

Selección de Levaduras Resistentes al Estrés del Proceso Fermentativo y Caracterización de la Fisiología de su Crecimiento

Resumen: El objetivo de este estudio fue aislar del lactosuero cepas de *Kluyveromyces marxianus* tolerantes a factores de estrés del proceso de fermentación para la obtención de etanol y obtener biomasa para la producción del mismo. Se analizaron 11 muestras de lactosuero, las cuales fueron enriquecidas con cloranfenicol para inhibir el crecimiento bacteriano, luego se llevaron a cabo diluciones en buffer fosfato salino que fueron sembradas en placas con medio conteniendo lactosa como única fuente de carbono y rojo de fenol como indicador de los microorganismos que la utilizan. Se seleccionaron las levaduras fermentadoras de lactosa. La identificación a nivel de especie se realizó por técnicas moleculares amplificando la región ITS1 (5,8S) ITS2. Se realizaron ensayos de tolerancia a altas temperaturas, bajo pH y altas concentraciones de etanol. La producción de biomasa se realizó en biorreactor. Se obtuvieron 16 aislados del lactosuero. Se identificaron 3 cepas de *K. marxianus* tolerantes a los factores de estrés. La cepa *K. marxianus* L31 fue seleccionada para la obtención de biomasa. En futuros estudios se debería determinar la producción de etanol por la cepa seleccionada usando como fuente de carbono el lactosuero.

Palabras Claves: Bioetanol; *Kluyveromyces marxianus*; Lactosuero; Levaduras.

Abstract: The objective of this study was to isolate of whey *Kluyveromyces marxianus* strains tolerant to stress factors of the fermentation process for ethanol production and obtain biomass for production thereof. Eleven samples of whey, which were supplemented with chloramphenicol to inhibit bacterial growth were analyzed, then dilutions were performed in phosphate buffered saline which were plated on media containing lactose as sole carbon source and phenol red as indicator microorganisms that use it. The lactose positive yeasts were selected. Identification to species was conducted using molecular techniques amplifying the ITS1 (5.8S) ITS2 region. Tolerance tests at high temperatures, low pH and high ethanol concentrations were done. Biomass production was performed in a bioreactor. Sixteen isolates were obtained of whey. Three strains of *K. marxianus* tolerant to stress factors were identified. The *K. marxianus* L31 strain was selected for the production of biomass. Future studies should be conducted to determine ethanol production using the selected strain.

Keywords: : Bioethanol; *Kluyveromyces marxianus*; Whey; Yeast.

Carla A. Aminahuel¹, Carina M. Pereyra^{1,2}, Ladislao Díaz Vergara¹, Analía S. Foschesato³, Mariana Montenegro^{1,2}, Lilia Cavaglieri^{2,3}

¹Centro de Investigaciones y Transferencia de Villa María (CIT VM-CONICET). Universidad Nacional de Villa María. Campus Universitario, Av. Arturo Jauretche 1555, Villa María, Córdoba, Argentina. - ²Miembros del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Argentina. - ³Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta Nacional 36 KM 601, Río Cuarto, Córdoba, Argentina. - Mail: carinapereyra06@gmail.com

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La producción de leche, su transformación y distribución conforman uno de los complejos agroalimentarios más importantes y dinámicos del país, siendo además estratégico y, en gran medida, responsable del desarrollo económico y social de numerosas economías zonales y regionales. La provincia de Córdoba ocupa un lugar importante del cinturón lechero Argentino participando con un 37% de la producción nacional. Cuenta con tres cuencas principales, entre ellas la Cuenca Villa María que aporta el 43% de la producción tambera provincial (<http://inta.gob.ar/proyectos/CORDO-620061>).

El principal subproducto de la industria láctea es el lactosuero. Se estima que en Argentina se producen anualmente 450 mil toneladas de suero líquido, de los cuales, aproximadamente el 33% se destina a la obtención de lactosa y derivados proteicos y el 4-5% es transformado en suero en polvo. El 60% restante, se desecha como efluente o es aprovechado, con bajo nivel tecnológico, en la alimentación de cerdos y bovinos. Su descarte genera importantes problemas de contaminación ambiental, ya que presenta un índice de demanda biológica de oxígeno muy elevado (<http://inta.gob.ar/noticias/la-web-del-ecosuero>).

La producción de etanol por fermentación del lactosuero es una alternativa de gran interés para la reutilización de este subproducto agroindustrial y ha recibido una gran atención, desarrollándose distintos procedimientos a gran escala. Varios destilerías que producen etanol a partir de lactosuero se encuentran hoy en operación comercial en Irlanda, EE.UU. y, en particular, Nueva Zelanda, donde el 50% del lactosuero proveniente de la producción de queso se utiliza para producir bioetanol (Mawson, 1994). La utilización de etanol como combustible alternativo representa actualmente la opción más prometedora a corto plazo

para disminuir el consumo de combustibles fósiles y la dependencia energética del petróleo. El bioetanol no podrá sustituirlos, pero sí complementarlos en forma de mezclas con el fin de reducir la dependencia respecto del petróleo.

En la actualidad en Argentina la producción de bioetanol ha aumentado debido al dictamen en 2008 de la Ley N° 26.334, que aprobó el Régimen de Promoción de la Producción de Bioetanol. Si bien por el momento la producción es suficiente para abastecer la demanda local, se espera un crecimiento a fin de abastecer al mercado externo (Martinez, 2013).

Las levaduras son los principales microorganismos capaces de realizar la fermentación alcohólica, es decir, la transformación del azúcar en etanol y dióxido de carbono, sin la participación de oxígeno libre. La selección de los microorganismos para producir etanol debe tener en cuenta características específicas de los microorganismos tecnológicos utilizados para la fermentación alcohólica, que tienen que cumplir con los requisitos del proceso de fermentación específicos además de cumplir con los requisitos de la producción de etanol. Estos requerimientos son: alto rendimiento de etanol relacionado con la unidad de sustrato, gran capacidad de fermentación, tolerancia a altas concentraciones de etanol, tolerancia para bajos valores de pH, mínimos requerimientos de oxígeno, alta estabilidad bajo diferentes condiciones de fermentación, la utilización de una amplia gama de sustratos fermentables, entre otros (Mousdale, 2008).

Para lograr una adecuada fermentación es de gran importancia obtener cepas con características fisiológicas adecuadas que permitan una buena utilización de la lactosa a partir de suero y seleccionar condiciones que optimicen el crecimiento de dichas cepas para la producción de bioetanol. El ambiente

que se encuentra en las destilerías es muy distinto de las condiciones controladas de laboratorio. Las altas concentraciones de azúcar pueden promover el estrés osmótico, además de producir altas concentraciones de etanol (8-11% - v/v), que también desencadenan respuestas de estrés en la levadura (Gomar-Alba y col., 2012). Existen grandes variaciones de temperatura, debido a la naturaleza exotérmica del metabolismo celular asociada con depósitos de muy alto volumen y sistemas de refrigeración cerrados ineficientes. A pesar de que no es una condición que se encuentra en el propio recipiente de fermentación, el pH bajo actúa como un factor de estrés durante la etapa de reciclado de células, cuando se añade ácido sulfúrico a la suspensión de células después de la centrifugación y los valores de pH puede bajar a 1,8 (Basso y col., 2011). Esta operación reduce la contaminación bacteriana, pero también afecta a la viabilidad celular de la levadura. El ácido acético es uno de los inhibidores más prominentes, ya que está generalmente presente en proporciones más altas, en comparación con otros inhibidores, y afecta negativamente el rendimiento de la levadura (Almeida y col., 2007). Los factores de estrés mencionados ejercen una presión selectiva continua en la levadura a través de los ciclos de fermentación, permitiendo que sólo las cepas más resistentes puedan sobrevivir. Estos análisis constituyen una herramienta valiosa para la caracterización de cepas y pueden proporcionar una base sólida para la selección de cepas optimizadas para el posterior uso.

Los objetivos de este estudio fueron: a) aislar del lactosuero cepas de *Kluyveromyces marxianus* tolerantes a factores de estrés del proceso de fermentación para la obtención de etanol, b) obtener biomasa para la producción del mismo.

METODOLOGÍA

Muestreo

Las muestras de lactosuero fueron obtenidas de la Cooperativa "Las Cuatro Esquinas", ubicada a 8,59 Km al norte de la ciudad de Villa María. La producción láctea de la cooperativa está destinada a la fabricación de diferentes quesos (Port Salut, Sardo, Barra, Cremoso y Holanda). Las muestras fueron recolectadas en diferentes etapas del proceso de producción y transportadas a 4°C hasta el laboratorio para su análisis.

Aislamiento de Levaduras a Partir de Muestras de Lactosuero

Se siguió la metodología propuesta por Massera y col. (2013). A 10 mL de lactosuero, se le adicionaron 10 µL de una solución de cloranfenicol (50 mg.mL⁻¹) y se incubó en agitación a 150 rpm durante 12 h a 28°C. Luego se realizaron diluciones seriadas en buffer fosfato salino (PBS, pH=7,4) y se sembraron alícuotas de 0,1 mL en medio de cultivo lactosa (ML) con rojo de fenol como indicador de pH. Las placas se incubaron por 48 h a 30°C y se seleccionaron las colonias de levaduras que presentaron viraje de color en el medio.

Los cultivos puros se obtuvieron repicando las colonias de levaduras obtenidas en ML en un medio sólido YPD (extracto de levadura - 10 g/L, peptona - 20 g/L y glucosa - 20 g/L). Se incubaron durante 48 h a 30°C.

Caracterización Fisiológica

Se realizó según la metodología propuesta por Kurtzman y col. (2011). A partir de una suspensión del aislado en buffer fosfato salino (PBS) 0,1%, a pH 7,4 se

realizaron los ensayos de fermentación y asimilación de distintas fuentes de carbono (lactosa, glucosa, sacarosa, maltosa y rafinosa). Se evaluó el crecimiento a 37°C.

Identificación Molecular

Extracción y Cuantificación de ADN

A partir de un cultivo fresco en medio líquido se transfirió 1 mL a un microtubo por duplicado. Se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min y se reservó a -80 °C durante 1 a 2 h. Se adicionaron 500 µL de buffer de lisis (0,5% SDS; 1,4% NaCl; 0,73% EDTA; 20 ml tris HCl 1M) y 5 µL de 2-Mercaptoetanol, se agitó en vortex durante 5 min y se llevó a una estufa a 65°C durante 1 h, agitando a los 30 min. Se agregaron 500 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó hasta obtener una suspensión homogénea, se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min. Se tomaron 300 µL de la fase clorofórmica y se transfirieron a un microtubo estéril, luego se agregaron 300 µL de isopropanol y se incubó a 20°C durante 2 h. Posteriormente, se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min, se retiró y descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 300 µL de etanol 70% frío, se centrifugó a 12000 durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se llevó a secar el pellet en estufa a 65°C. Se re-suspendió el ADN en 100 µL de buffer TE (TRIS-HCL 10 mM, EDTA 1,0 mM, pH 8) y se conservó a -20°C hasta su cuantificación, la cual se realizó en el equipo Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA).

Amplificación de la Región ITS

La amplificación de la región ITS1 – 5,8S – ITS2 se realizó por PCR utilizando los primers ITS 1 (5'-TCCG-

TAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). La mezcla de reacción se realizó con un volumen final de 45 µL conteniendo 3 µL de cada primer, 5 µL de Buffer (10x), 5 µL de dNTP 0,2 mM, 1,5 µL de MgCl₂ 1,5 mM, 0,3 µL de Taq ADN polimerasa (50 U), 5 µL de la muestra de ADN y 27,2 µL de agua MiliQ estéril. La amplificación se realizó en un termociclador MJ Research PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA), aplicando un programa con 5 min de desnaturalización a 94°C, 35 ciclos de desnaturalización por 1 min a 94°C, 1 min de annealing a 55°C y 1 min de elongación a 72°C, seguido por una elongación final de 5 min a 72°C.

Los productos de amplificación se examinaron por electroforesis en geles de agarosa 1,5% (p/v) teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) y se visualizaron en un digitalizador MiniBis Pro (DNR, Bio-Imaging Systems Ltd., USA). El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó por comparación con ADN testigo (Invitrogen, 100 bp Ladder) con bandas de referencias que oscilan entre 100-2072 pb. Los fragmentos amplificados fueron enviados a MACROGEN (Macrogen Inc., Seoul, Korea) para su secuenciamiento. Las secuencias obtenidas, una vez corregidas, fueron comparadas con secuencias equivalentes disponibles en bases de datos públicas (GenBank), a través de la herramienta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Ensayos de Tolerancia

Se evaluó la tolerancia en medio líquido conteniendo extracto de levadura (5g/L), peptona (5g/L), NH₄Cl (2 g/L), KH₂PO₄ (1 g/L), MgSO₄·7H₂O (0,3 g/L), lactosa (20 g/L) modificando los distintos factores de estrés como concentraciones ascendentes de etanol (50; 75 y 100 g/L), pH ácido (3,5; 4,5 y 5,5) y temperatura (30°C, 37°C y 40°C).

A partir de un inóculo, se sembró en el medio líquido y se incubó en agitación a 30°C durante 18 h. Al finalizar el tiempo de incubación, se realizó el recuento de viables por la técnica de microgota. Se tomó una alícuota de 100 µL, se realizaron diluciones seriadas a la décima parte, se sembraron en agar YPD, se incubó a 30°C durante 24 h y se realizó recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

Producción de Biomasa en Biorreactor

La fermentación en batch se realizó en un biorreactor de 5 L (New Brunswick BioFlo 2000) equipado con control de agitación, aireación y temperatura y con medición del pH. La fermentación se realizó en medio YPD con un volumen final de 2 L y 10% de inóculo. El fermentador fue autoclavado por 20 min a 121°C. La temperatura se mantuvo a 30°C, sin control de pH, la agitación a 200 rpm con una velocidad de flujo de aire filtrado de 1vvm. El tiempo de fermentación fue de 8 h y el muestreo se realizó cada una hora para el análisis de glucosa y biomasa.

Análisis

La concentración de biomasa fue estimada por el método de peso seco (se centrifugan alícuotas a 5000 rpm, 10 min y se secan en estufa a 105°C hasta peso constante). La concentración de glucosa se determinó mediante el método de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). La viabilidad celular se determinó por recuento en placa a través de la técnica de microgota.

Análisis Estadístico

Los ensayos se realizaron por triplicado en cada tratamiento. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA);

la significancia estadística se consideró con un nivel de $p \leq 0,0001$. Cuando el análisis fue estadísticamente significativo, se utilizó el test de LSD Fischer para la determinación de la importancia de cada parámetro individual y sus interacciones a un $p \leq 0,05$. Se utilizó el programa Info Stat para Windows versión 2015 para el análisis de los datos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e Identificación

Se obtuvieron 16 aislados de diferentes etapas de la cadena de producción. En la tabla 1 se muestra el número de cepas aisladas de acuerdo al lugar de muestreo. Se observó la morfología de levadura: colonias grandes (aprox. 1-2 mm de diámetro), convexas, lisas, de bordes definidos, brillantes y de aspecto mantecoso con viraje del indicador del medio. Se seleccionaron las cepas capaces de utilizar lactosa y de crecer a 37°C para la posterior identificación molecular, a nivel de especie reduciendo el número a 8 cepas.

Lugar de muestreo	Nº de cepas	Nomenclatura de la cepa	Características morfológicas	Utilización de lactosa	Crecimiento a 37°C
Suero frío	7	L23	Esféricas	-	+
		L29	Ovaladas	+	-
		L30	Ligeramente ovaladas	+	+
		L31	Ligeramente ovaladas	+	+
		L32	Ovaladas	+	+
		L43	Ovaladas	+	+
		L44	Ovaladas alargadas	+	+
Suero de tanque	2	L45	Esféricas	+	-
		L46	Esféricas	-	+
		L47	Ovaladas alargadas	+	+
Suero de calorífico	5	L48	Esféricas	-	+
		L49	Ovaladas alargadas	+	-
		L50	Ovaladas alargadas	+	+
		L51	Bastón	+	+
Suero de salmuera	1	L52	Esféricas	-	+
Suero con grasa	1	L53	Esféricas	-	+

Tabla 1. Características morfológicas y utilización de lactosa de las cepas aisladas.

En la Figura 1 se muestran las características macroscópicas de algunas de las levaduras aisladas de lactosuero. Todas las cepas mostraron versatilidad metabólica fermentando los cinco carbohidratos probados.

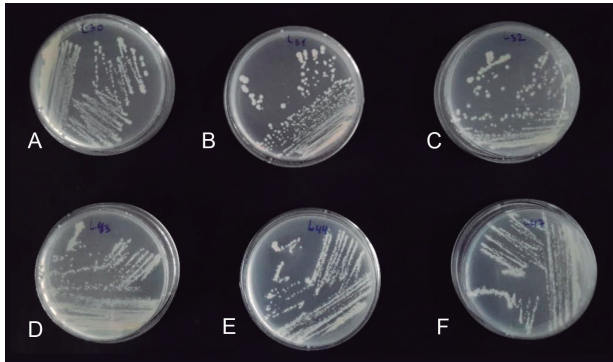


Figura 1. Características macroscópicas de levaduras aisladas en medio lactosuero. A) Cepa L30, B) Cepa L31, C) Cepa L32, D) Cepa L43, E) Cepa L44 y F) Cepa L47.

En la Figura 2 se muestra el gel correspondiente a la reacción de PCR Fingerprinting. Se observa que las cepas L30, L31 y L32 presentaron perfiles similares entre ellas, mientras que el resto de las cepas poseen el mismo perfil entre sí, obteniéndose dos perfiles diferentes que fueron amplificados y secuenciados.

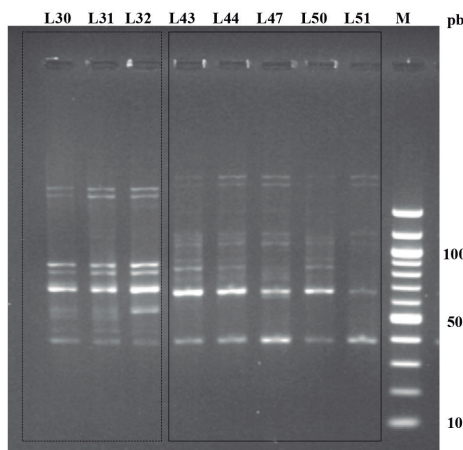


Figura 2. Obtención de los perfiles de 8 cepas de levaduras mediante la técnica de PCR Fingerprinting. M: marcador molecular; L: perfiles de cepas de levaduras.

Los productos de PCR secuenciados determinaron que sólo las cepas L30, L31 y L32 fueron identificadas como *Kluyveromyces marxianus*. Estas cepas fueron seleccionadas para los posteriores estudios de tolerancia.

Teniendo en cuenta que, *K. marxianus* es una especie que se aísla de lactosuero y que además en futuros estudios se utilizarían cepas de ésta especie para la producción de etanol a partir de lactosuero o permeado de lactosa es que se seleccionaron para los estudios de tolerancia las cepas L30, L31 y L32.

Ensayos de Tolerancia

En la Tabla 2 se muestra la tolerancia de las levaduras a algunos factores de estrés del proceso de fermentación. En el ensayo de tolerancia a la temperatura, no se observó diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento a 40°C y 30°C. En las interacciones entre cepa-temperatura se observó un comportamiento similar sin diferencias entre ellas.

Se observó que las tres cepas toleran los pH ensayados sin diferencias entre ellas, siendo 3,5 y 5,5 en donde se observa mayor crecimiento. La cepa L31 presentó un comportamiento uniforme en los pH ensayados, por lo que las variaciones de pH durante la fermentación no afectaría el crecimiento.

No se observó diferencia estadísticamente significativa entre las cepas con respecto a la tolerancia frente

Cepa	Temperatura (°C)	Media (UFC/mL)	pH	Media (UFC/mL)	Etanol (g/L)	Media (UFC/mL)
30	30	6,17E+08 ^a	3,5	2,00E+15 ^{cd}	50	5,20E+05 ^a
	30	2,87E+13 ^b	4,5	5,78E+09 ^a	75	2,08E+06 ^b
	40	1,14E+08 ^a	5,5	6,33E+14 ^{ab}	100	2,05E+05 ^a
31	30	1,47E+08 ^a	3,5	7,64E+14 ^{ab}	50	1,29E+06 ^{ab}
	31	1,19E+11 ^a	4,5	7,83E+14 ^{ab}	75	1,29E+06 ^{ab}
	40	2,19E+08 ^a	5,5	1,39E+15 ^{bc}	100	6,99E+04 ^a
32	30	1,26E+08 ^a	3,5	2,67E+14 ^a	50	4,04E+06 ^c
	37	4,39E+10 ^a	4,5	1,26E+10 ^a	75	3,30E+05 ^a
	40	3,25E+07 ^a	5,5	2,51E+15 ^d	100	6,77E+03 ^a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Tabla 2. Tolerancia de las diferentes cepas de *Kluyveromyces marxianus* a los factores de estrés del proceso de fermentación.

al etanol y se observó un comportamiento similar en el crecimiento frente a las concentraciones 50 y 75 g/L.

De las tres cepas evaluadas, *K. marxianus* L31 fue la que mostro el comportamiento más uniforme en los tres parámetros, por lo que fue seleccionada para realizar el ensayo de fermentación para la obtención de biomasa en biorreactor.

Ensayo en Biorreactor

En la Figura 3 se observa la curva de crecimiento de *K. marxianus* L31 y el consumo de glucosa. La fermentación se realizó durante 8 h con crecimiento exponencial entre las 2 y 5,2 h.

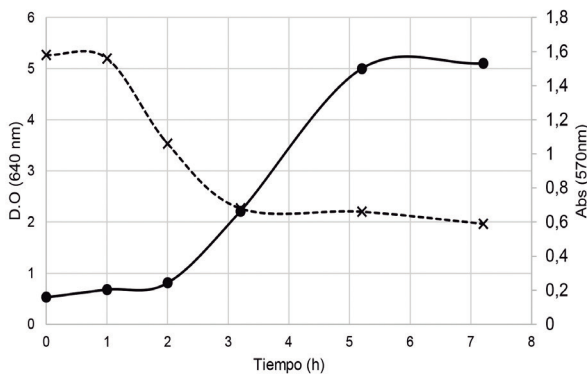


Figura 3. Curva de crecimiento (-) y consumo de sustrato (---) de *K. marxianus* L31.

La Figura 4 muestra la relación lineal que existe entre la DO (640nm) y el peso seco en mg/mL de la biomasa obtenida del crecimiento de *K. marxianus* L31.

Los parámetros cinéticos como productivos de la curva de crecimiento de *K. marxianus* L31 en biorreactor se muestran en la tabla 3. La velocidad máxima de crecimiento fue de 0,506 (h⁻¹). Se observó una producción de 0,257 g de biomasa por g de glucosa. Por otro lado, la producción de biomasa y productividad fueron de 4,2 g/L y 0,4 g/L/h.

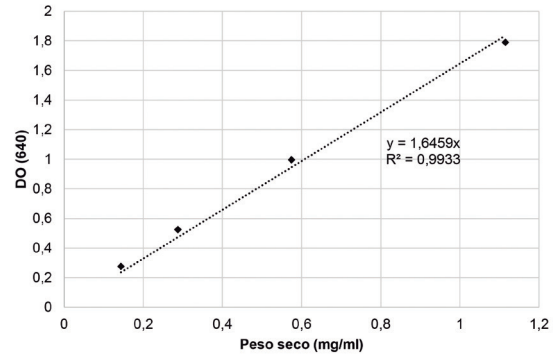


Figura 4. Relación lineal entre la DO (640 nm) y el peso seco (mg/mL) de la biomasa de *K. marxianus* L31.

Parámetros	
μ (h ⁻¹)	0,506
Y x/s (g/g)	0,257
Producción de biomasa (g/L)	4,2
Productividad (g/L.h)	0,47

Tabla 3. Parámetros cinéticos y de productividad.

CONCLUSIONES

A partir de lactosuero se aislaron 3 cepas de *Kluyveromyces marxianus* lactosa positivo, siendo *K. marxianus* L31 la que reúne los mejores valores de tolerancia a los factores de estrés del proceso de fermentación (altas T°, bajos pH y alta concentración de etanol) destinadas a la producción de etanol.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al Instituto de Investigación de la Universidad Nacional de Villa María, PICT 1717/12, PICT 1606/12, Proyecto Apoyo a Jóvenes Investigadores en Formación - UNVM, por el aporte financiero.

REFERENCIAS

Almeida, J.R.M., Modig T., Petersson, A., Hahn-Hagerdal, B., Liden, G., Gorwa-Grauslund, M.F. (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lingo cellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biot.* 82(4):340-349.

Basso, L.C., Basso, T.O., Rocha S.N. (2011). Ethanol production in Brazil: The industrial process and its impact on yeast fermentation. In: Bernardes MAS (ed) *Biofuel production. InTech, Rijeka*, 85-100

Gomar-Alba, M., Jiménez-Martí E. y del Olmo M. (2012). The *Saccharomyces cerevisiae* *Hot1p* regulated gene *YHR087W (HGI1)* has a role in translation upon high glucose concentration stress. *Mol Biol* 13(1):19.

Kutzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). *The*

Yeast: A taxonomic study. Amsterdam: Elsevier.

Martínez, R.G., Medina, F., Cozzi, L. (2013) *La economía agro-industrial de Jujuy: desde el azúcar al bioetanol*. CEPAL, Colección de Documentos de proyectos.

Massera, A., Pirola, M. B., & Páez, R. (2013). *TecnoINTI Jornadas Abiertas de Desarrollo, Innovación y Transferencia Tecnológica*. Aislamiento de levaduras nativas a partir de sueros lácteos de empresas PyMES de la provincia de Santa Fe (pág. 95). San Martín: Artes Gráficas Buschi.

Mawson, A.J. (1994). Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Biores Technol*, 47:195-203.

Mousdale, D. (2008). *Biocombustibles: Biotecnología, Química, y de Desarrollo Sostenible*, CRC Press, Nueva York, 96-102.