

Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo



INFORME FINAL DE PROYECTO

Empleo de levaduras tolerantes a inhibidores en residuales agroindustriales para la producción de biomasa microbiana con alto valor nutricional

Número del Proyecto: 18.21.018.15

Organismo Responsable: Grupo Empresarial AZCUBA a través de la ejecución del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), Cuba



Contraparte Extranjera:

Instituto Tecnológico de Veracruz, México

Universidad de Tsinghua, Beijing, República Popular China

CARACTERIZACIÓN DEL PROYECTO.

1. Líneas de Acción.

Este proyecto tiene como meta la selección de levaduras compatibles con sustratos presentes en los materiales lignocelulósicos y que a su vez, sean tolerantes a los inhibidores predominantes que resultan de los procesos de pretratamiento de estos materiales para la conversión de los carbohidratos en biomasa microbiana con alto contenido de lípidos y carotenos para ser empleada como aditivo en la alimentación animal así como en la producción de aceites microbianos que pueden ser utilizados como materia prima para la producción de biodiesel u otros productos oleoquímicos o de interés farmacéutico. Durante el proyecto quedarán establecidas las condiciones de pre-tratamiento para la producción de hidrolizados, las condiciones de fermentación óptimas para alcanzar la mayor productividad del proceso y la caracterización de los aceites obtenidos bajo estas condiciones.

2. Entidad local cubana responsable.

Nombre y Dirección:

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), Vía Blanca No 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón, La Habana, Cuba

Nombre del responsable y sus funciones:

Dr. Evelyn Faife Pérez, Jefe de Proyecto, Investigadora auxiliar, Jefe Dpto. Biotecnología Ambiental

3. Objetivo General.

3. Objetivo General.

Generar cepas y resultados de datos para elaborar una alternativa tecnológica para la producción de levaduras oleaginosas capaces de producir carotenoides y ácidos grasos esenciales, que sean tolerantes a los principales inhibidores de los materiales lignocelulósicos de las agroindustrias para usarlos como aditivos en alimentos para animales o que podrían ser fuentes de aceites para la producción de biodiesel o productos farmacéuticos.

3.1. Objetivos Específicos

- Caracterización química y física de los hidrolizados y vinazas de bagazo para la producción de células microbianas.
- Selección o generación de levaduras tolerantes a inhibidores con capacidad para producir mayor contenido de lípidos y carotenoides o etanol
- Determinar las condiciones óptimas de fermentación para producir el máximo valor de biomasa, lípidos, carotenoides o bioetanol en escala de laboratorio.
- Determinar las condiciones de pretratamiento de los sustratos (hidrolizados de bagazo y vinaza) para la conversión máxima de azúcares.

4. Presupuesto inicial: 27 000.00 USD

Fecha de inicio de proyecto: marzo 2019

Fecha de finalización de proyecto: noviembre 2022

Los resultados de este proyecto incidirán directamente en:

- Incrementar los conocimientos del metabolismo de levaduras oleaginosas, el efecto de compuestos tóxicos para el crecimiento celular y la acumulación de lípidos y carotenos y el empleo de tecnologías para el tratamiento de materiales lignocelulósicos con el objetivo de ser utilizados como sustratos en los procesos de fermentación
- El desarrollo de nuevas tecnologías que permitan elevar los niveles de productividad y con ello la viabilidad de procesos de producción de levaduras destinada a la alimentación y disminuir la contaminación de los suelos por el uso las corrientes residuales en el fertirriego
- Mejorar la formación integral de investigadores y técnicos mediante el intercambio de experiencias y conocimientos así como el empleo de equipos y tecnologías de avanzada

Período del informe: El informe comprende todo el período de desarrollo del Proyecto, desde el inicio del mismo hasta su culminación con ajustes de tiempo debido a la pandemia de la COVID.

INFORME TÉCNICO

El empleo cada vez más eficiente de los residuos agroindustriales tanto líquidos como sólidos y su impacto en la disminución de la contaminación medioambiental que estos producen es un tema actual de gran interés para la comunidad científica. Debido a su abundante disponibilidad, estos residuos

pueden servir como un sustrato ideal para procesos microbianos para la producción de productos de valor agregado como alimentos para animales enriquecidos con proteínas, lípidos, enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, compuestos de importancia farmacéutica, etc.

En Cuba, se generan grandes volúmenes de vinazas, los cuales son generalmente utilizados directamente en el riego de los suelos aledaños a los complejos industriales. Las vinazas son los residuales de mayor agresividad y carga orgánica que genera la industria azucarera y alcoholera, tienen un gran impacto en la naturaleza afectando directa e indirectamente la flora y la fauna. El exceso del vertimiento de las vinazas provoca problemas ambientales asociados a la degradación de los suelos. Existe amplia experiencia en el empleo de vinazas para la producción de levaduras para su uso como fuente proteica en la alimentación animal y también en la producción de bioproductos destinados a la agricultura a partir de un proceso de hidrólisis ácida.

El empleo de los hidrolizados obtenidos en el proceso de pretratamiento de materiales lignocelulósicos es otra alternativa para una mejor utilización de estos sustratos por parte de los microorganismos. Sin embargo, estudios recientes sobre la tolerancia a los inhibidores y la utilización del azúcar por las especies de levaduras revelan el impacto de estos efectos tóxicos sobre el crecimiento y la acumulación de lípidos, por lo que es necesario evaluar su efecto con vistas a generar levaduras tolerantes que permitan obtener resultados superiores en los procesos de fermentación con vistas a obtener procesos industriales económicamente factibles.

La producción de levaduras llamadas oleaginosas, que pueden acumular entre el 20% y el 70% de aceite intracelular que contienen principalmente triacilgliceroles (TAG) con composición similar a los aceites vegetales, en vinazas e hidrolizados lignocelulósicos para ser utilizadas en la dieta alimenticia resulta una alternativa atractiva desde el punto de vista económico y ambiental. Dentro de estas especies oleaginosas existen varias que también son capaces de producir biopigmentos denominados carotenoides, capaces de mejorar el sistema inmune, reducir los riesgos de enfermedades degenerativas, cardiovasculares entre otras como la diabetes 2 y el cáncer. Luego constituye un reto lograr la producción factible de un suplemento alimenticio con estas propiedades.

Por otro lado, la producción industrial de biodiesel a partir de plantas oleaginosas enfrenta un reto económico, ya que no es sostenible a gran escala debido al precio elevado de las fuentes de aceites, el cual oscila entre 60 – 85 % del costo de producción (Zhang y col., 2016). La necesidad de grandes extensiones de tierras agrícolas durante largos períodos de cultivo, provoca la deforestación. La dependencia de las condiciones climáticas, la ubicación geográfica, la fertilidad y variedad de los suelos necesarios y los bajos rendimientos de lípidos producidos por las semillas y plantas oleaginosas provocan que la producción de biodiesel por esta vía enfrente una gran competencia con la producción de los alimentos y hace desfavorable el uso de aceites vegetales como materias primas para la producción de biodiesel (Hanaki y Portugal-Pereira, 2018).

El desarrollo de lípidos producidos por levaduras oleaginosas con una composición química similar a la de los aceites vegetales es una alternativa para disminuir el costo del biodiesel y el impacto ambiental de los aceites vegetales. Los lípidos unicelulares tienen entre sus ventajas un corto ciclo de vida, requieren menos trabajo, son menos afectados por los cambios de estación y las condiciones climáticas

y son fáciles de escalar por lo que reducirían los costos de producción y favorecerían el cuidado del medio ambiente (Enshaeieh y col., 2015).

El costo de la producción de aceites microbianos es mayor que el de los aceites vegetales y animales por lo que es necesario encontrar estrategias para incrementar la eficiencia económica de los procesos (Sae-ngae y col., 2020). La reducción de los costos asociados con los procesos de fermentación y el uso de fuentes de carbono baratas en sustitución de la glucosa son aspectos de gran importancia para incrementar la factibilidad económica de estos procesos. Los factores claves para lograr la producción industrial viable de aceites microbianos son la disponibilidad de los sustratos y su costo, la productividad y el número de etapas del proceso.

Teniendo en cuenta todos estos aspectos, el proyecto estuvo enfocado en la detección, selección y evaluación a escala de laboratorio de levaduras nativas o genéticamente modificadas con alta capacidad para crecer en las fuentes de carbono presentes en vinazas y materiales lignocelulósicos comúnmente usados en la agroindustria azucarera y con una alta resistencia al efecto de los principales compuestos inhibidores presentes en estos residuos, en el desarrollo de procedimientos tecnológicos de fermentación para la producción de biomasa rica en lípidos y coproductos de alto valor agregado como carotenoides y ácidos grasos de interés a partir de estos sustratos de bajo costo y la caracterización del proceso de pretratamiento para la producción de hidrolizados lignocelulósicos.

Resultados Planificados	Actividades Principales	Inicio	Término	Indicadores verificables
Determinación de la composición de las vinazas e hidrolizados lignocelulósicos	Caracterización de azúcares e inhibidores en vinazas e hidrolizados de bagazo	6/2019	6/2021	Informes técnicos de proyecto con datos
Generación de levaduras con alta tolerancia a compuestos inhibidores	Selección, identificación, y/o generación de levaduras tolerantes a los inhibidores	7/2019	3/2020	Informes técnicos de proyecto
Proceso de fermentación desarrollado con residuales de la industria azucarera y parámetros óptimos para la producción de lípidos	Optimización de las condiciones de fermentación de vinazas para producir el máximo valor de biomasa y lípidos	6/2019	8/2021	Presentación de Tesis de Doctorado
Procedimiento para el pretratamiento del bagazo	Selección y evaluación del proceso de pre-tratamiento del bagazo	3/2020	8/2020	Informe técnico

Determinación del incremento del valor nutricional de las levaduras en las nuevas condiciones evaluadas	Caracterización de la biomasa y aceites extraídos de la biomasa.	11/2021	3/2022	Informe técnico
---	--	---------	--------	-----------------

RESULTADOS

Resultado planificado 1:

Determinación de la composición de las vinazas

La composición de las vinazas está determinada por diversos factores como la composición del medio de cultivo empleado en la producción de etanol y las características y la eficiencia del proceso de destilación industrial empleado (Soares y col., 2009).

En el proyecto se utilizaron vinazas de dos procedencias:

Vinaza A: Destilería de etanol Heriberto Duquesne, provincia Villa Clara, Cuba suplementada con glicerol 20 gL^{-1} y las sales $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 gL^{-1} y K_2HPO_4 $0,84 \text{ gL}^{-1}$.

- Vinaza B: Destilería de etanol en la provincia Nanjing, China.

Ambas vinazas fueron evaluadas puras (factor 1) y diluidas con una relación 1:1 (v:v) (factor 2).

En el **Tabla 1** se muestran las concentraciones de los principales componentes orgánicos encontrados en las dos vinazas empleadas: vinaza A y vinaza B.

Se determinó que los componentes mayoritarios en ambas fueron la glucosa, la fructosa y el glicerol. De acuerdo a los resultados obtenidos, la vinaza B contiene una mayor concentración de los dos componentes orgánicos mayoritarios de la vinaza A (glucosa y glicerol). A diferencia de la composición de otras vinazas, en estas dos no se encontró ácido láctico.

Sin embargo, se determinaron concentraciones apreciables de fructosa y de arabinosa en la vinaza B. Las concentraciones de los compuestos orgánicos y de nitrógeno indican que las vinazas utilizadas en los ensayos pueden resultar un medio de cultivo apropiado para el crecimiento de levaduras.

Se realizaron también los siguientes ensayos según la metodología para la caracterización de las aguas y aguas residuales de la industria azucarera de Obaya y col. (2003):

- Demanda Química de Oxígeno empleando la modificación rápida del Standard Methods.
- Demanda Bioquímica de Oxígeno empleando el equipo Oxitop de la WTW (Alemania).
- Determinación de nitrógeno total

Tabla 1: Concentraciones de los principales compuestos orgánicos, concentración de nitrógeno y carga orgánica determinados en las vinazas A y B.

Compuesto	Concentración (gL ⁻¹)	
	Vinaza A	Vinaza B
Glucosa	4,60 ± 0,35	12,8 ± 1,10
Fructosa	4,34 ± 0,23	5,01 ± 0,60
Etanol	0,36 ± 0,06	0,71 ± 0,15
Arabinosa	0,43 ± 0,03	3,77 ± 0,09
Glicerol	4,90 ± 0,70	9,94 ± 1,20
Ácido acético	1,66 ± 0,31	1,23 ± 0,65
Ácido láctico	0,0	0,0
Furfural	0,0	0,0
5-HMF	0,01 ± 0,005	0,0
Vainillina	0,0	0,02 ± 0,005
Nitrógeno	0,70 ± 0,20	3,5 ± 0,120
DQO	40,5 ± 4,90	69,8 ± 2,30
TOC	22,6 ± 2,10	60,4 ± 1,80

Composición de azúcares y coproductos en el hidrolizado de bagazo de caña de azúcar

La composición del hidrolizado de bagazo (HB) de caña de azúcar utilizado en este estudio se analizó mediante la técnica de HPLC. En la **Figura 1** se muestran los compuestos liberados durante el pretratamiento del material lignocelulósico mediante la hidrólisis diluida con ácido sulfúrico. Los azúcares detectados en el hidrolizado fueron glucosa, xilosa y arabinosa en una relación de masa 1:10:1, al igual que la detectada por Tanimura y colaboradores (2016). Además de estos azúcares, se encontraron otros compuestos carbonados como los ácidos acético y fórmico, el furfural y los compuestos poliaromáticos. La xilosa fue el monosacárido más abundante en el HB y el ácido acético representó la fracción principal de los ácidos orgánicos débiles liberados.

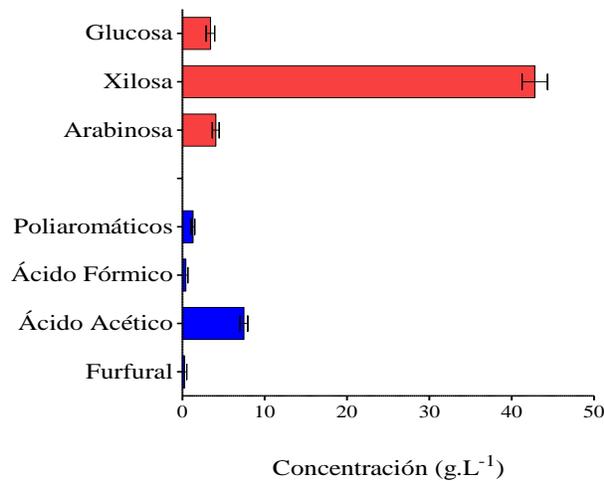


Figura 1: Composición del hidrolizado ácido del bagazo de caña de azúcar después del pretratamiento con ácido sulfúrico diluido al 1% durante 2h a 121°C. Las barras en rojo representan los azúcares liberados y las barras azules son los compuestos inhibitorios para el crecimiento de *Rhodospordium toruloides*

Resultado planificado 2

Selección, identificación y/o generación de levaduras tolerantes a los inhibidores involucrados en la producción de lípidos y carotenoides.

Se utilizaron muestras de mieles procedentes de la Empresa Azucarera “Antonio Sánchez” para realizar aislamientos de levaduras y cuatro cepas de la colección de cultivo del ICIDCA para evaluar su capacidad de producción de lípidos.

Se realizó una estrategia para la selección de la levadura de trabajo con mayor potencial para la acumulación de lípidos en vinazas a partir de la identificación taxonómica de las levaduras empleando métodos bioquímicos, la evaluación del crecimiento y de la acumulación de lípidos de en medios compuestos por vinaza y glicerol.

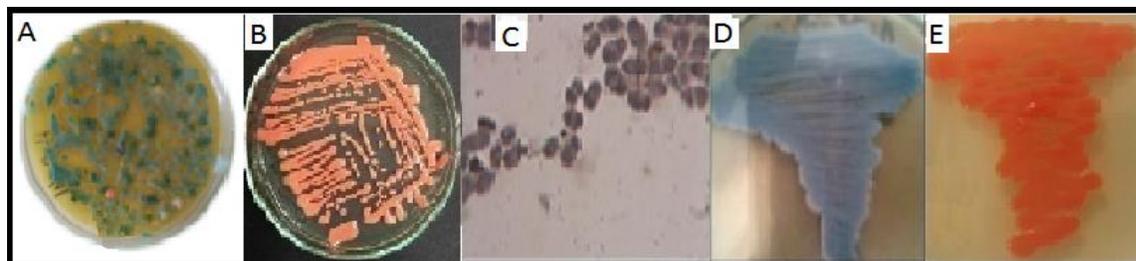


Figura 2: Imágenes de cultivos en placas de *R. toruloides* en diferentes medios de cultivo (A: Cultivo de muestra de miel en medio Sabouraud GC, B: Aislamiento de la cepa L/24-26-1 en medio YPG + cloranfenicol 1 %, C: Tinción de células con Sudán Negro B, D: Crecimiento de la cepa L/3-74-22 en medio CromoCen. D: Crecimiento de la cepa L/24-26-1 en medio Sabouroud GC Agar.

Tabla 2: Resultados de la identificación de las cepas a partir del método de API 20 AUX

Fuente de carbono	*						
	L/3-74-21	L/3-74-22	L/25-7-20	L/24-25-1	L/24-26-1	L/24-26-2	L/24-26-3
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	-	+	+	+	+
Arabinosa	-	-	-	+	+	+	+
Xilosa	-	+	-	+	+	+	+
D-galactosa	-	+	+	-	+	+	+
D-lactosa	-	-	-	+	-	-	-
D-sacarosa	-	+	+	+	+	+	+
Identificación	A	A	B	C	D	D	D
ID (%)	99,6	96,2	99,9	99,9	99,9	99,6	99,9

*: Nuevo aislamiento

A: *C. tropicalis*, B: *S. cerevisiae*, C: *R. minuta*, D: *Rhodotorula* sp.

ID: Índice de identidad

Tabla 3: Parámetros de crecimiento y acumulación de lípidos de las cepas *Rhodotorula* sp. cultivadas en medio compuesto por vinaza y glicerol purificado con una relación de DQO vin/glic 70:30, a pH 4, 30 °C y 600 min⁻¹.

Cepas	MSG (gL ⁻¹)	μ_{\max} (h ⁻¹)	Lípidos (% p/p)
L/24-26-1	12,1 ± 2,5 ^a	0,15 ± 0,05 ^a	20,3 ± 0,2 ^a
L/24-26-2	16,4 ± 3,9 ^b	0,13 ± 0,01 ^b	4,6 ± 0,8 ^b
L/24-26-3	14,5 ± 2,2 ^a	0,16 ± 0,02 ^a	5,8 ± 1,5 ^b

Como resultado de esta estrategia fue seleccionada una de las cepas aisladas de miel: L/24-26-3. La identificación molecular se realizó mediante la secuenciación de la región D1/D2 del ADNr 26S (White, 1990).

El ADN genómico fue extraído de una suspensión celular a una concentración de 1,0 -2,0 x 10⁷ células mL⁻¹ utilizando el Kit TIANamp Yeast DNA (TIANGEN, Cat. no. DP307, www.tiagen.com), diseñado para la extracción de ADN de levaduras mediante una serie de columnas de sílica. Este método está basado en una lisis enzimática empleando 50 U de la enzima litica, 10 U μ L⁻¹ (TIANGEN, Cat. No. RT401-02).

La secuenciación automática del ADN se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Academia de Ciencias de la República Popular China. La identificación molecular se realizó mediante la comparación de la secuencia obtenida con secuencias de diferentes especies de la base de datos NCBI con el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blastn>).

Para la construcción del árbol filogenético se utilizaron secuencias de la región D1/D2 de diferentes cepas tipo de especies y géneros almacenados en la base de datos GenBank. Las secuencias se alinearon utilizando el CLUSTALW (versión 1.83) como parte del programa MEGA X, empleando el método de Neighbour Joining (Saitou y Nei, 1987) y las distancias evolutivas fueron computadas por el método de Jukes Cantor (Jukes y Cantor, 1969).

La amplificación mediante la PCR de la región D1/D2 ribosomal extraída mostró un amplicón con un tamaño aproximado a los 600 pares de bases (pb). La búsqueda en el BLAST de la secuencia determinada permitió realizar la identificación preliminar de la cepa L/26-24-1 como *R. toruloides*, encontrando un porcentaje de similitud superior de 99 % con secuencias de cepas de esta especie en la base de datos internacional NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

La ubicación de la cepa de estudio en el árbol filogenético empleando cepas tipo de otros géneros y especies con similar región ITS, confirma la identificación de la cepa L/26-24-1 como *R. toruloides*. La secuencia fue introducida en la base de datos GenBank con el código *Rhodotorula* MT372485.

Generación de mutantes tolerantes a compuestos tóxicos

Otra estrategia que se propone en este proyecto es el uso integral de los azúcares presentes en el hidrolizado de bagazo de caña, para el cultivo de esta levadura con el objetivo de poder optimizar el proceso de producción de lípidos para la producción de biodiesel o alimento animal.

La bioconversión de estos materiales poliméricos requiere de un proceso que comprende la hidrólisis ácida y/o enzimática en monómeros, fundamentalmente xilosa, glucosa y arabinosa. Sin embargo, aunque la hidrólisis ácida diluida es un método eficiente, económico y ampliamente utilizado para el pretratamiento lignocelulosa, estos procesos conllevan a la aparición de más de 100 coproductos tales como el furfural, los ácidos alifáticos y poliaromáticos que se forman a partir de la degradación de la celulosa, hemicelulosa y lignina y que son inhibitorios para el crecimiento celular (Palmqvist y Hahn-Hagerdal, 2000, Parawira y Tekere, 2011, Dyk y Pletschke, 2012).

Esta problemática constituye actualmente un obstáculo para el establecimiento de un proceso tecnológico eficiente y ambientalmente sostenible, con el cual se obtenga SCO para la producción de biodiesel a precios competitivos frente a los combustibles fósiles.

Es por esto que en la actualidad las investigaciones se enfocan en la búsqueda de estrategias para aumentar la tolerancia de levaduras a los compuestos tóxicos generados en la etapa de pretratamiento. Entre ellas se destacan la ingeniería metabólica, la ingeniería evolutiva y la mutagénesis (Zhang y col., 2016).

La generación de mutantes microbianos mediante la alteración de los genomas tiene una gran importancia para las investigaciones y aplicaciones de la biotecnología (Tan y col., 2014; Kumar 2015). Recientemente, se ha empleado con éxito una nueva y eficiente herramienta de mutación nombrada como Plasma atmosférico a temperatura ambiente (ARTP por sus siglas en inglés: *Atmospheric room temperature plasma*) para producir cambios significativos en las actividades enzimáticas, la productividad bioquímica y el metabolismo sin daños letales (Xu y col., 2012, Wang y col., 2014). En comparación con los métodos convencionales de mutación, la mutagénesis de ARTP muestra algunas ventajas, tales como los bajos costos, temperaturas plasmáticas bajas y controlables, diversas especies químicas activas con una mutación rápida de alta densidad, flexible y segura (Zhang y col., 2014, 2015, Jiang y col., 2017).

Teniendo en cuenta estos antecedentes se utilizó el método de ARTP a *Rhodospiridium toruloides* con vistas a generar mutantes con una fuerte tolerancia a los compuestos tóxicos liberados en los hidrolizados ácidos lignocelulósicos del bagazo de caña, y así obtener una fuente de lípidos

Determinación de la relación letal inducida por el método de ARTP

La relación letal bien controlada es fundamental para la mutación y selección de los mutantes (Jiang y col., 2017). La relación letal de *R. toruloides* en los diferentes tiempos de tratamiento se muestra en la **Figura 3**. La letalidad se incrementó con el aumento de las descarga con plasma del cultivo de *R.toruloides*. Se alcanzó un 71,2, 92,0 y 96,6% de letalidad cuando el tiempo de exposición fue de 90,120 y 140 segundos respectivamente. Cuando las células fueron expuestas a mayor tiempo de tratamiento ninguna colonia sobrevivió. Se consideró que el 90% de relación letal era adecuado para la selección de los mutantes, por lo que todas las colonias que crecieron después de 90s fueron seleccionadas como mutantes generados mediante la mutagénesis por ARTP (Qi y col., 2014, Kitahara y col., 2014).

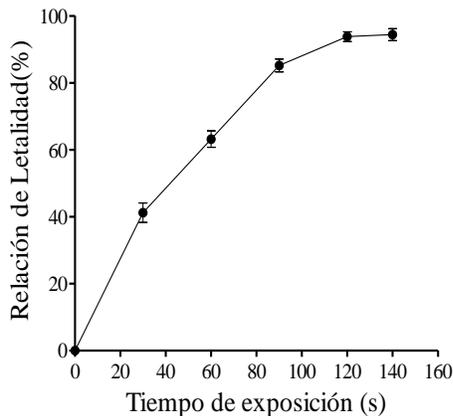
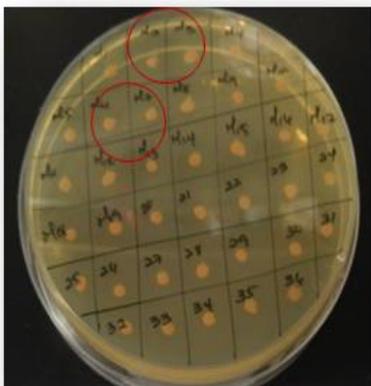


Figura 3. Relación entre las condiciones de tratamiento por ARTP y la letalidad de las colonias de *Rhodospiridium toruloides*. Las colonias se colectaron a las 24h de crecimiento en medio YPG. Las condiciones del tratamiento fueron: potencia de RF: 150 W, relación del flujo del gas helio: 10 L/min, Distancia entre las células de y la fuente de plasma: 2mm.

Selección de mutantes de *R.toruloides* por el método de ARTP

En la Figura 4 se muestran los 27 mutantes seleccionados, con una letalidad mayor del 90%.

Se seleccionaron 4 de los mutantes con 96% de letalidad que crecieron en la placa agar-HB 100% durante 72 horas y que demostraron su tolerancia a este medio durante 5 subcultivos consecutivos (M7, M3, M2 y M6).



Tiempo tratamiento (s)	Hidrolizado de bagazo (%)		
	50	75	100
120	M31	M12	M4
120	M35	M23	M9
120	M24	M20	M10
120	M28	M16	M11
120	M34	M26	M13
140	M36	M17	M2
140	M30	M25	M3
140	M33	M19	M6
140	M32	M21	M7

Figura 4: Colonias de *Rhodospiridium toruloides* mutadas por el método de ARTP, colectadas en medio compuesto por hidrolizado de bagazo

Estos resultados están en concordancia con diversos autores donde se demuestra que una relación letal entre un 90% y 99% favorece la generación de mutantes ([Zhang y col., 2014](#)).

Efecto de los inhibidores sobre el crecimiento de los mutantes de *Rhodospiridium toruloides*

Se evaluó el efecto de la presencia de los inhibidores predominantes en los hidrolizados de bagazo (vainillina, furfural y ácido acético) en el crecimiento celular de los mutantes seleccionados. Se ensayaron las concentraciones inhibitorias de cada uno de estos compuestos con vistas a determinar el comportamiento de los mutantes con respecto a la cepa salvaje en esas condiciones.

El crecimiento de los mutantes M2, M3, M6 y M7 con respecto al crecimiento de la cepa salvaje se muestran en la Figura 16.

En la figura 5A se puede observar que no existen diferencias significativas en el crecimiento entre los mutantes y la cepa salvaje en el medio control. Sin embargo, en los medios con vainillina, ácido acético y furfural, todos los mutantes tuvieron una menor fase de adaptación que la cepa salvaje, resultado que coincide con lo informado por otros autores (Ma y Liu, 2010, Liu, 2006, Liu y col., 2004, Liu, 2011) y evidenciando una mayor capacidad para el crecimiento en presencia de estos inhibidores. En todas las condiciones de cultivo los mutantes M2 y M6 mostraron un crecimiento mayor con relación a M3 y M7

En presencia de vainillina y furfural, el mutante M3 presentó una fase de adaptación mayor que el resto de los mutantes hasta la hora 50, mientras que los otros mutantes su fase de adaptación estuvo entre las 24 y las 30h de los cultivos. El mutante M7 en el medio con furfural presentó una fase de adaptación hasta las 50h mientras que la fase de adaptación de los mutantes M6 y M2 terminó a las 36h de cultivo.

Los mutantes M2, M6 y M7 en el medio con 1,25 g.L⁻¹ de vainillina y 10 g.L⁻¹ de ácido acético iniciaron la fase exponencial desde las 36h y 24h de cultivo, respectivamente. Sin embargo, Kurosawa y colaboradores (2015) informaron que *R. opacus* cepa MITXM-61 en presencia de 1,0 g.L⁻¹ de vainillina y 5,0 g.L⁻¹ de ácido acético, o sea a concentraciones menores a las utilizadas en este trabajo, presentó una fase de adaptación hasta las 48h, por lo que los mutantes M2 y M6 mostraron una mayor capacidad para el crecimiento que esta cepa.

Todos los mutantes mostraron una tolerancia al furfural, ácido acético y vainillina, sin embargo, estos tres compuestos no están relacionados estructuralmente indicando que los genes que podrían codificar la eliminación de estas sustancias tóxicas en las células de levadura fueron mutados en cada una de estas cepas. Cada mutante mostró diferencias en la tolerancia a estos compuestos por lo que esto sugiere que las mutaciones sean en genes diferentes.

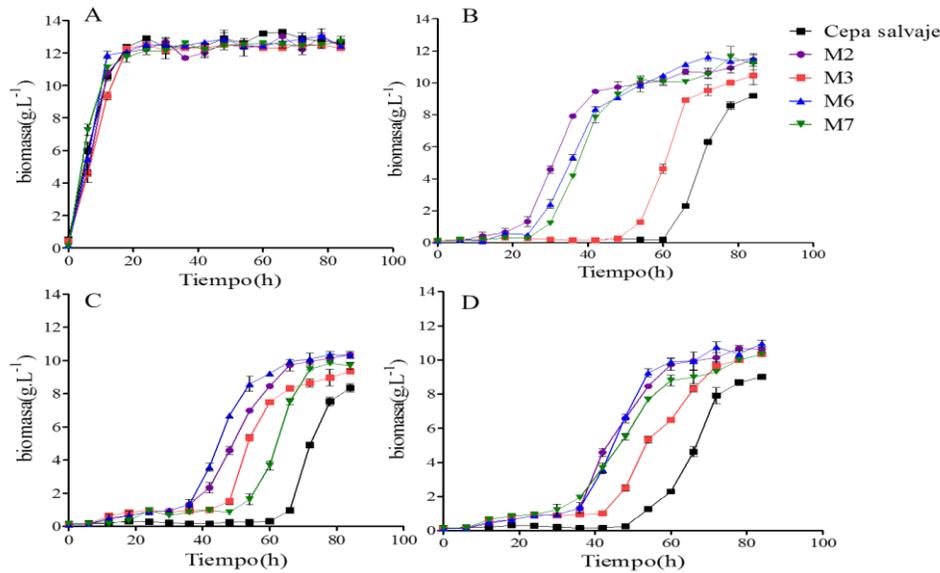


Figura 5. Efecto de la concentración de inhibidores sobre el crecimiento de la cepa salvaje y los mutantes (M2, M3, M6, M7) de *Rhodosporidium toruloides*. Las células fueron cultivadas en medio YPG con la adición de inhibidores: A: Medio Control B: 10g.L⁻¹ Ácido Acético, C: 1.5g.L⁻¹ de Furfural, D: 1.25g.L⁻¹ Vainillina. La fermentación realizada a incubados a 30°C y 150 r.min⁻¹

Evaluación de mutantes en hidrolizado de bagazo de caña de azúcar (HB)

Se evaluó el crecimiento de los mutantes M2, M3, M6, M7 y la cepa salvaje en un medio líquido compuesto por el HB a una concentración inicial de carbono de 55g.L⁻¹ (Acápite 3.1). El perfil de crecimiento de la cepa salvaje y los mutantes se muestra en la Figura 6. En el medio con el HB los mutantes presentaron un crecimiento superior al de la cepa salvaje. La fase de adaptación de los mutantes fue de 24 horas de cultivo, excepto el mutante M3, que tuvo una fase de adaptación de 48 horas, sin embargo su velocidad de crecimiento fue similar y sin diferencias significativas a la velocidad de crecimiento de los mutantes M2 y M6 (Tabla 4). El mutante M7 presentó una velocidad de crecimiento menor que el resto de los mutantes, pero superior a la velocidad de crecimiento de la cepa salvaje. La concentración de biomasa máxima se obtuvo a las 120 horas de cultivo. Las mayores concentraciones de biomasa y de consumo de los sustratos fueron obtenidas con los mutantes M2 y M6, mientras que la cepa salvaje presentó un pobre crecimiento.

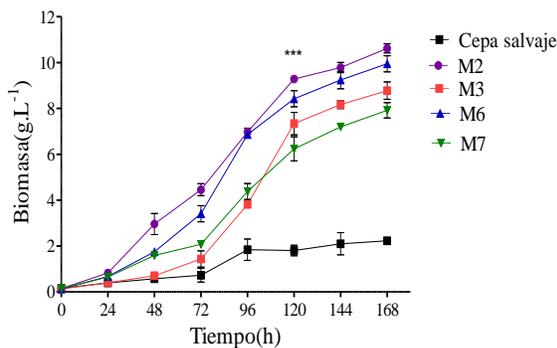


Figura 6. Perfil de crecimiento de *Rhodospordium toruloides*: cepa salvaje y mutantes (M2, M3, M6 y M7) en medio de cultivo a partir de hidrolizado de bagazo. La fermentación se realizó en Erlenmeyer invaginado de 500ml a 30 °C, 150 r.min⁻¹ durante 168h.

Tabla 4. Concentración de biomasa, parámetros cinéticos (velocidad de crecimiento (μ) y rendimiento de la producción de biomasa con respecto al sustrato ($Y_{X/S}$) y consumo de carbono del cultivo de *Rhodospordium toruloides* cepa L/24-26-1 y los mutantes cultivados en el medio compuesto por el hidrolizado de bagazo, a un pH inicial de 6.0, incubados a 30 °C y 150 r.min⁻¹ durante 168 horas.

Cepas	Biomasa (g.L ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	Consumo de carbono (g.L ⁻¹)
M2	10,62 ± 0.34 ^a	0,036 ± 0,004 ^a	0,25 ± 0,011 ^a	42,24 ± 1.8 ^a
M3	8,78 ± 0.66 ^b	0,035 ± 0,006 ^a	0,26 ± 0,009 ^a	33,74 ± 0.1 ^b
M6	9,95 ± 0,61 ^a	0,032 ± 0,003 ^a	0,21 ± 0,007 ^b	46,34 ± 1.4 ^a
M7	7,96 ± 0,58 ^c	0,023 ± 0,004 ^b	0,24 ± 0,010 ^a	32,61 ± 0.6 ^b
Cepa Salvaje	1,84 ± 0.39 ^d	0,019 ± 0,002 ^c	0,17 ± 0,009 ^c	10.54 ± 1.2 ^c

Estos resultados concuerdan con estudios publicados en los últimos años. Por ejemplo, Yu y colaboradores (2011) encontraron que *R. toruloides* cepa ATCC 10788 creció en un medio compuesto por un hidrolizado de trigo detoxificado alcanzando un concentración de biomasa de 9,9 g.L⁻¹, pero esta cepa no fue capaz de crecer en el mismo medio sin la detoxificación del hidrolizado. Sin embargo, *Yarrowia lipolytica* cepa Po1g creció en medio compuesto por un hidrolizado de bagazo conteniendo 13,51 g.L⁻¹ de xilosa y 3,93 g.L⁻¹ de glucosa sin detoxificar, alcanzando un concentración de biomasa de 11,42 g.L⁻¹ (Tsigie y col., 2011).

Evaluación del consumo de sustrato

Para una mejor comprensión del metabolismo de los mutantes se evaluó el consumo de la glucosa, xilosa y el ácido acético en el tiempo (Figura 7). La glucosa y el ácido acético se consumieron simultáneamente a partir de las 24h de cultivo, excepto en el mutante M3 donde el consumo comenzó a las 48h a menor velocidad con respecto al resto de los mutantes. La xilosa se consumió después de agotada la glucosa en el medio entre las 48h y las 72h de cultivo. La arabinosa no fue consumida, lo cual indica que la levadura no puede asimilar fácilmente este monosacárido.

Los mutantes M2 y M6 a las 48h de cultivo consumieron el 100% de glucosa, el 58% y el 48% de ácido acético y solo el 94 y 96% de xilosa, respectivamente. La xilosa, fue metabolizada en todos los mutantes a una misma velocidad de consumo de 0,27 ± 0, 01g.L⁻¹.h⁻¹ a las 48h de cultivo, excepto M3 que fue de 0,20 ± 0, 01 g.L⁻¹.h⁻¹.

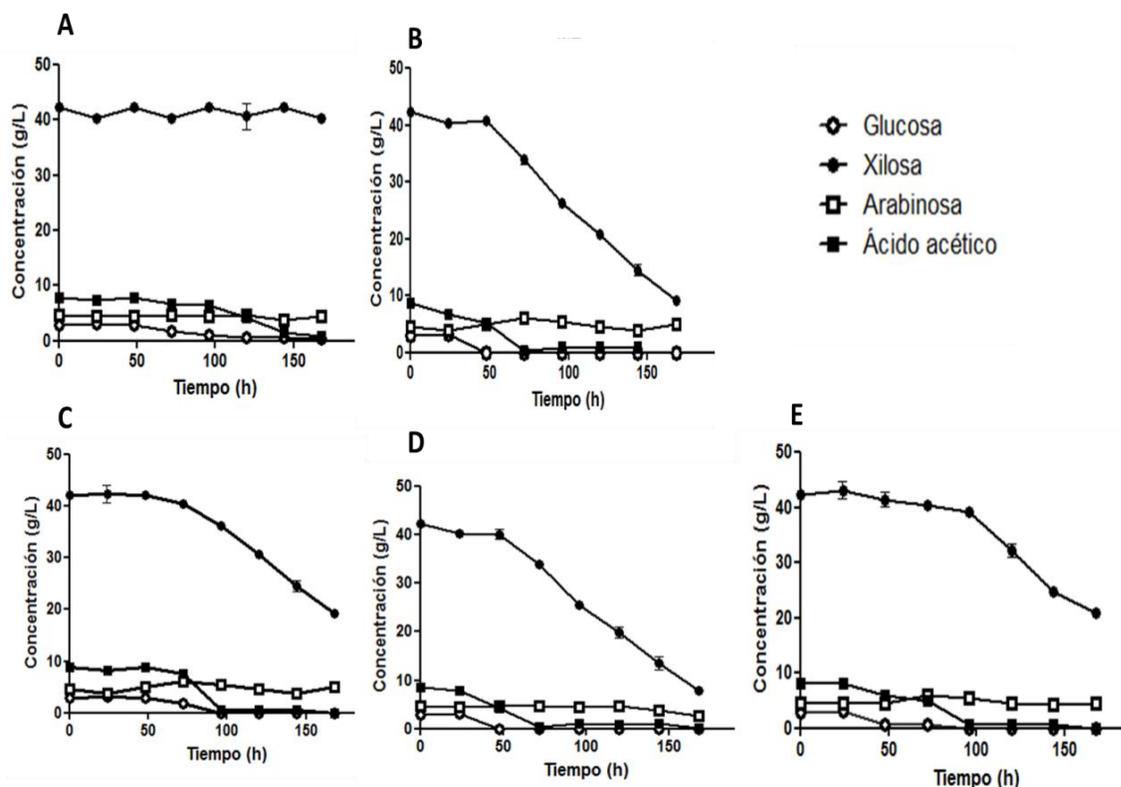


Figura 7. Perfil de Consumo de sustrato por la cepa salvaje y los mutantes de *Rhodosporidium toruloides* en hidrolizado de bagazo. La fermentación se realizó en Erlenmeyer invaginado de 500ml a 30 °C, 150 r.min⁻¹ durante 168h. La concentración inicial de fuente de carbono residual fue de 55g.L⁻¹ que incluye glucosa, xilosa, arabinosa y ácido acético. A: Cepa salvaje, B: M2, C: M3, D: M6 y E: M7.

Evaluación de la producción de lípidos

El contenido lipídico, el rendimiento lipídico y la productividad lipídica de la cepa salvaje y los mutantes se muestra en la Tabla 4. Todos los mutantes produjeron lípidos de manera significativa con relación a la cepa salvaje, en la cual no se pudo cuantificar lípidos por el escaso crecimiento en este medio.

Las cepas mutadas acumularon entre 3,49 y 4.03 g.L⁻¹ de lípidos cuando fueron cultivadas en 55 g.L⁻¹ de medio con HB. De los cuatro mutantes seleccionados, M2 y M6 fueron los que tuvieron mayor productividad lipídica.

El contenido de lípidos acumulados en los mutantes es semejante a los descrito por varios autores en especies de *Rhodosporidium* en medios con hidrolizados lignocelulósicos (Yen y Chang, 2015, Liu y col., 2015,).

Tabla 5: Contenido de lípidos, concentración de lípidos, y rendimiento de la producción de lípidos con respecto al sustrato ($Y_{X/S}$) y productividad de lípidos de *Rhodosporidium toruloides* cepa L/24-26-1 y los mutantes cultivados en el medio compuesto por el hidrolizado de bagazo, a un pH inicial de 6.0, incubados a 30 °C y 150 r.min⁻¹ durante 168 horas.

Cepas	Contenido lípidos (% p/p)	Lípidos (g.L ⁻¹)	Y L/S (g.g ⁻¹)	Productividad (g.L.h ⁻¹)
M2	37,70± 3,37 ^a	4,03± 0.42 ^a	0,10 ^a	0,026 ^a
M3	32,90± 2,05 ^b	3,51± 0.21 ^b	0,09 ^a	0,017 ^b
M6	39,90± 2.87 ^a	3,50± 0.16 ^b	0,09 ^a	0,024 ^a
M7	35,10± 1.03 ^b	3,49± 0.09 ^b	0,09 ^a	0,017 ^b
Cepa Salvaje	N.D	N.D	N.D	N.D

Como resultado de este estudio se obtuvieron tres mutantes de *R. toruloides* mostraron tolerancia al hidrolizado de bagazo. Los mutantes M2 y M6 mostraron una alta tolerancia al ácido acético 10 g.L⁻¹, la vainillina 1,25 g.L⁻¹ y el furfural 1.5 g. L⁻¹ y alcanzaron una concentración de biomasa y un contenido de lípidos mayores en 5 y 10 veces, respectivamente en el medio con hidrolizado de bagazo.

Determinación de carotenos

La medición del contenido de carotenoides se realizó según el protocolo de Taskin y col. (2011) con ciertas modificaciones. La concentración de carotenoides totales se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{carotenoides totales } (\mu\text{g. g}^{-1}) = \frac{A_{485} \times D \times V}{E \times \text{peso seco}(g)}$$

Dónde:

D - Relación de dilución de la muestra

V - Volumen de disolvente de extracción (mL)

E - Coeficiente de extinción de carotenoides totales (0,16)

W - Peso seco de la levadura (g)

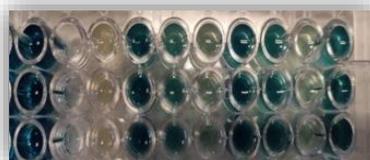
La evaluación de la producción de carotenoides de la cepa seleccionada (mutante M6) se realizó en medio compuesto por miel de caña, miel de caña hidrolizada, sacarosa, vinaza y glicerol, hidrolizado de bagazo. Los resultados obtenidos se compararon con los valores reportes de la literatura en medios similares.

La actividad antioxidante de los pigmentos carotenoides se realizó mediante ensayo de eliminación de radicales reportados en la literatura (Melendez y col., 2014; Martínez-Ávilay col ., 2012):

-DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

-ABTS+ 2,2'-azino-bis (3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid)

-FRAP (Reducción del hierro Fe³⁺)



Los resultados de los tres métodos mostraron que todas las muestras presentaban actividad antioxidante aunque la sensibilidad de los métodos no fue similar (Figura 3)

Una vez definidas las mejores condiciones de producción de biomasa, se determinó el contenido de carotenoides mediante HPLC mediante el protocolo descrito por Hernandez-Almanza y col. (2014). Se identificaron los carotenoides: torularhodina, β -caroteno y licopeno en todas las muestras analizadas.

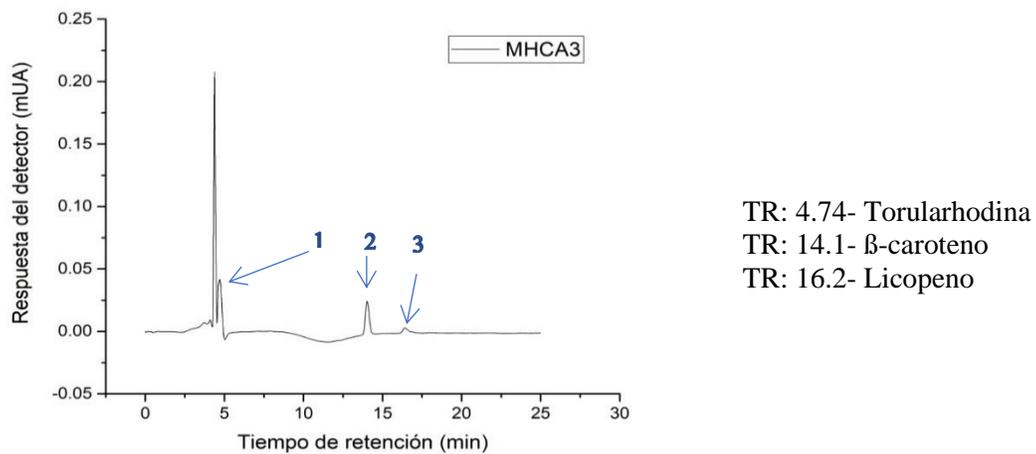


Figura 8: Cromatograma obtenido para la identificación de carotenos

Como resultado de la evaluación de carotenos se pudo determinar que la cepa seleccionada cultivada en las condiciones de fermentación apropiadas para la acumulación de lípidos es capaz de producir carotenos a niveles similares a los reportados en la literatura por otras cepas del género *Rhodospiridium* y *Rhodotorula*

Tabla 6: Concentración de carotenoides en las muestras de biomasa al final de la fermentación

Sustrato	Sistema	carotenoides totales(μ g/g)
Miel	Frascos	169,9
Miel hidrolizada	Frascos	238,5
Hidrolizado de bagazo	Frascos	252,3
Vinaza + glicerol	Frascos	205,7

Resultado planificado 3:

Optimización de las condiciones de fermentación para producir el máximo valor de biomasa y lípidos

Efecto del pH inicial

Considerando que las vinazas cubanas tienen un pH ácido, generalmente en un intervalo entre 4,0 y 4,4, y que el intervalo de pH óptimo para el crecimiento de las levaduras se encuentra entre 3,0 y 6,0, se realizó la evaluación del efecto del pH inicial en el crecimiento y la acumulación de lípidos de *R. toruloides* cepa L/24-26-1 en el intervalo de 4,0 a 6,0, empleando un medio limitado de nitrógeno (C/N = 250).

La velocidad específica de crecimiento máxima y el contenido de lípidos se incrementaron significativamente con el aumento del pH inicial a partir de 5,0. Al emplear pH inicial 6,0 se alcanzó un incremento de estos parámetros de 35,8 y 24,11 % respectivamente, respecto al pH inicial 4,0. La mayor productividad se alcanzó a pH inicial 6,0 con $0,033 \pm 0,001 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$. La **Tabla 7** muestra un resumen de los resultados.

Tabla 7: Concentración de biomasa, velocidad específica de crecimiento máxima, contenido de lípidos y productividad de *R. toruloides* cepa L/24-26-1 cultivada en un intervalo de pH de 4,0 – 6,0 empleando glicerol y urea en medio limitado (C/N 250).

pH	Biomasa (gL^{-1})	μ (h^{-1})	Lípidos (% p/p)	Lípidos (gL^{-1})	Productividad ($\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$)
4,0	12,32±0,16 ^a	0,106±0,004 ^a	25,3±1,3 ^a	3,12±0,001 ^a	0,022±0,001 ^a
4,5	12,61±0,16 ^a	0,111±0,001 ^a	25,6±1,5 ^a	3,23±0,001 ^a	0,023±0,001 ^a
5,0	13,08±0,15 ^a	0,127±0,002 ^b	26,1±2,2 ^a	3,42±0,002 ^a	0,023±0,001 ^a
5,5	14,50±0,11 ^a	0,132±0,002 ^b	29,4±1,8 ^b	4,26±0,001 ^b	0,030±0,001 ^b
6,0	14,80±0,20 ^a	0,144±0,003 ^c	31,4±1,7 ^b	4,65±0,002 ^b	0,033±0,001 ^b

Letras diferentes en una misma columna de la tabla indican que existen diferencias significativas según la Prueba de Tukey ($p \leq 0,05$). Se muestran los valores promedio de 3 réplicas \pm DE.

Evaluación de la fuente de nitrógeno

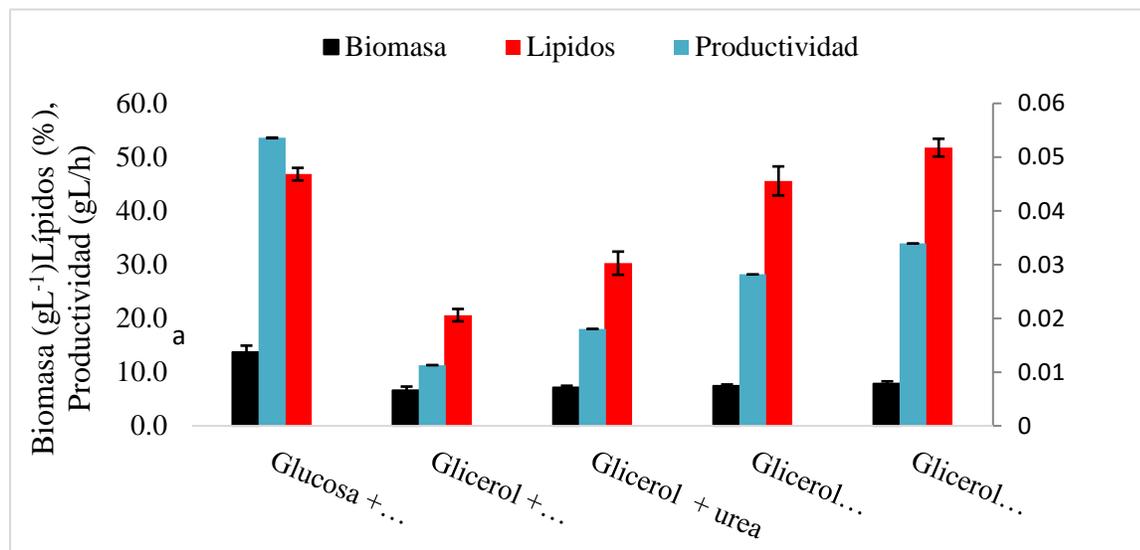
El efecto de la fuente de nitrógeno en el nivel de lípidos totales y en el perfil de AG se ha analizado por varios autores, obteniéndose diferentes resultados dependiendo de la especie de levadura (Husain y Hardin, 1952, Ramírez y col., 2017, Mukhtar y col., 2018, Awad y col., 2019, Chen y col., 2021). El

comportamiento de la acumulación de lípidos varía cuando se utilizan fuentes de nitrógeno orgánicas o inorgánicas (Enshaeieh y col., 2012, Dias y col., 2021, Enshaeieh y col., 2013, Evans y Ratledge, 1984), en dependencia de la cepa en particular.

En los informes de la literatura aparece la evaluación de diversas fuentes de nitrógeno y se señala el sulfato de amonio como la fuente más empleada para estimular la acumulación de lípidos (Papanikolaou y Aggelis, 2002, Zhang y col., 2011).

En la se muestran los resultados obtenidos de concentración de biomasa, contenido de lípidos y productividad determinados en cada condición.

Figura 9: Efecto de la fuente de nitrógeno en presencia de glicerol purificado y glicerol industrial, 50 gL⁻¹. El ensayo se realizó en erlenmeyers invaginados de 1 L a 30 °C, 150 min⁻¹ durante 24 h.



No se produjeron diferencias significativas en el crecimiento celular al comparar el empleo de urea y sulfato de amonio en el glicerol purificado ni el industrial. Sin embargo, se obtuvo un incremento significativo del contenido de lípidos cuando se sustituyó el sulfato de amonio por la urea tanto con el glicerol purificado como el industrial, alcanzando valores superiores en 46,9 y 13,6 %, respectivamente. Este comportamiento es similar al obtenido por otros autores con la cepa *R. toruloides* CBS 14 en diferentes fuentes de nitrógeno como cloruro de amonio y L-glutamato, donde alcanzaron 18 y 51 %, respectivamente (Evans y Ratledge, 1983).

Como resultado de los incrementos del contenido de lípidos, la productividad alcanzada al sustituir el sulfato por la urea fue superior en un 63 % empleando el glicerol purificado y 21 % con el industrial. Los mejores resultados de este ensayo se obtuvieron empleando glicerol industrial y urea, alcanzando valores de $7,9 \pm 0,4$ gL⁻¹ de biomasa, $51,8 \pm 1,6$ % de lípidos y productividad $0,034 \pm 0,0005$ gL⁻¹h⁻¹.

Kuntzler y colaboradores (2013) y Spier y colaboradores (2015) obtuvieron contenidos similares de lípidos empleando levaduras *R. mucilaginosa* (55,1 %) y *Lipomyces lipofer* (*L. lipofer*) NRRL Y-11555 (57,8 %), cultivadas en glicerol industrial. Por otro lado, los resultados de Xu y colaboradores (2012) fueron superiores (70 %) al cultivar la levadura genéticamente modificada *R. toruloides* AS2.1389 en un fermentador de 5L.

Varios grupos de investigadores han demostrado que el uso de nitrógeno orgánico e inorgánico tiene diferentes efectos sobre el crecimiento celular y la acumulación de lípidos (Li y col., 2017, Zhang y col., 2011). Según estos estudios, el nitrógeno orgánico mejora tanto el crecimiento celular como la acumulación de lípidos mientras que el nitrógeno inorgánico es más beneficioso para la acumulación de lípidos. Sin embargo, otros grupos plantean que las levaduras producen concentraciones de lípidos mayores cuando crecen en presencia de fuentes de nitrógeno orgánicas respecto a las inorgánicas (Passoth y Sandgren, 2019, Li y col., 2010). Este hecho puede deberse a que las fuentes orgánicas de nitrógeno también contienen vitaminas y aminoácidos que pueden apoyar el crecimiento y la producción de lípidos de las levaduras.

El efecto de la concentración de nitrógeno es un factor crítico en la acumulación de lípidos y define junto con la concentración de carbono, el efecto de la relación molar carbono/nitrógeno (C/N). Se realizó un estudio donde se emplearon diferentes concentraciones de sulfato de amonio y una concentración de glicerol de 50 gL⁻¹, las cuales equivalen a valores de C/N de 50, 100, 150, 200, 250, 300 y 400.

En las condiciones evaluadas se observó que en el intervalo de C/N 50 – 400, la concentración de biomasa y el rendimiento biomasa/sustrato se mantuvieron constantes en un valor promedio de 13,47 ± 0,8 gL⁻¹ y 25,88 ± 1,6 gg⁻¹, respectivamente. Sin embargo, el contenido de lípidos alcanzó valores máximos en el intervalo de 250 a 400 (39,3 ± 2,5 %) y la productividad en el intervalo de 200 a 300 (0,033 ± 0,004 gL⁻¹h⁻¹), por lo que se seleccionó la relación molar C/N 250 para continuar los estudios posteriores. Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones evaluadas (50 ≥ C/N ≥ 400), el metabolismo de *R. toruloides*, cepa L/24-26-1, está dirigido hacia la biosíntesis de lípidos y no a la proliferación celular. La Figura 10 muestra el comportamiento de los principales parámetros de crecimiento y producción obtenidos.

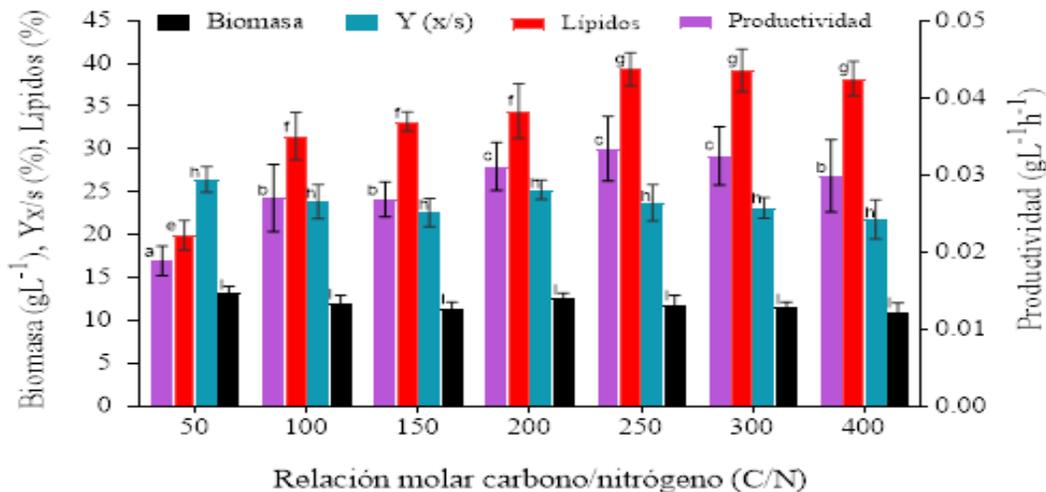


Figura 10: Concentración celular, contenido de lípidos, rendimiento biomasa/sustrato y productividad de *R. toruloides* cepa L/24-26-1 con el incremento de la relación molar C/N. Cada punto representa la media de la concentración de biomasa, del rendimiento biomasa/sustrato, del contenido de lípidos y de la productividad ± D.E de tres muestras de un experimento representativo de tres corridas realizadas (* p<0.05, prueba de Fisher).

Determinada la C/N donde se alcanzó la mayor productividad (C/N 250), se determinaron los valores de concentración de biomasa celular, contenido de lípidos y productividad que alcanza la cepa L/24-26-1 en el intervalo de 20 – 120 gL⁻¹ de glicerol en esta condición.

Los resultados mostraron que la concentración de biomasa aumentó hasta emplear glicerol 40 gL⁻¹ y a continuación se mantuvo constante (11,1 ± 0,4 gL⁻¹), el contenido de lípidos aumentó hasta la condición con 80 gL⁻¹ (48,1 ± 1,3%) (no se obtuvieron resultados que difieran de forma significativa a partir de 60 gL⁻¹) y la productividad de lípidos tuvo un comportamiento parabólico donde los valores superiores se obtuvieron en el intervalo de 60 – 80 gL⁻¹ de glicerol (0,033 ± 0,002 gL⁻¹h⁻¹).

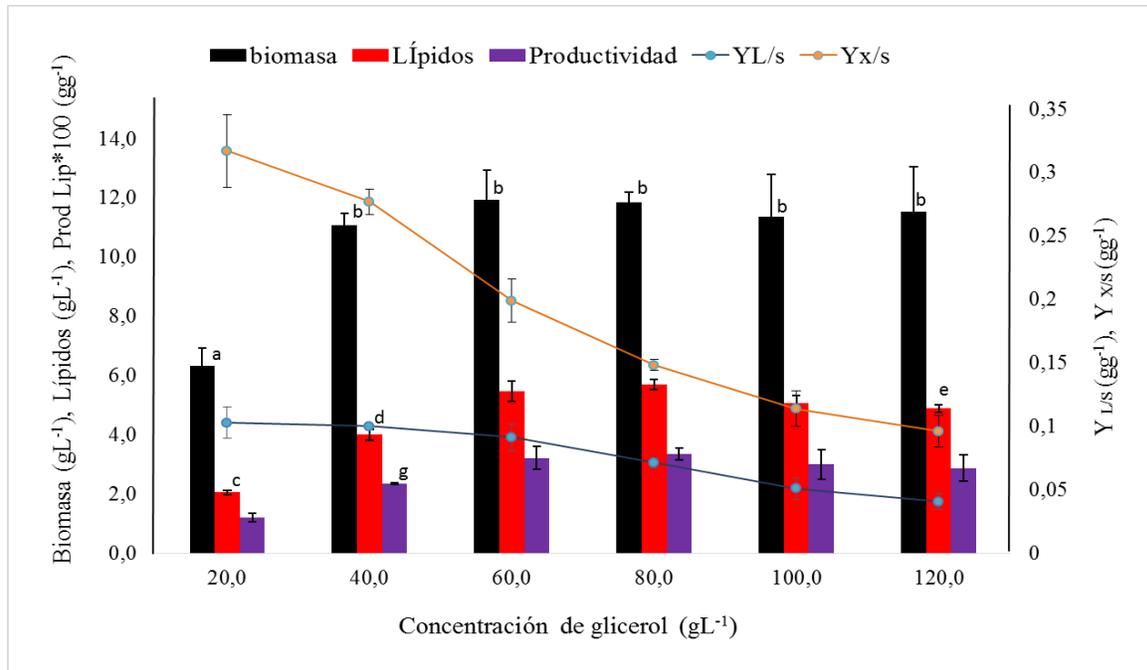


Figura 11: Concentración celular, contenido de lípidos, rendimiento biomasa/sustrato y productividad de *R. toruloides* cepa L/24-26-1 empleando concentraciones de glicerol de 20 – 120 gL⁻¹ y relación molar C/N 250. Cada punto representa la media de la concentración de biomasa, del rendimiento biomasa/substrato, del contenido de lípidos y de la productividad ± la DE de tres muestras de un experimento representativo de tres corridas realizadas (p<0.05, prueba de Fisher).

Efecto de la composición de las vinazas

Para evaluar el efecto de la composición de las vinazas se emplearon las vinazas A y vinazas B, previamente caracterizadas.

Varios autores han observado inhibición del crecimiento celular de las levaduras cuando han sido cultivadas en vinazas de destilerías de etanol (Soares y col., 2017, Ling y col., 2016, Ling y col., 2013, Otero y col., 2007). Aunque el efecto de la dilución en la vinaza A se evidencia en los valores alcanzados de concentración de biomasa en las dos condiciones evaluadas, no se observó una etapa de latencia o adaptación al inicio del cultivo, lo cual demuestra que no se produce inhibición del crecimiento en esta vinaza.

El comportamiento cinético de la cepa L/24-26-1 en la vinaza B sin diluir mostró una fase de latencia de 24 horas aproximadamente y a continuación comenzó un crecimiento exponencial lento con una velocidad específica máxima de 0,034 h⁻¹. La dilución de esta vinaza, factor 2 (DQO = 35 000 mgL⁻¹) permitió que la fase de adaptación se redujera aproximadamente a dos horas y que la población aumentara su velocidad específica de crecimiento de manera significativa hasta 0,143 h⁻¹. Es posible

que en la vinaza B estén presentes otros compuestos a una concentración tóxica que produzcan la inhibición y que no fueron identificados en este estudio, como el ácido levulínico y el p-benzaldehído.

Se ha informado que la DQO inicial de la vinaza es el factor que tiene el mayor efecto en el crecimiento y la acumulación de lípidos, en comparación con otros parámetros como tamaño del inóculo, la temperatura y el tiempo de cultivo. De forma general, los investigadores plantean que las vinazas deben ser diluidas hasta alcanzar una carga orgánica por debajo de 25 000 mgL⁻¹ debido a la presencia de compuestos inhibidores del crecimiento como el furfural y el HMF (Lima y col., 2017, Zhao y col., 2012).

Tabla 8: Biomasa, velocidad específica máxima y remoción de DQO con la cepa L/24-26-1 en vinazas A y B diluidas (factor 2) y sin diluir (factor 1)

Factor	t (h)	X (gL ⁻¹)	μ_{\max} (h ⁻¹)	Remoción DQO (%)
Vinaza A				
1	74	14,5 ± 0,04	0,116 ± 0,015	70,5 ± 1,33
2	51	9,40 ± 0,16	0,116 ± 0,021	55,3 ± 0,45
Vinaza B				
1	96	11,5 ± 0,51	0,034 ± 0,006	68,6 ± 0,52
2	24	13,9 ± 0,41	0,143 ± 0,022	71,3 ± 0,76

Los resultados obtenidos con la vinaza A sin diluir y la vinaza B diluida (factor 2) con carga orgánica superior a los 35 000 mgL⁻¹ contradicen el planteamiento anterior ya que en estas condiciones no se produjo inhibición. Este resultado sugiere que la variable o elemento determinante para que ocurra la inhibición del crecimiento celular en las vinazas no es la concentración de carga orgánica, sino la composición en cuanto a la presencia y concentración de compuestos tóxicos que inciden en la inhibición del crecimiento de la levadura en particular.

Varios estudios han informado sobre el efecto de los ácidos orgánicos en las levaduras y han establecido algunos valores de concentración de compuestos considerados como alarmas del proceso industrial que indican la presencia de problemas en el desempeño metabólico de las levaduras y conllevan a una disminución de los rendimientos. La mayoría de los eventos inhibitorios en los microorganismos se deben a la presencia simultánea de dos o más compuestos tóxicos. La tolerancia a los mismos y el efecto sinérgico que desarrollen depende de cada cepa en particular. Según los informes de varios grupos de investigadores la presencia de diferentes compuestos tóxicos puede, inhibir o estimular, tanto el crecimiento como la acumulación de lípidos (Hu y col., 2009, Zhao y col., 2012, Xavier y col., 2017).

Efecto de la temperatura

La evaluación del efecto de la temperatura se realizó en un intervalo de 25 a 35 °C teniendo en cuenta que varios autores han informado que, independientemente de las condiciones de operación y de la relación C/N, el crecimiento de las levaduras oleaginosas es extremadamente lento por encima de 35 °C y que el intervalo óptimo para la producción de lípidos está entre 25 y 35 °C (Sargeanta y col., 2014). La Figura 12 muestra el comportamiento de la biomasa, el contenido de lípidos y la productividad en este intervalo empleando un medio compuesto por vinaza B diluida (factor 2).

Los resultados del ensayo demuestran que la máxima concentración de biomasa se alcanzó a 25 °C ($26,6 \pm 0,7 \text{ gL}^{-1}$), sin embargo, el contenido de lípidos no varió de forma significativa en el intervalo de temperatura evaluado, manteniéndose en un valor de $20,02 \pm 0,38 \%$, por lo que la mayor productividad de lípidos se obtuvo a 25 °C ($0,027 \pm 0,001 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$). Estos resultados son similares a los informados por Want y colaboradores (2017), en un estudio realizado con *Rhodospiridium sp.* cepa TJUWZ4 en un intervalo temperatura de 20 a 35 °C.

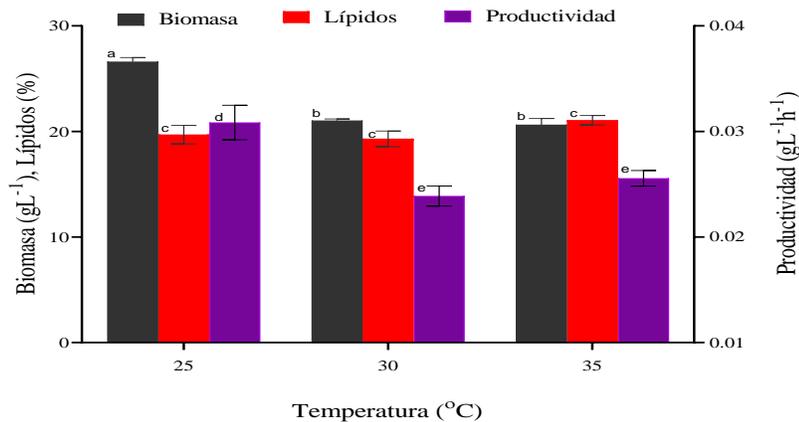


Figura 12: Concentración celular, contenido de lípidos y productividad de *R. toruloides* cepa L/24-26-1 en el intervalo de 25 - 35°C, empleando vinaza B (factor 2) suplementada con glicerol 50 gL^{-1} a pH 6, 150 min^{-1} . Cada punto representa la media de la concentración de biomasa, del rendimiento biomasa/substrato, del contenido de lípidos y de la productividad \pm la DE de tres muestras de un experimento representativo de tres corridas realizadas ($p < 0.05$, Prueba múltiple de Dunn).

La acumulación de lípidos en microorganismos oleaginosos está asociada a la limitación de algún nutriente y a altas concentraciones de azúcares, siendo en la mayoría de los casos la limitación de nitrógeno. Después que se agota el nitrógeno del medio, la división celular se detiene y cesa la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, aun así, la síntesis y acumulación de lípidos continúa (Chen y col., 2021).

La mayor síntesis de grasas en muchas levaduras se alcanza cuando el medio de cultivo tiene un contenido de nitrógeno de 50-70 % por debajo del valor óptimo. En un amplio estudio realizado por Sitepu y colaboradores (2014a), se observó que el agotamiento de nitrógeno promueve una mayor acumulación de lípidos en levaduras oleaginosas, obteniendo un mayor contenido de lípidos en 35 de las 37 especies de levaduras evaluadas.

En la producción de lípidos con microorganismos oleaginosos a través de cultivos por lote se utiliza una alta relación molar C/N para dirigir el carbono excedente hacia la acumulación de lípidos después de alcanzarse la condición de limitación de nitrógeno. Mientras el nitrógeno no sea limitante, el cultivo se mantendrá en fase exponencial y la biomasa continuará creciendo. Cuando el nitrógeno se agota, el crecimiento se detiene considerablemente y comienza la fase de acumulación de lípidos.

La concentración de lípidos acumulados depende de la concentración de biomasa alcanzada durante la fase de crecimiento, la cual depende de la concentración inicial de carbono añadido (Beopoulos y col., 2008), pero a su vez altas concentraciones de carbono pueden inhibir el crecimiento al inicio, por ello los cultivos por lote no son factibles en la escala industrial (Li, 2007).

Los cultivos de alta densidad ofrecen ventajas para alcanzar costos beneficiosos de los bioprocesos a escala industrial. Se han realizado algunos ensayos que han logrado resultados satisfactorios en la producción de lípidos empleando cultivos de alta densidad, como cultivos continuos, incrementados y cultivos enriquecidos con oxígeno (Li y col., 2010, Liang y col., 2010, Amaretti y col., 2010, Papanikolaou y col., 2007, Zhao y col. 2010, Poontawee y Limtong, 2020).

En el proyecto se realizaron tres estrategias de cultivo incrementado para la producción de lípidos con el objetivo de incrementar la productividad del proceso:

- Estrategia I: Incrementos con pulsos de glicerol industrial para ajustar una concentración de 50 gL⁻¹ en el fermentador.
- Estrategia II: Incrementos con pulsos de la solución de vinaza B diluida (factor 10) y el glicerol industrial ajustando a 60 gL⁻¹.
- Estrategia III: Incremento mediante flujo continuo de una solución de vinaza B diluida (factor 3) y glicerol industrial 500 gL⁻¹.

En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos en las estrategias evaluadas demostrándose que en la tercera estrategia se logra obtener los valores más altos de productividad de lípidos

Tabla 9: Resumen de los parámetros de producción de las estrategias de cultivo incrementado I –III a las 240 hs.

Suplemento	Modo	MSG (gL ⁻¹)	Lípidos (%)	Prod (gL ⁻¹ h ⁻¹)	Biomasa (g)
Glic 50 gL ⁻¹	Pulsos	132,3±7,7	34,3±2,5	0,19±0,02	330,8±7,7
Glic 50 gL ⁻¹ + Vin 1:10	Pulsos	143,6±6,2	28,8±3,5	0,17±0,08	402,1±2,9
Glic 500 gL ⁻¹ + Vin 1:3	Flujo constante	136,0±1,9	52,5±7,5	0,30±0,04	523,6±2,4

Al comparar la productividad de las tres estrategias a las 240 h se observa que se alcanzó el mayor valor empleando la estrategia III con $1,6 \pm 0,1$ veces, respecto a las estrategias I y II. El contenido de lípidos respecto a las estrategias I y II fue superior en 1,5 y 1,8 veces, respectivamente. Las estrategias evaluadas confirman que el modo incrementado es adecuado para desplazar el metabolismo celular hacia la acumulación de lípidos y prevenir la inhibición por sustrato que puede ocurrir en el modo discontinuo. Mediante el modo incrementado con flujo constante fue posible alcanzar incrementos significativos en cuanto a la producción de biomasa, la acumulación de lípidos y la productividad.

Aunque en la literatura aparecen numerosos estudios empleando cultivos incrementados para la producción de lípidos a partir de levaduras oleaginosas, en la mayoría de estos el sustrato utilizado es la glucosa (Li y col., 2006, Zhu y col., 2008, Prashant y col., 2019). Yamauchi y colaboradores (1983), alcanzaron altas densidades celulares de *L. starkeyi* con una concentración de biomasa de 153 gL⁻¹ y 53 % de contenido de lípidos. Meester y colaboradores (1996) cultivaron *Candida curvatus* empleando cultivos incrementados con glicerol y obtuvieron concentraciones de biomasa de 118 gL⁻¹ y 25 % de lípidos con una productividad de 0,59 gL⁻¹h⁻¹. Li y colaboradores (2007), alcanzaron concentraciones de biomasa, de lípidos y una productividad de 106,5 gL⁻¹, 67,5 % y 0,54 gL⁻¹h⁻¹ respectivamente con la cepa *R. toruloides* Y4 empleando sistemas incrementados con glucosa. Wiebe y colaboradores (2012)

lograron alrededor del 75 % de lípidos mediante pulsos y alimentación constante de glucosa en cultivos de *R. toruloides* CBS14.

En los estudios realizados por Zhou y colaboradores (2013), con *R. toruloides* cepa Y2 empleando vinazas de destilerías se logró incrementar el contenido de lípidos de 39,5 a 53,8 % mediante la adición de glucosa a un flujo de 1,2 gL⁻¹d⁻¹. Aunque las máximas concentraciones de biomasa obtenidas en las tres estrategias aplicadas en este estudio fueron superiores a la obtenida por Li y colaboradores (2007) empleando *R. toruloides* Y4 con glucosa (106,5 gL⁻¹); solo en la estrategia III se logró una acumulación de lípidos próxima a la alcanzada por estos investigadores (67,5 %). Sin embargo, la productividad en este estudio fue considerablemente inferior respecto a estos casos, lo cual es razonable si se considera que la velocidad específica de crecimiento en presencia de glucosa es superior a la alcanzada en presencia de la mezcla vinaza/glicerol industrial.

Es necesario destacar que los resultados similares respecto al contenido de lípidos que se han obtenido en otros sistemas por lote e incrementado por otros investigadores (Tchakoutcu y col., 2017, Signori y col., 2016) son alcanzados por cepas manipuladas genéticamente (DSM 4444 y AS2.1389).

Al comparar los resultados previos obtenidos en cultivos incrementados de cepas del género *Rhodospiridium* sp., y de levaduras oleaginosas manipuladas genéticamente, para la acumulación de lípidos empleando glucosa, glicerol purificado e industrial o vinazas de destilerías, se puede afirmar que el empleo de mezclas de vinazas de destilerías de etanol y glicerol industrial permite alcanzar resultados similares o superiores cuando se emplean individualmente (Li y col., 2007, Liang y col., 2010, Saenge y col., 2011, Wiebe y col., 2012, Zhou y col., 2013, Raymondi y col., 2014, Signori y col., 2016, Hoarau y col., 2018, Kitcha y Cheirsilp, 2014, Schneider y col., 2013, Bommareddy y col., 2015, Tchakouteu y col., 2017).

Resultado planificado 4:

Optimización de proceso de pretratamiento del bagazo para obtener la máxima conversión

El principal impedimento tecnológico para la utilización de la biomasa vegetal es, en general, la ausencia de una tecnología de bajo costo dirigida a la recalcitrancia de la lignocelulosa. Se han desarrollado diversos métodos que mejoran la hidrólisis de la lignocelulosa, como los pretratamientos fisicoquímicos y biológicos. La finalidad del pretratamiento es remover la lignina, hidrolizar la hemicelulosa a azúcares fermentables, y reducir la cristalinidad de la celulosa para liberar la glucosa. Se han desarrollado diversos métodos de pretratamiento que pueden ser físicos, químicos físico-químicos y biológicos. Los pretratamientos físicos incluyen la ruptura mecánica, molienda, microonda, ultrasonido, pirólisis y el campo eléctrico pulsado. Dentro de los métodos químicos se encuentran los tratamientos con ácidos diluidos, álcali suave, ozonólisis, con solventes orgánicos acuosos y con líquidos iónicos. Los pretratamientos biológico son llevados a cabo por microorganismos, como los hongos de la podredumbre pardos y blancos, que degradan la lignina y la hemicelulosa y en menor medida a la celulosa.

La etapa del pretratamiento presenta el mayor desafío técnico debido a la complejidad estructural de la fracción lignocelulósica y del fuerte obstáculo de los inhibidores y subproductos que pueden ser generados durante esta etapa. Sin embargo, a través de un control adecuado de la temperatura y el pH, la formación de productos inhibidores puede ser minimizado.

La hidrólisis ácida es uno de los métodos de pretratamiento más eficaces para despolimerizar la hemicelulosa en monómeros de azúcares y aumentar la accesibilidad de las enzimas celulasas para degradar la celulosa (36). Se han desarrollado dos tipos de pretratamientos con ácido los de alta temperatura (por encima de 180 ° C) y corta duración (1-5 minutos) y baja temperatura (<120 ° C) y larga duración (30-90 min). En algunos casos, el paso de hidrólisis enzimática es eliminado ya que el

ácido hidroliza la biomasa en azúcares fermentables. Se han utilizado diferentes ácidos para el pretratamiento de una gran variedad de biomasa.

El ácido más utilizado comercialmente es el ácido sulfúrico diluido (H_2SO_4), que ha sido empleado para tratar residuos de maíz (37), abeto (38), álamo (8) y el bagazo de caña de azúcar (39), entre otros.

Este método permite la alta recuperación de los azúcares hemicelulósicos, con un menor consumo de ácido y una menor emisión de contaminantes al medio ambiente (40 - 42). Sin embargo esta etapa puede ser la más costosa por su consumo energético y en catalizadores y es la que está sujeta a una mayor investigación (16, 36, 42 - 45)

El uso de ácidos concentrados resulta menos atractivo para la obtención de azúcares, debido a la formación de compuestos inhibidores de los microorganismos utilizados en los procesos de fermentación. Además, ocurren problemas de corrosión en los equipos, difícil recuperación del ácido y alto costo de mantenimiento operacional, lo que hace que el método sea de poco interés a escala comercial (36).

Con la hidrólisis ácida diluida se consume menos cantidad de ácido comparado con la hidrólisis con ácido concentrado. Se solubiliza la hemicelulosa, facilitando la conversión del sustrato en azúcares fermentables. Sin embargo, dependiendo de la temperatura del proceso, se pueden generar algunos compuestos de degradación de los azúcares, furfural e hidroximetilfurfural, y de la lignina, los cuales afectan el metabolismo de los microorganismos utilizados en la etapa de fermentación (36). Para evitar la degradación de los azúcares a altas temperaturas, así como la formación de inhibidores, la hidrólisis se puede llevar a cabo en dos etapas. Una primera etapa para convertir la hemicelulosa en sus monómeros constituyentes, a temperaturas relativamente bajas ($100-160^{\circ}C$). Una segunda etapa en la cual se hidroliza el sólido restante, transformando a la celulosa en glucosa, bajo condiciones más severas, a temperaturas más elevadas, entre $200-240^{\circ}C$ (43, 46 - 48).

Estudios previos reportan que en la primera etapa se obtiene un rendimiento de azúcares, pentosas y hexosas de la hemicelulosa, entre 80 y 95% de los azúcares disponibles, mientras que en la segunda etapa el rendimiento de la hidrólisis de la celulosa es bajo, entre 40 y 60% (49 - 52). Estos bajos rendimientos no son un problema ya que hay que considerar la alta disposición, el bajo costo de los materiales lignocelulósicos (desechos) y la posibilidad de utilizar estos materiales residuales en la producción de energía. Sin embargo, las condiciones de la hidrólisis en cada etapa deben ser estudiadas dependiendo del material a utilizar, ya que la complejidad estructural y composición depende del tipo de residuo o desechos que se esté utilizando.

El objetivo de este estudio fue optimizar las condiciones del proceso de pretratamiento del bagazo de caña mediante hidrólisis ácida en cuanto a qué ácido a utilizar (sulfúrico o fosfórico), su concentración y la temperatura de operación, con vistas a obtener el mayor rendimiento de azúcares fermentables y la menor formación de subproductos que puedan inhibir el crecimiento de los microorganismos empleados en la fermentación de levaduras para la producción de etanol y aceites microbianos.

El bagazo de caña de azúcar se caracterizó determinando el contenido de humedad y de cenizas siguiendo el procedimiento descrito en PNO-B-En-08 Determinación de Cenizas. Se determinó también el contenido de celulosa mediante el método Cross y Bevan por modificación del reactivo usado en el método Tappi, siguiendo el procedimiento descrito en PNO-B-En-07. El contenido de azúcares reductores de las muestras de hidrolizado provenientes de las dos etapas se determinó mediante la técnica de Eynon-Lane según el PNO-B-Ge-01 del ICIDCA. De forma general el esquema de tratamiento se representa en la Figura 14.

Para la cuantificación de los ácidos orgánicos se empleó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución (Knauer, Berlín, Alemania),

integrado por una bomba K 1001, un desgasificador de 4 canales, un organizador del solvente K 1500 y un detector de arreglo de diodos K 2800. Se empleó un inyector Rheodyne con un lazo de 20 μ l.

Las muestras se inyectaron de manera directa y se filtraron por filtros de jeringuilla de 0,45 μ m y se analizaron por duplicado. Para el análisis se utilizó una columna Hypersil ODS (250 x 4,0 mm di., 5 μ m; Supelco, EE.UU) y como fase móvil agua acidulada a pH 2,5 con ácido fosfórico al 85% a un flujo de 0,5 mL/min. El volumen de inyección fue de 20 μ L y la detección UV se realizó a 210 nm. El tiempo total del análisis fue de 60 min. Para la adquisición y el procesamiento de los datos cromatográficos se utilizó el programa Clarity versión 4.0.1.700 (DataApex).

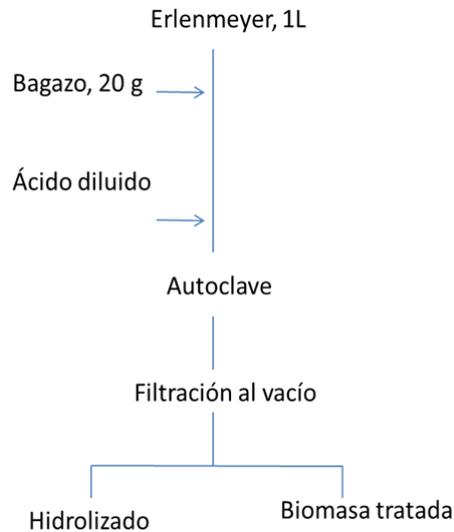


Figura 14: Esquema de tratamiento del bagazo mediante hidrólisis ácida diluida

El bagazo utilizado tuvo las siguientes características:

Humedad: 13,15 %
Celulosa: 59,63%
Brix: 1,2
Pol : 0,1
Cenizas: 6,38 %

Análisis del efecto de la concentración de ácido sulfúrico y de la temperatura

Los resultados obtenidos del diseño experimental empleado para la evaluación de la concentración de ácido sulfúrico y de la temperatura en la producción de ART y ácido acético en la etapa I aparecen en la Tabla 10.

El valor más alto obtenido de ART se obtuvo empleando 5 % del ácido y 140 °C (37,6 g/L). Mediante el análisis estadístico de los resultados obtenidos se obtuvo que tanto la temperatura como la concentración del ácido sulfúrico son significativos en la formación de azúcares. La producción de ART aumenta con el incremento de la temperatura considerablemente, sin embargo el efecto de la concentración del ácido sulfúrico es inapreciable en el rango evaluado, por lo que es más acertado trabajar a 140 °C y 1 % de ácido sulfúrico, considerando los costos del proceso y la corrosión del equipamiento en largos periodos de tiempo.

Tabla 10: Concentración de azúcares reductores y ácido acético obtenidas en las variantes de tratamiento evaluadas para cada uno de los ácidos.

ETAPA 1

	Conc (%)	Temp (°C)	ART (g/L)	Ac. Acético (g/L)
H ₂ SO ₄	1	120	26,4	5,24 ± 0,54
	1	140	29,6	4,78 ± 0,12
	5	120	9,6	4,49 ± 1,1
	5	140	37,6	4,07 ± 0,22
H ₃ PO ₄	1	120	10,4	2,72 ± 0,15
	1	140	18,8	2,82 ± 0,2
	5	120	27,2	3,57 ± 1,0
	5	140	26,0	3,59 ± 0,7

A medida que aumentó la concentración de ácido sulfúrico y la temperatura es mayor la concentración de ácido acético, lo cual es indeseado. Sin, embargo, en todos los casos el valor de concentración de ácido acético es inferior a 5 g/L. En el caso de la propagación de la cepa *Rhodospiridium toruloides*, la cual es objeto de estudio en nuestro proyecto en particular, hemos determinado que el efecto del ácido acético no inhibe significativamente su crecimiento hasta valores superiores a 5 g/L, sin embargo su efecto sinérgico con los otros subproductos formados como el furfural, el hidroximetilfurfural y la vainillina sí pueden inhibir su crecimiento y formación de lípidos en más de un 25%.

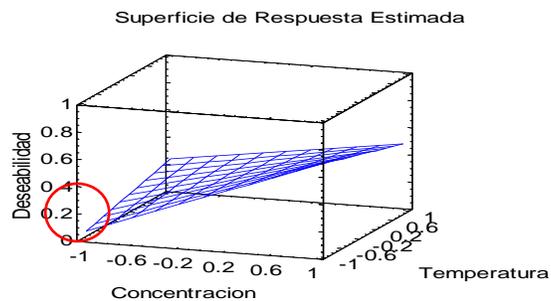


Figura 11: Superficie de respuesta estimada evaluando el efecto de la concentración de ácido sulfúrico y de la temperatura en la formación de ácido acético

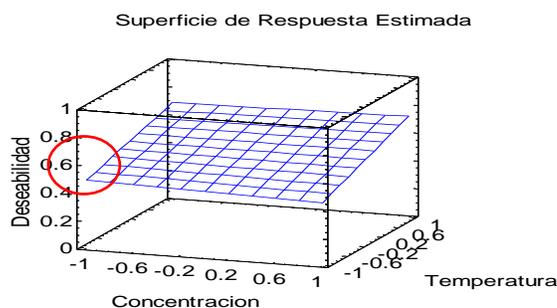


Figura 12: Superficie de respuesta estimada evaluando el efecto de la concentración de ácido sulfúrico y de la temperatura en la producción de ART.

Las figura 11 y 12 mostraron la superficie de respuesta estimada a partir de las ecuaciones obtenidas por el programa Statgraphic Centurium. La selección de la temperatura de operación dependerá del estudio de factibilidad económica del proceso de forma tal de considerar qué elemento es más costoso: incrementar la temperatura de trabajo a 140 °C incrementando tanto la formación de ART y la concentración de subproductos tóxicos o trabajar a 120 °C y bajar la producción tanto de ART como de inhibidores.

Las ecuaciones que describen la formación del ácido acético y los azúcares son:

$$\text{Ac. Acético (g/L)} = 4,52 - 0,113 * \text{Conc H}_2\text{SO}_4 - 0,311 \text{ Temp}$$

$$\text{ART (g/L)} = 25,73 - 2,05 * \text{Conc H}_2\text{SO}_4 + 7,85 * \text{Temp} + 6,2 * \text{ConcH}_2\text{SO}_4 * \text{Temp}$$

Análisis del efecto de la concentración de ácido fosfórico y la temperatura

Al utilizar el ácido fosfórico, la concentración del ácido resultó ser un parámetro significativo mientras que la temperatura no es significativa. Los valores más altos de ART se obtuvieron con una concentración de 5 %, sin embargo no se encontraron diferencias significativas para los resultados obtenidos a 120 y 140 °C a esta concentración, lo cual no sucedió a 1% o sea, a concentraciones de 1% sí se obtuvieron diferencias significativas de los ART (Tabla 1). A mayor concentración de fosfórico se produce mayor ácido acético al igual que al incrementar la temperatura. La temperatura no es un parámetro significativo a ninguna de las concentraciones evaluadas de fosfórico.

Las ecuaciones que describen la formación del ácido acético y los azúcares son:

$$\text{Ac. Acético (g/L)} = 3,132 + 0,417 * \text{Conc H}_2\text{SO}_4$$

$$\text{ART (g/L)} = 20,49 + 5,99 * \text{Conc H}_2\text{SO}_4 + 21,17 * \text{Temp} - 2,13 * \text{Conc H}_2\text{SO}_4 * \text{Temp}$$

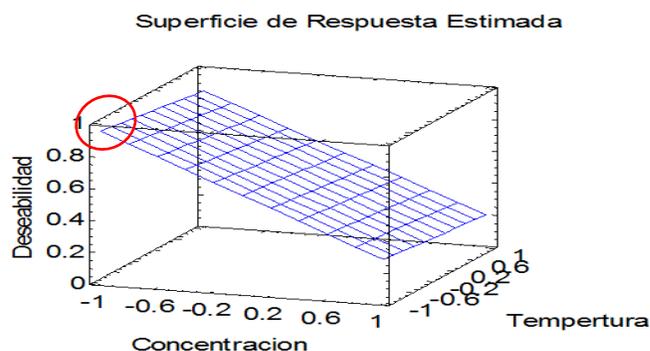


Figura 13: Superficie de respuesta estimada evaluando el efecto de la concentración de ácido fosfórico y de la temperatura en la formación de ácido acético

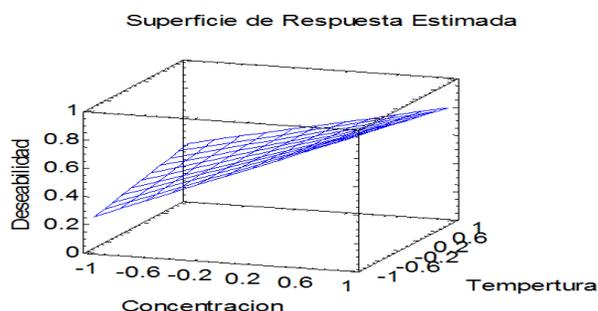


Figura 14: Superficie de respuesta estimada evaluando el efecto de la concentración de ácido fosfórico y de la temperatura en la formación de ART

Análisis de la Etapa II empleando ácido sulfúrico a 120 °C.

Los resultados obtenidos a partir de la hidrólisis acida diluida con H_2SO_4 1% del bagazo tratado en la Etapa I aparecen en la Tabla 11.

De acuerdo a los resultados obtenidos se obtuvo una mayor concentración de ART al utilizar el bagazo tratado en la primera etapa con la menor concentración de ambos ácidos, o sea al 1%. Las concentraciones obtenidas de ácido acético fueron superiores en estas condiciones (1%), pero ningún valor excedió los 3 g/L, por lo que no se consideran concentraciones inhibitorias del crecimiento, a estos valores el ácido acético generalmente es utilizado como sustrato en el metabolismo de las levaduras.

Tabla 11: Concentración de azúcares reductores y ácido acético obtenidas en las variantes de tratamiento evaluadas para cada uno de los ácidos.

ETAPA 2

	Conc (%)	Temp (°C)	ART (g/L)	Ac. Acético (g/L)
H ₂ SO ₄	1	120	12,4	1,56
	1	120	16,0	1,28
	5	120	3,82	0,964
	5	120	4,0	0,77
H ₃ PO ₄	1	120	18,8	2,46
	1	120	12,8	1,78
	5	120	9,6	1,49
	5	120	15,6	1,18

Al comparar los resultados obtenidos para ácido sulfúrico y fosfórico en este estudio preliminar se recomienda utilizar el ácido sulfúrico diluido al 1 % y 140 °C en la Etapa I, considerando aspectos económicos como menor volumen de ácido. En el caso de la Etapa II se recomienda utilizando 120 °C es posible emplear cualquiera de los dos ácidos al 1% en dependencia de su disponibilidad y precio en el mercado.

Los resultados de este informe forman parte de un estudio más extenso de optimización de las condiciones de operación de la etapa de pretratamiento del bagazo de caña para su empleo como sustrato en la fermentaciones de alcohol o de aceites, en el cual serán evaluados también el tiempo de tratamiento como factor muy importante en los resultados obtenidos en cada etapa. Este estudio es solo parcial, aún faltan por evaluar otros parámetros como el tiempo de tratamiento en la ETAPA I y el empleo del ácido sulfúrico al 5% en la ETAPA II al igual que el uso del ácido fosfórico a ambas concentraciones (1 y 5 %)

Resultado planificado 5:

Determinación del incremento del valor nutricional de las levaduras en las nuevas condiciones evaluadas

La suplementación de levaduras en la alimentación de los animales es una de las vías alternativas para alcanzar el mejoramiento del contenido nutricional de los mismos. Las levaduras constituyen una fuente de proteínas y aminoácidos y además aportan vitaminas del complejo B. En el caso de los humanos se hace necesaria la administración externa de estos compuestos mediante la adición directa de los ácidos grasos en cuestión o mediante el uso de alimentos enriquecidos con estos compuestos como pueden ser la carne, el huevo, entre otros.

La caracterización de la biomasa obtenida en los ensayos en fermentadores empleando medios compuestos por vinaza y glicerol en el sistema incrementado continuo mostró un contenido máximo promedio de lípidos en el intervalo entre 45 - 50%, una concentración de nitrógeno promedio resultó 29,5 % y una concentración de carotenos de 205 µg/g al final del cultivo.

En la Figura 13 se observa el perfil de la composición de metil-ésteres presentes en los aceites extraídos de la levadura de trabajo en medios compuestos por vinaza y glicerol puro e industrial. En ambos medios se obtuvo un porcentaje de metil-ésteres C16-C18 superior al 85 %, predominando los ácidos oleico (C18:1), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3).

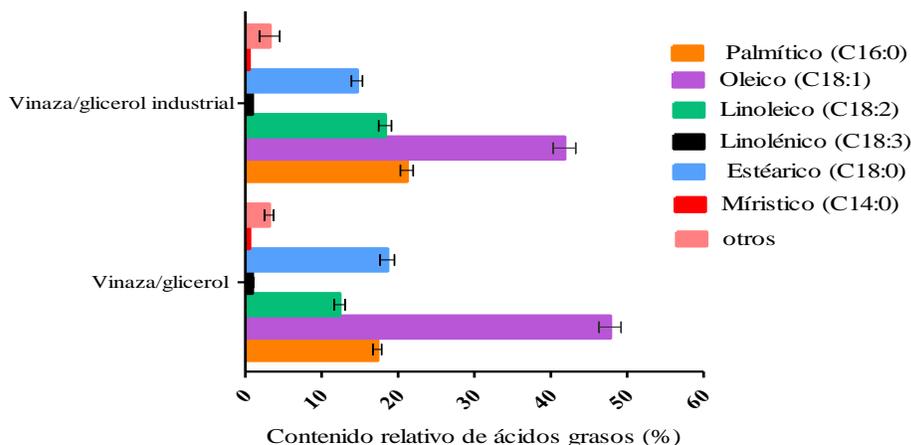


Figura 13: Composición de los metilésteres de los aceites extraídos de la cepa *R. toruloides* L/24-26-1 en las mezclas de vinaza diluida (factor 2) y glicerol purificado e industrial. Cada barra representa la media de cada grupo de tratamiento \pm D.E de tres muestras de un experimento de tres corridas realizadas ($p < 0.05$, Prueba de Turkey).

El empleo de glicerol industrial produjo un incremento de los ácidos palmítico y linoleico en 22,3 y 48,8 %, respectivamente y a su vez una reducción del ácido esteárico y del oleico en un 21,5 y 12,5 %, respectivamente. Estos resultados difieren de los obtenidos por Signori y colaboradores (2016) donde no se detectaron cambios significativos en la composición de los metil-ésteres cuando se cultivaron las cepas *R. toruloides* (DSM 4444), *C. curvatus* (DSM 70022) y *L. starkeyi* (DSM70295) utilizando glicerol y glicerol industrial como únicos sustratos.

De forma general, aunque el contenido de lípidos y el rendimiento pueden variar entre diversas proporciones de vinaza y glicerol purificado o industrial, se demostró que los perfiles de AG en las condiciones evaluadas suelen ser similares a los encontrados por otros autores en otras especies de levaduras oleaginosas (Díaz -Fernandez y col., 2017, Ching y col., 2018, Jiru y col., 2018, Diem y col., 2019).

Pudo concluirse que el empleo de mezclas de vinaza y glicerol industrial no modifica significativamente la calidad de los aceites microbianos por lo que pueden emplearse tanto en la industria alimentaria así como materia prima para la producción de biodiesel.

La producción de carotenos como suplemento alimenticio proviene fundamentalmente de fuentes químicas. En el mercado existen suplementos alimenticios variados con concentración similar a la de los vegetales como las zanahorias, los tomates y otros, así como algas. El precio de cada envase oscila entre 30 y 50 dólares.

Esta composición resulta atractiva desde el punto de vista nutricional para la producción de suplementos nutricionales que serían incorporados en la dieta de animales como aves de corral y camarones, puede estimarse en el orden de la harina de soya oscilando entre 400 - 500 dólares/ton.

Presentación de resultados en eventos y en revistas científicas

Los resultados obtenidos durante el proyecto fueron utilizados en la presentación de tema de tesis doctoral en la Universidad Tecnológica de la Habana de la aspirante MSc. Evelyn Faife Pérez.

Fue posible su divulgación mediante la presentación de ponencias en eventos internacionales como:

- ✓ DIVERSIFICACIÓN 2019: Producción de aceites microbianos en cultivos fed-batch a partir de vinazas y glicerol
- ✓ BIOAGRO 2022: Producción de *Rhodospiridium toruloides* a partir residuales de la agroindustria azucarera como alternativa para la producción de alimento animal y biodiesel por una agricultura sostenible
- ✓ DIVERSIFICACIÓN 2022: Valoración económica de la producción de biodiesel a partir de levaduras en vinazas y glicerol industrial
- ✓ 1^{er} Symposium CIDEM 2022: Evaluación de la producción de carotenos por vía biotecnológica a partir de derivados de la caña de azúcar

Se realizaron las siguientes publicaciones:

Producción de aceites microbianos en cultivos fed batch a partir de vinazas y glicerol. Congreso Internacional Diversificación 2019, ISBN: 978-959-7165-59-0

Producción de carotenoides a partir de *Rhodotorula*: una revisión, ICIDCA de los Derivados de la Caña de Azúcar, Vol. 55 No. 1 enero – abril, 2021

En estos momentos están en proceso dos publicaciones científicas en diferentes fases de preparación para entrega a revistas de impacto.

CONCLUSIONES

- Se seleccionó una levadura nativa oleaginosa aislada de mieles y fue identificada como *Rhodospiridium toruloides*.
- Se generaron 4 mutantes de la levadura *Rhodospiridium toruloides* de trabajo por método de mutagénesis dirigida capaces de crecer en medios compuestos por hidrolizado de bagazo
- La mayor producción de SCO, se obtuvo empleando un medio compuesto por vinaza y glicerol industrial en el intervalo 60 - 80 gL⁻¹ y una relación molar C/N = 250 empleando urea como fuente de nitrógeno.
- Los parámetros de operación para alcanzar la máxima acumulación de lípidos en cepa L/24-26-1 son: temperatura 25 °C, pH 6,0 y concentración de inóculo 15 %.
- La composición de ácidos grasos obtenidos de los SCO a partir de *Rhodospiridium toruloides* cepa L/24-26-1 en los medios compuestos por vinaza y glicerol industrial comprende el

intervalo de los aceites vegetales empleados en la industria alimentaria y en la producción de biodiesel.

- Se seleccionó una estrategia de fermentación para la producción de aceites microbianos basada en un sistema incrementado con flujo constante $0,01 \text{ Lh}^{-1}$ empleando como sustratos glicerol industrial 500 gL^{-1} y vinaza a partir del consumo del 95 % del glicerol presente en el medio inicial, la cual permite alcanzar niveles más altos de productividad de lípidos de $0,32 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$.

INFORME ADMINISTRATIVO CONTABLE

Resumen de la situación financiera.

El proyecto recibió un presupuesto de 27 000 USD, se han ejecutado hasta 20776,75 USD, siendo posible realizar las misiones concebidas el proyecto y realizar la mayor parte de las tareas experimentales previstas, ejecutándose solo un 76,91 % (20776,75 USD) del presupuesto debido fundamentalmente al atraso en la reconstrucción de insumos de cómputo planificados por su necesidad para el funcionamiento de los equipos de cromatografía del ICIDCA, producto fundamentalmente a la situación de la pandemia COVID-19 durante estos años.

Por tal motivo se realizó la solicitud de una extensión del proyecto de 3 meses. El presupuesto pendiente se empleará en la compra de estos insumos para concluir una tarea pendiente de la actividad 5 del proyecto y la actividad final de cierre del proyecto.

Tabla 1: Desglose del financiamiento por actividad

EJECUCIÓN POR AÑOS				
Actividad	2020	2021	2022	Cierre
1- Administración	-	3550,3	365,21	3915,51
2- Caracterización de muestras	4029,9	1351,22	1141,66	6522,78
3- Selección, identificación de cepas	1641,92	-	-	1641,92
4-Selección y evaluación del proceso de pretratam	-	-	-	-
5-Optimización de las condiciones de fermentación	-	-	8696,54	8696,54
Total	5671,82	4901,52	10203,41	20776,75

Tabla 2: Desglose del financiamiento por acápite

Descripción	2020	2021	2022	Total
Gastos de viaje	4029,9	-	9838,2	13868,1
Inversiones	1641,92	4901,52	-	6543,44

Gestión y capacitación	-	-	365,21	365,21
Total	5671,82	4901,52	10203,41	20776,75

Firma Directora proyecto:

Nombre: Evelyn Faife Pérez

REFERENCIAS FUNDAMENTALES

- AGEITOS J., VALLEJO JA., VEIGA-CRESPO P., TG., V. 2011. Oily yeasts as oleaginous cell factories. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 90: 1219-27.
- BESSADOK B., SANTULLI A., BRÜCK T., SADOK, S. 2019. Species disparity response to mutagenesis of marine yeasts for the potential production of biodiesel. **Biotechnology for Biofuels.**, 12.
- BROWN D. E., M. H.M., L-C., J., T. A. 1990. Effect of temperature and pH on lipid accumulation by *Trichoderma reesei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 34: 335-339.
- FREITAS C., PARREIRA T. M., JOSÉ ROSEIRO J, REISA., LOPEST. 2014. Selecting low-cost carbon sources for carotenoid and lipid production by the pink yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 using flow cytometry. **Bioresour. Technol.** 158:355-9. doi: 10.1016/j.biortech.2014.02.071.
- CHATZIFRAGKOU A., MAKRI A., BELKA A., BELLOU S., MAVROU M., M. M. 2011. Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. **Energy**, 36: 1097-1108.
- DA ROSA PD., MATTANNA P., CARBONI D., AMORIM L., RICHARDS N. 2014. *Candida zeylanoides* as a new yeast model for lipid metabolism studies: effect of nitrogen sources on fatty acid accumulation. **Folia Microbiol.**, 59: 477–484.
- da Silva, T.L., Gouveia, L., Reis, A. 2014. Integrated microbial processes for biofuels and high value-added products: the way to improve the cost effectiveness of biofuel production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 98(3), 1043-53.
- DIAS C., SILVA C., FREITAS C., REIS A., TL.D.S. 2016. Effect of Medium pH on *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 Carotenoid and Lipid Production Evaluated by Flow Cytometry. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 179: 776-87.
- DIAS C., REIS A., SANTOS JAL. DA SILVA L T. 2020. Concomitant wastewater treatment with lipid and carotenoid production by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* grown on brewery effluent enriched with sugarcane molasses and urea. **Process Biochemistry**, 94: 1-14.
- EASTERLING E., FRENCH WT., HERNANDEZ R., LICHA M. 2009. The effect of glycerol as a sole and secondary substrate on the growth and fatty acid composition of *Rhodotorula glutinis*. **Bioresour Technol.**, 100: 356-61.
- ECONOMOU CN., AGGELIS G., PAVLOU S., VAYENAS D. 2011. Modeling of single cell oil production under nitrogen limited and substrate inhibition conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, 108: 1049-1055.
- EL-FADALY H. A., EL-NAGGAR N. E. A., MARWAN E. S. M. 2009. Single cell oil production by an oleaginous yeast strain in a low cost cultivation medium. **Research Journal of Microbiology**, 4: 301-313.

EL BIALY H., GOMAA O. M., AZAB, K. S. 2011. Conversion of oil waste to valuable fatty acids using oleaginous yeast. **World J. Microb. Biotechnol**, 27: 2791-2798.

ENSHAEIEH M., ABDOLI A., NAHVI I., MADANI M. 2012. Selection and optimization of single cell oil production from *Rhodotorula* 110 using environmental waste as substrate **J. Cell Mol. Res.**, 4 (2): 68-75.

ENSHAEIEH M., ABDOLI A., 2013. Medium optimization for biotechnological production of single cell oil using *Yarrowia lipolytica* M7 and *Candida sp.* **J. Cell Mol. Res.**, 5.

ENSHAEIEH, M., ABDOLI A., M. M. 2015. Single cell oil (SCO) production by *Rhodotorula mucilaginosa* and its environmental benefits. **J. Agr. Sci. Tech.**, 17.

EVANS C., RATLEDGE, C. 1983. Biochemical activities during lipid accumulation in *Candida curvata*. **Lipids**, 18: 630-5.

EVANS C., RATLEDGE C. 1985. A rapid screening method for lipid accumulating yeast using a replica-printing technique. **J. Microbiol. Methods**, 4: 203-10.

EVANS C., RATLEDGE C. 1984. Influence of nitrogen metabolism on lipid accumulation by *Rhodospiridium toruloides* CBS 14. **J. Gen. Microbiol.**, 130: 1705-1710.

FEI Q., CHANG HN., SHANG L., J-D-R, C. 2011. Exploring low-cost carbon sources for microbial lipids production by fed-batch cultivation of *Cryptococcus albidus*. **Biotechnol Bioprocess Eng.**, 16: 482-487.

FEI Q., O'BRIEN M., NELSON R., CHEN X., LOWELL A., N. D. 2016. Enhanced lipid production by *Rhodospiridium toruloides* using different fedbatch feeding strategies with lignocellulosic hydrolysate as the sole carbon source. **Biotechnol. Biofuels**, 9: 130.

FORTUNATE L., AGABA A., AKATUKUNDA A., GAZET R., BARASA J., NANYONGA S., WENDIRO D., WACOO A. P. 2018. Utilization of Solid Waste as a Substrate for Production of Oil from Oleaginous Microorganisms. **Journal of Lipids**, 6.

GALAFASSI S., CUCCHETTI D PIZZA F., FRANZOSI G, BIANCHI D., C. C. 2012. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. **Bioresour Technol.**, 111: 398-403.

GAO Q., BINNS D. D., KINCH L. N., GRISHIN N. V., ORTIZ N., CHEN X., GOODMAN J. M. 2017. **J. Cell Biol.**, 216: 3199-3217.

GARAY L., BOUNDY-MILLS K., J. G. 2014. Accumulation of high value lipids in single cell microorganisms: a mechanistic approach and future perspectives. **J. Agric. Food Chem.**, 62: 2709-27.

GARAY L., SITEPU I.R., CAJKA T. 2016. Eighteen new oleaginous yeast species. **J Ind Microbiol Biotechnol.**, 43: 887-900.

HU C., ZHAO X., ZHAO J., WUA S., ZHAO Z. K. 2009. Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. **Bioresource Technology**, 100: 4843-4847.

HUANG C., WU H. , LIU Z., CAI J., LOU W., M.Z. 2012a. Effect of organic acids on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Trichosporon fermentans*. **Biotechnology for Biofuels**, 5.

HUANG, C., WU H, LI R-F, M-H Z. 2012b. Improving lipid production from bagasse hydrolysate with *Trichosporon fermentans* by response surface methodology. **N Biotechnol.**, 29: 372-8.

HUANG C., CHEN X. F., XIONG L., CHEN X. D., MA. L. L., CHEN Y. 2013. Single cell oil production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization. **Biotechnol. Adv.**, 31: 129-

JIRU T. M., GROENEWALD M., POHL C., STEYN L., KIGGUNDU N., ABATE D. 2017. Optimization of cultivation conditions for biotechnological production of lipid by *Rhodotorula kratochvilovae* (syn. *Rhodospiridium kratochvilovae*) SY89 for biodiesel preparation. **Biotech.**, 7.

KESSEL R. H. J. 1968. Fatty acids of *Rhodotorula gracilis*: fat production in submerged culture and the particular effect of pH value. **Appl. Bacteriol.**, 31.

KIM M., LEE B., KIM H., NAM K., MYOUNGHOON MOON, HEE-MOCK OH y YONG KEUN CHANG 2019. Increased biomass and lipid production of *Ettlia* sp. YC001 by optimized C and N sources in heterotrophic culture. **Scientific Reports**, 9: 6830.

KIELISZEK M., DOUROU M. 2020. Effect of Selenium on the Growth and Lipid Accumulation of *Yarrowia lipolytica* Yeast. **Biological Trace Element Research**, <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02266-w>.

KUMAR L.R., YELLAPU S.K., YAN S.,TYAGI RD., DROGUI P. 2021. Elucidating the effect of impurities present in different crude glycerol sources on lipid and citric acid production by *Yarrowia lipolytica* SKY7 . **Chemistry Technology and Biotechnology** 96 (1): 227-240.

KUNTZLER S. G., UEBEL L. D. S., SPIER F., VEIGA B. C. A. 2013. Determinação do teor de lipídios da biomassa de leveduras cultivadas em meio contendo glicerol bruto. **Congresso de Iniciação Científica**.

LAMERS D., VAN BIEZEN N., MARTENS D., PETERS L., VAN DE ZILVER E. 2016. Selection of oleaginous yeasts for fatty acid production. **BMC Biotechnology**, 16: 45.

LI M., LIU G-L., CHI Z., CHI Z-M. 2010. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. **Biomass Bioenergy**, 34: 101-107.

LI Q., DU W., LIU D. 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. **Appl Microbiol Biotechnol.**, 80: 740-756.

LING J., NIP S., SHIM H. 2013. Enhancement of lipid productivity of *Rhodospiridium toruloides* in distillery wastewater by increasing cell density. **Bioresource Technology**, 146: 301–309.

LING J., TIAN Y., ALVES DE TOLEDO R., SHIM H. 2016. Cost reduction for the lipid production from distillery and domestic mixed wastewater by *Rhodospiridium toruloides* via the reutilization of spent seed culture medium. **Energy**, 1-7.

LIU X. 2020. Microbial technology for the sustainable development of energy and environment. **Biotechnology Reports**, 27.

MARTÍNEZ E. J., VIJAYA R., GONZÁLEZ F., GÓMEZ X. 2015. New Biofuel Alternatives: Integrating Waste Management and Single Cell Oil Production. **Int. J. Mol. Sci.**, 16 (5), 9385-9405.

MASRI M A., GARBE D., MEHLMER N., BRÜCK T B. 2019. A sustainable, high-performance process for the economic production of waste-free microbial oils that can replace plant-based equivalents. **Energy Environ. Sci.**, 12.

MAZA D., VIÑARTA S., YING S., GUILLAMÓN J M., AYBARAD M J. 2020. Growth and lipid production of *Rhodotorula glutinis* R4, in comparison to other oleaginous yeasts. 2020. **Journal of Biotechnology**, 310:21-31.

MEESTERS P., HUIJBERTS GNM., EGGINK G. 1996. High-cell-density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 45: 575-9.

NIGAM J. 2001. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **J. Biotechnol.**, 87: 17-27.

OCHSENREITHER K., GLÜCK C., STRESSLER T., FISCHER L., SYLDATK C. 2016. Production Strategies and Applications of Microbial Single Cell Oils. **Frontiers in Microbiology**, 7: 1539.

OH B. R., SUNG M. L., SUN Y. H., SEO J. W., KIM C. H. 2018. Efficient production of 1,3 propanediol from crude glycerol by repeated fed batch fermentation strategy of a lactate and 2,3 butanediol deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*. **Microb. Cell Fact.**, 17:92.

OLKIEWICZ M., FORTUNY A., STÜBER F., FABREGAT A., FONT J., BENGGOA, C. 2012. Evaluation of different sludges from WWTP as a potential source for biodiesel production. **Procedia Eng.**, 42: 634-643.

OTERO M. A., SAURA G., VALDIVIELSO M. J. A., ALMAZÁN O. A. 2007. Fodder yeast production: A new approach for distillery vinasse treatment. **Paper presented at the XXVIth Congress of the International Society of Sugar Cane Technologists, South Africa.**

PAPANIKOLAOU S., GALIOTOU-PANAYOTOU M., FAKAS S., KOMAITIS M., AGGELIS G. 2007. Lipid production by oleaginous Mucorales cultivated on renewable carbon sources. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, 109: 1060-1070.

PAPANIKOLAOU S., AGGELIS G. 2011. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. **Eur. J Lipid Sci. Technol.**, 113: 1031-1051.

PEREIRA RENATA N., DA SILVEIRA JULIANE M., DE M. BURKERT JANAÍNA F., DA C. ORES JOANA BURKERT CARLOS A. V. 2019. Simultaneous lipid and carotenoid production by stepwise fed-batch cultivation of *Rhodotorula mucilaginosa* with crude glycerol Brazilian Journal of Chemical Engineering 36, 03: 1099 - 1108.

QI F., SHEN P., HU R., XUE T., JIANG X., QIN L. 2020. Carotenoids and lipid production from *Rhodospiridium toruloides* cultured in tea waste hydrolysate. **Biotechnol. Biofuels**, 13:74.

RADULOVIC, M., KNITTELFELDER O., CRISTOBAL-SARRAMIAN A., KOLB D.,WOLINSKI H. 2013. The emergence of lipid droplets in yeast: current status and experimental approaches. **Curr. Genet.**, 59: 231-42.

RAYMONDI S., ROSSI M., LEONARDI A., BIANCHI M. M., RINALDI T.AMARETTI A. 2014. Getting lipids from glycerol: new perspectives on biotechnological exploitation of *Candida freyschussii*. **Microbial Cell Factories**, 13-83.

REIS C E. R., VALLE G. F., BENTO H.B.S., CARVALHO A. K.F. DE CASTRO H.F. 2020. Sugarcane by-products within the biodiesel production chain: Vinasse and molasses as feedstock for oleaginous fungi and conversion to ethyl esters **Fuel**, 277.118064.

SHEN H., GONG Z.,YANG X., JIN G., BAI F ., ZHAO ZK. 2013. Kinetics of continuous cultivation of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. **J. Biotechnol.**, 168(1): 85-9.

SEO Y., LEE I., HAN J. 2013. Cultivation and lipid production of yeast *Cryptococcus curvatus*. **Bioresource Technology.**, 135: 304-305.

SERGEeva Y., GALANINA L. A., ANDRIANOVA D. A., FEOFILOVA E. P. 2008. Lipids of filamentous fungi as a material for producing biodiesel fuel. **Applied Biochemistry and Microbiology.**, 44: 523-527.

SEVERO J., NERES M., SIQUEIRA E., PASA V., ROSA C.A., VALENTE P.. 2014 Microbial lipid produced by *Tarrowia lipolytica* QU21 using industrial waste: A potential feedstock for biodiesel production. **Bioresource Technology** 161, 320 - 326

SIGNORI L., DILETTA A., POSTERI R., GIUZZI A., MEREGHETTI P., PORRO D., BRANDUARDI P. 2016. Assessing an effective feeding strategy to optimize crude glycerol utilization as sustainable carbon source for lipid accumulation in oleaginous yeasts. **Microb. Cell Fact.**, 15:75.

SILVA G. S., MARQUES E. L. S., DIAS J. C. T., LOBO I. P., GROSS E. 2012. Biodegradability of soy biodiesel in microcosm experiments using soil from the Atlantic rain forest. **Appl. Soil Ecol.**, 55: 27-3.

SUBRAMANIAM R., DUFRECHE S, ZAPPI M., R. B. 2010. Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol. Bioeng.**, 37: 1271-87.

SUNDSTROM E., YAEGASHI J., YAN J., MASSON F., PAPA G. 2018. Demonstrating a separation-free process coupling ionic liquid pretreatment, saccharification, and fermentation with *Rhodospiridium toruloides* to produce advanced biofuels. **Green Chemistry.**, 20: 2870-2879.

TACCARI M., CANONICO L., COMITINI F., MANNAZZU I., CIANI M. 2012. Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. **Bioresource Technology.**, 110: 488-495.

TAKAKU H, MATSUZAWA T, KATSURO Y, YAMAZAKI H.2020. Lipid metabolism of the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. **Applied Microbiology and Biotechnology.**, 104: 6141-6148.

TOMÁS P E., MORALES-PALOMO S., GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ C. 2021. Microbial lipids from organic wastes: Outlook and challenges. **Bioresource Technology**, 323, 124612.

TORRES A., DIAZ M., SAURA G. 2016. Factibilidad económica de alternativas de inversión para reducir el costo de producción de la levadura torula. **Centro Azúcar** 43,1, 10:16.

TRIMBUR D., IM C-S., DILLON HF., DAY AG., FRANKLIN S., A. C. 2012. Lipid Pathway modification in oil-bearing microorganisms. **US Patent** 20, 120, 288, 930.

TSAI Y.-Y., OHASHI T., KANAZAWA T., POLBUREE P., MISAKI R., LIMTONG S. 2016. Development of a sufficient and effective procedure for transformation of an oleaginous yeast, *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK16. **Curr. Genet.** 63 359-371. 10.1007/s00294-016-0629-8

WANG X., REN H. 2013. Microbial oil production by *Rhodotorula glutinis* CICC 31643 using sugar cane molasses. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, 6.

WATANABE T., IEFUJI H., KITAMOTO H. 2013. Treatment of, and *Candida utilis* biomass production from *shochu* wastewater; the effects of maintaining a low pH on DOC removal and feeding cultivation on biomass production. **SpringerPlus** 2:514 doi:10.1186/2193-1801-2-514

WEN Z., ZHANG S., KENNETH CH., JIN M., ZHAO Z.2020. *Rhodospiridium toruloides* - A potential red yeast chassis for lipids and beyond. **FEMS Yeast Research** 20, 5.

WHITE, T. J. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: PCR Protocols, a **Guide to Methods and Applications**: 315-322.

WU S., ZHAO X, SHEN H.,WANG Q., ZK. Z. 2011. Microbial lipid production by *Rhodospiridium toruloides* under sulfate-limited conditions **Bioresour. Technol.**, 102: 1803-1807.

WYNN J.P., HAMID A.A., C. R. 1999. The role of malic enzyme in the regulation of lipid accumulation in filamentous fungi. **Microbiology.**, 145: 1911-1917.

XAVIER M., ANA C., DECKMANN C., FRANCO T. T. 2017. Lipid production from hemicellulose hydrolysate and acetic acid by *Lipomyces starkeyi* and the ability of yeast to metabolize inhibitors. **Biochemical Engineering Journal.**, 118: 11-19.

XU J., DU W., ZHAO, X., ZHANG, G., LIU D. 2013. Microbial oil production from various carbon sources and its use for biodiesel preparation. **Biofuels Bioprod. Biorefin.**, 7: 65-77.

YU X., ZHENG Y., DORGAN K., S., C. 2011. Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. **Bioresour. Technol.**, 102: 6134-40.

YU X., ZENG J., ZHENG Y., CHEN S. 2014 Effect of lignocellulose degradation products on microbial biomass and lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. **Process Biochemistry**, 49: 457–465

ZHANG X., CHEN J., WU D., LI J., DAYALTYAGI R., SURAMPALLI. 2019. Economical lipid production from *Trichosporon oleaginosus* via dissolved oxygen adjustment and crude glycerol addition. *Bioresource Technology* 273, 288-296.

ZHANG F. X., ZHU X. L., LI Y. 2011. Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus 575 curvatus* O3 grown in fed-batch culture. **Biomass Bioenerg.**, 35: 1906-1911.

ZHANG S., SKERKER J.M., RUTTER C.D., MAURER M.J., ARKIN. A., RAO C. 2016. Engineering *Rhodospiridium toruloides* for increased lipid production. **Biotechnol. Bioeng.**, 113: 1056-1066.

ZHAO X., KONG X., HUA Y., FENG N., Z. Z. 2008. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, 110: 405-12.

ZHAO X., PENG F., DU W., LIU C., LIU D. 2012. Effects of some inhibitors on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and preparation of biodiesel by enzymatic transesterification of the lipid. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, 35: 993-1004.

ZHENG S.,ZHANG Y., ZHANG Y., TONG T., SUN J. 2010. Dominance of yeast in activated sludge under acidic pH and high organic loading. **Biochemical Engineering Journal**, 52: 282-288.

ZHOU W., WANG W., LI Y., ZHANG Y. 2013. Lipid production by *Rhodospiridium toruloides* Y2 in bioethanol wastewater and evaluation of biomass energetic yield. **Bioresour Technol.**, 127: 435-40.

ZHU L., ZONG M.H., Wu H. 2008. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. **Bioresour. Technol.**, 99: 7881-7885.

ZHU Z., ZHANG S., LIU H., SHEN H., LIN X., YANG F., ZHOU Y., JIN G., ZOU H., ZHAO Z. 2012. A multi-omic map of the lipid-producing yeast *Rhodospiridium toruloides*. **Nature Communications**, 3: 11-12.