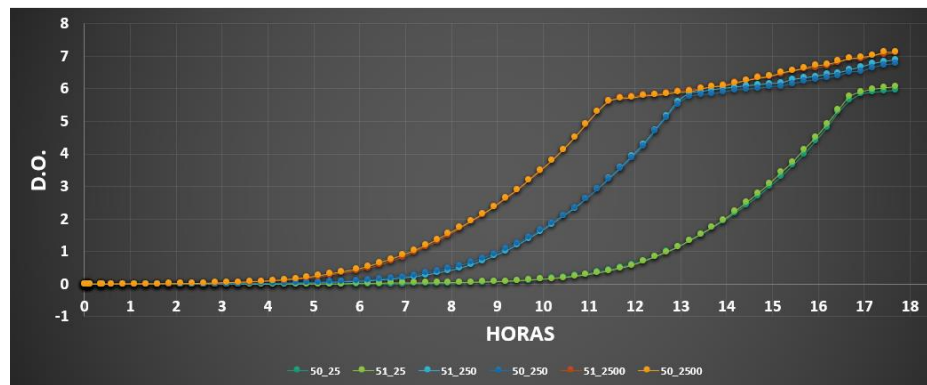


Figura 21. Cinética de crecimiento de la levadura *Clavispora lusitaniae* Hi2.

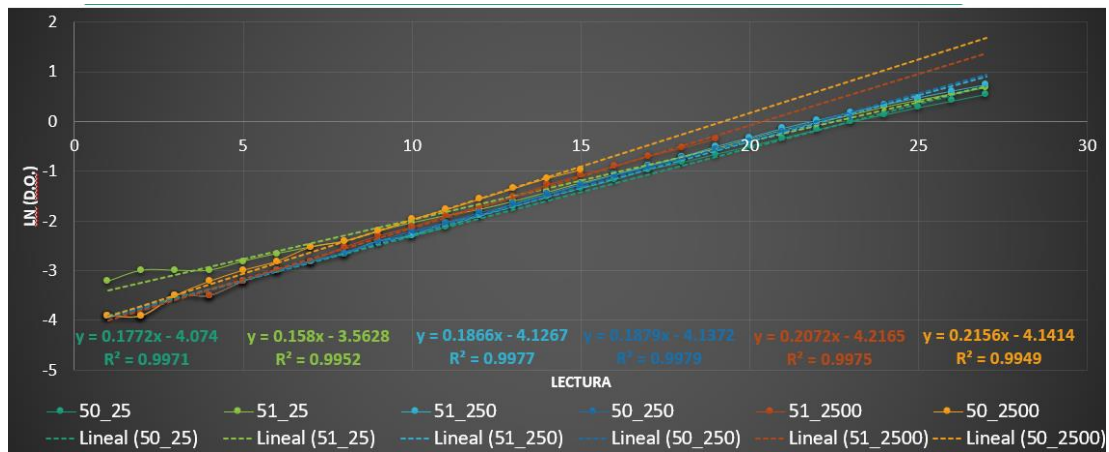


Figura 22. Cinética de crecimiento de la levadura *Clavispora lusitaniae* Hi2.

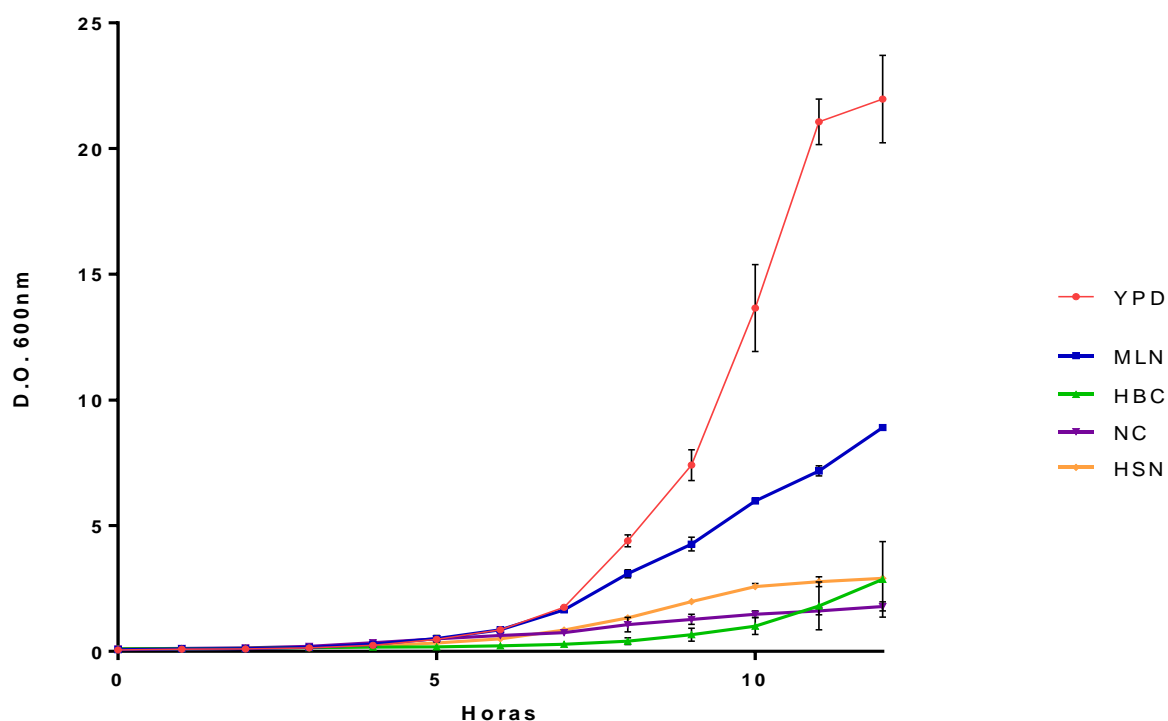


Figura 23. Cinética de crecimiento de la levadura Hi2 en los medios de YPD, nejayote centrifugado (NC), hidrolizado sólido de nejayote (HSN) e hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (HBC) durante 12 h a 30°C y 200rpm.

Tabla 21 Relación carbono: nitrógeno (C:N), velocidad de crecimiento (μ) y biomasa evaluados en la cinética de *Clavispora lusitaniae* Hi2 durante 12 h en diferentes medios.

	C:N (mol:mol)	μ (h^{-1})	Biomasa (g/L)
YPD	2.43	0.64 ± 0.01^a	9.18 ± 0.97^a
MLN	32.46	0.45 ± 0.01^b	6.01 ± 0.62^b
NC	0.39	0.26 ± 0.00^c	1.13 ± 0.34^d
HBC	75.52	0.38 ± 0.08^b	3.541 ± 0.01^c
HSN	12.37	0.41 ± 0.01^b	5.11 ± 0.71^{bc}

Medias con letras iguales dentro de la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

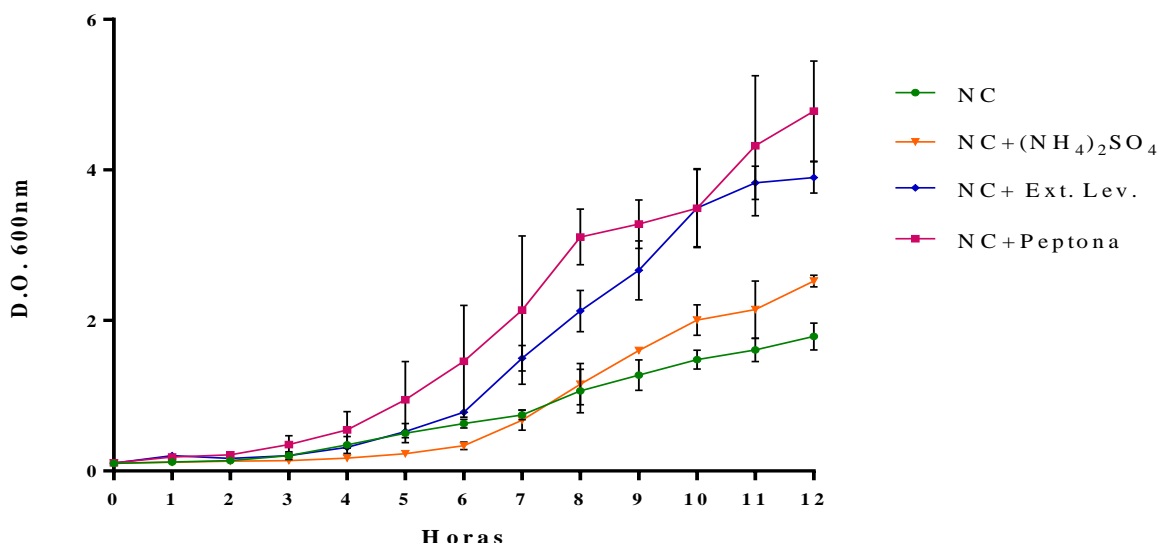


Figura 24. Cinética de crecimiento de la levadura *Clavispora lusitanae* Hi2 en los medios de NC adicionado con peptona, extracto de levadura y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno.

Por otro lado el medio de NC se suplementó con peptona, extracto de levadura y sulfato de amonio 5 g/L, como fuente de nitrógeno y se vio favorecido el crecimiento de la levadura *Clavispora lusitanae* Hi2 en comparación con el medio sin suplementar, además de que asimiló mejor la fuente de nitrógeno orgánica (Figura 24), se obtuvo la mayor concentración de biomasa en los medios suplementado con extracto de levadura y peptona 2.29 ± 0.18 y 2.35 ± 0.22 respectivamente, sin embargo en donde se obtuvo la mejor velocidad de crecimiento fue en el medio de $\text{NC} + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Tabla 10).

Tabla 22 Relación carbono: nitrógeno (C:N), velocidad de crecimiento (μ) y biomasa evaluados en la cinética de *Clavispora lusitanae* Hi2 durante 12 h en medios formulados por NC y suplementado con diferentes fuentes de nitrógeno.

Medio	C:N (mol:mol)	μ (h ⁻¹)	Biomasa (g/L)
NC	0.39	0.26 ± 0.00^d	1.13 ± 0.34^c
NC+(NH ₄) ₂ SO ₄	0.04	0.34 ± 0.01^a	1.73 ± 0.12^{cb}
NC+Ext. Lev.	0.24	0.29 ± 0.01^c	2.29 ± 0.18^{ab}
NC+Peptona	0.08	0.31 ± 0.01^b	2.35 ± 0.22^a

Medias con letras iguales dentro de la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).