

# Effect of metabolic inhibitors on the alcoholic fermentation: tolerant yeasts

Ricardo Vejarano, Dr.<sup>1,2\*</sup>; Angie Gil-Calderón, Ing.<sup>1</sup>; Antonio Morata, Dr.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidad Privada del Norte (UPN), Trujillo, Perú. [ricardo.vejarano@upn.edu.pe](mailto:ricardo.vejarano@upn.edu.pe)

<sup>2</sup> Universidad Politécnica de Madrid (UPM), Madrid, España

**Resumen**– El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes inhibidores metabólicos sobre la fermentación alcohólica por dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*: 7VA y AWRI796. Estos inhibidores se producen durante la hidrólisis de materiales lignocelulósicos para la producción de bioetanol. La levadura 7VA mostró una alta tolerancia a estos inhibidores, sin afectar su producción de etanol. Además, se observaron efectos sobre la producción de glicerina y acetaldehído con *o*-vainillina y ácido trans-cinámico.

**Palabras clave:** Inhibidores metabólicos, biocombustibles, bioetanol, levaduras tolerantes.

**Abstract**– The aim of this work was to evaluate the effect of different metabolic inhibitors on alcoholic fermentation by two strains of *Saccharomyces cerevisiae*: 7VA and AWRI796. These inhibitors are produced during the hydrolysis of lignocellulose materials for bioethanol production. The yeast 7VA showed high tolerance to these inhibitors, without affecting its ethanol production. In addition, effects on the production of glycerin and acetaldehyde were observed with *o*-vanillin and trans-cinnamic acid.

**Keywords:** Metabolic inhibitors, biofuels, bioethanol, tolerant yeasts.

## I. INTRODUCCIÓN

Es bien conocida la problemática asociada con el uso de los combustibles fósiles derivados del petróleo, lo que ha dado lugar a la búsqueda de alternativas que permitan paliar los efectos de la emisión de los residuos de estos combustibles hacia la atmósfera. Actualmente, los combustibles fósiles junto con la energía nuclear proporcionan alrededor del 90% de la energía que se utiliza en el planeta. Sin embargo, las reservas de combustibles fósiles son limitadas.

A partir de la problemática surgida por la sobreexplotación de las reservas petrolíferas se ha propuesto impulsar el desarrollo de energías alternativas basadas en recursos naturales renovables y menos contaminantes como la luz solar, las mareas, el agua, la biomasa, entre otras; con las cuales se busca satisfacer la cada vez mayor demanda energética y reducir la contaminación ambiental [1].

Una de las más promisorias fuentes alternativas de recursos energéticos son los denominados combustibles biológicos o biocombustibles, obtenidos a partir de materia orgánica [2], cuya demanda para el transporte se incrementaría para el año 2030 en un 55% respecto al consumo en 2004. Así

mismo, en relación con las previsiones hechas por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), se esperaba un incremento del 100% de la producción mundial de biocombustibles, principalmente bioetanol y biodiesel, para el periodo 2012-2021, concentrándose principalmente en países como Estados Unidos, Brasil y en la Unión Europea, que en la actualidad son los mayores productores de biocombustibles líquidos [3].

Los tipos de biocombustibles líquidos más utilizados en Latinoamérica son el bioetanol y el biodiesel, por sus bajos costos de producción, convirtiéndose en la mejor opción de fuente energética como alternativa al petróleo, orientado principalmente para el abastecimiento y consumo en sectores como el transporte [4]. En Latinoamérica el mayor productor es Brasil, alcanzando volúmenes cercanos a los 26.3 billones de litros de bioetanol, con una participación del 34.2% [5].

## Tipos de biocombustibles

Los biocombustibles se clasifican de acuerdo a la materia prima utilizada para su producción. Biocombustibles de primera generación, como el bioetanol o simplemente etanol, derivan de la biomasa proveniente de los denominados cultivos energéticos como el maíz, sorgo, yuca, caña de azúcar, etc.; el biodiésel se produce a partir de las oleaginosas como la soya, aceite de palma, colza, etc.; y el biogás se obtiene a partir de residuos orgánicos mediante procesos de digestión anaerobia [6].

También se puede producir bioetanol de segunda generación a partir de material lignocelulósico procedente de biomasa vegetal, la cual debido a su compleja composición química tiene que ser sometida a tratamientos previos a la fermentación que permitan la separación de los constituyentes de dicha biomasa: celulosa, hemicelulosa, lignina [7], y sus derivados. Ello con el fin de liberar los azúcares fermentables, principalmente glucosa, que forman parte de la celulosa. Entre los procesos tecnológicos más utilizados se encuentran la hidrólisis enzimática [8] y la hidrólisis termoácida y todas sus variantes [9].

El tratamiento de separación del material lignocelulósico genera una amplia diversidad de compuestos derivados que afectan el metabolismo fermentativo de los microorganismos utilizados para convertir los azúcares en etanol, principalmente la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Este

grupo de compuestos inhibidores incluye ácidos alifáticos (acético, levulínico, fórmico, etc.), fenilpropanos, aldehídos furánicos (furfural, 5-hidroximetilfurfural, etc.), compuestos vainílicos, glicolaldehído, quinonas, entre otros [10-13].

Tecnológicamente se puede superar los problemas generados por los inhibidores metabólicos mediante el empleo de levaduras tolerantes, con lo cual se puede reducir el efecto inhibitorio de estas sustancias. La especie *Saccharomyces cerevisiae* ha sido evaluada en diferentes trabajos previos, mostrando resistencia debido a su capacidad para secretar enzimas con impacto positivo en la bioconversión de estos inhibidores en metabolitos menos tóxicos. Se ha reportado que el furfural, *o*-vainillina, glicolaldehído o ácido cinámico pueden ser metabolizados y convertidos por *S. cerevisiae* en alcohol furfúrico, alcohol *o*-vainílico, etilenglicol y estireno, respectivamente [10,11,14-16].

En tal sentido el objetivo del estudio fue evaluar el efecto de diferentes inhibidores metabólicos como el furfural, *o*-vainillina, ácido *trans*-cinámico y glicolaldehído, sobre la capacidad fermentativa de dos cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, tanto en la producción de etanol como en la producción de otros metabolitos.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Fermentaciones

Se utilizaron dos tipos de medios fermentativos:

- Medio sintético a base de extracto de levadura (3 g/l), peptona (3 g/l), tartrato de potasio (0.8 g/l) (Pronadisa, España) y glucosa (Panreac, Barcelona, España).
- Medios a base de mosto concentrado de uva.

Las concentraciones de azúcar se expresaron como grado alcohólico probable (GAP), determinado a partir de la concentración de azúcares mediante balance estequiométrico. El pH se estandarizó a 3.5 mediante adición de ácido tartárico (Pronadisa, España), y como inhibidores metabólicos se utilizaron furfural (Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Alemania), *o*-vainillina, glicolaldehído y ácido *trans*-cinámico (Fluka, Sigma-Aldrich Corp., Buchs SG, Suiza), los cuales fueron dosificados al inicio de las fermentaciones.

Se emplearon dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*: 7VA (D.O. Ribera del Duero, España) y AWRI796 (Maurivin, Queensland, Australia). Las fermentaciones se realizaron con inóculos a una densidad celular del orden de  $10^8$  UFC/ml, manteniendo la temperatura en torno a 22 °C.

### B. Determinación del grado alcohólico

El grado alcohólico se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección por índice de refracción (HPLC-RI), utilizando un cromatógrafo Waters e2695 Alliance (Waters, EE.UU.) acoplado a un detector RI

2412. Se filtró 1 ml de muestra en membrana de 0.45  $\mu$ m (Teknokroma, Barcelona, España) y se colocó en viales de vidrio de 2 ml con tapa de PTFE/silicona. La separación se hizo con una columna PhenoSphere-Next 5u C18 de tamaño 150 x 4.6 mm (Phenomenex, EE.UU.). Previo al análisis cromatográfico se hizo un calibrado con soluciones de 5, 10, 15 y 20 % de etanol grado HPLC (Panreac, España).

### C. Determinación de azúcares residuales y glicerina

En base a los métodos oficiales de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) para los azúcares residuales (OIV-MA-AS311-02) y para la glicerina (OIV-MA-AS312-05), utilizando un equipo de análisis mediante test enzimático Biosystems Y15 (Biosystems S.L., España).

### D. Análisis de compuestos volátiles de origen fermentativo

El análisis de estos compuestos se realizó por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID), empleando un cromatógrafo Agilent Technologies 6850, aplicando la metodología descrita por Ábalos et al. [17].

### E. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software Statgraphics v.5 (Graphics Software Systems, Rockville, MD, EE.UU.), con un nivel de significancia del 5% ( $p < 0.05$ ) utilizando el Test de Rangos Múltiples de Tukey (HSD) para determinar las diferencias significativas. Todas las pruebas experimentales se realizaron por cuadruplicado.

## III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL

#### *Efecto inhibitorio del furfural: medio sintético con 15% de GAP*

La Fig. 1 muestra una reducción significativa en la producción de etanol en presencia de 100 mg/l de furfural con la levadura 7VA (prueba DSH de Tukey), aunque dicha reducción fue tan sólo de 0.24%. Una mayor dosis de furfural (200 mg/l) no inhibe considerablemente la producción de etanol por esta levadura. La levadura AWRI796 mostró una menor producción de etanol que la levadura 7VA, aunque estadísticamente no se aprecia un efecto del furfural en la producción de etanol (prueba DSH de Tukey).

Se conoce que altas concentraciones de furfural ralentizan la producción de etanol al inicio de la fermentación, estimulando la glicólisis como fuente de poder reductor en forma de NADH, que la levadura utiliza para reducir el furfural a alcohol furfúrico como mecanismo de detoxificación, y a medida que incrementa la dosis de furfural, la levadura puede activar mecanismos alternativos para

generar poder reductor extra, por ejemplo el Ciclo de Krebs [13,18] y la vía de las pentosa fosfato, generando NADPH [19], lo que incrementaría la demanda de azúcares sin afectar el grado alcohólico final [13].

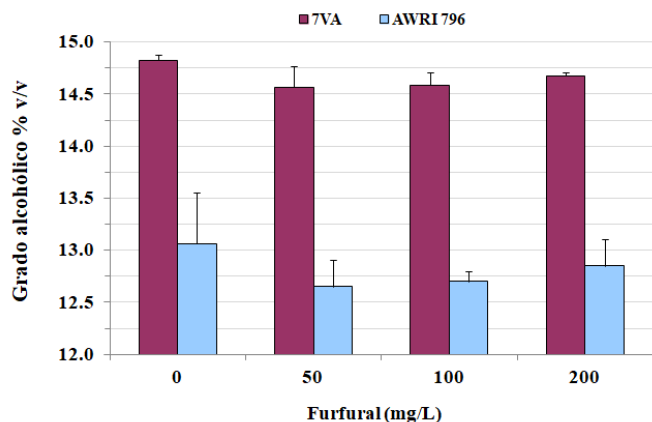


Fig. 1 Grado alcohólico a diferentes dosis de furfural con las levaduras 7VA y AWRI796 en un medio sintético con 15 % de GAP.

La Tabla 1 muestra los azúcares residuales. La levadura 7VA no reduce el consumo de azúcares en presencia de furfural, mientras que la levadura AWRI796 al parecer vio afectado su metabolismo en presencia de furfural, al mostrar mayores cantidades de azúcar residual.

Tabla 1 AZÚCARES RESIDUALES A DIFERENTES DOSIS DE FURFURAL CON LAS LEVADURAS 7VA Y AWRI796 EN UN MEDIO SINTÉTICO CON 15 % DE GAP

Azúcares residuales (g/l)		
Furfural (mg/l)	7VA	AWRI796
0	0.92 ± 0.28 a	6.10 ± 0.28 a
50	1.98 ± 1.36 a	5.82 ± 0.81 a
100	3.16 ± 0.65 a	6.95 ± 0.85 a
200	2.19 ± 1.82 a	6.54 ± 0.59 a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

*Efecto inhibitorio de la o-vainillina: medio sintético con 15% de GAP*

La Fig. 2 muestra que con la levadura 7VA no se obtuvieron reducciones estadísticamente significativas en el grado alcohólico (prueba DSH de Tukey), mientras que se observa un efecto inhibitorio en la levadura AWRI796, con una reducción del 0.53 % v/v con respecto al control a 50 mg/l de o-vainillina. Además en este ensayo se trabajó con dosis de 200 y 500 mg/l de o-vainillina, las cuales inhibieron totalmente a ambas levaduras, en concordancia con los resultados obtenidos en un estudio previo [12].

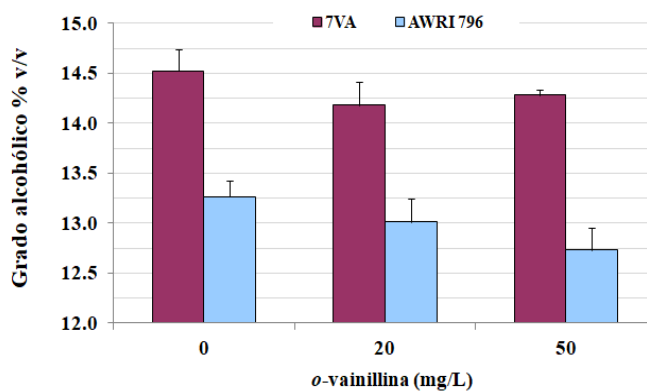


Fig. 2 Grado alcohólico a diferentes dosis de o-vainillina con las levaduras 7VA y AWRI796 en un medio sintético con 15 % de GAP.

La Tabla 2 muestra que con la levadura 7VA la o-vainillina no afecta el consumo de azúcares, al igual que en el caso del furfural, comportamiento diferente al observado con la levadura AWRI796, con altos contenidos de azúcares residuales, lo que indica que el inhibidor afecta la fermentación alcohólica con esta última levadura.

Tabla 2 AZÚCARES RESIDUALES A DIFERENTES DOSIS DE o-VAINILLINA CON LAS LEVADURAS 7VA Y AWRI796 EN UN MEDIO SINTÉTICO CON 15 % DE GAP

Azúcares residuales (g/l)		
o-vainillina (mg/l)	7VA	AWRI796
0	2.40 ± 1.45 a	13.72 ± 1.48 a
20	3.18 ± 1.59 a	13.50 ± 1.82 a
50	4.71 ± 0.76 a	11.55 ± 1.49 a
200	*	*
500	*	*

(\*) Inhibición total. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

*Efecto sinérgico de la o-vainillina y el furfural: medio sintético con 12.5 % de GAP*

Se trabajó únicamente con la levadura 7VA y a una menor concentración de azúcares con el fin de verificar el efecto de los inhibidores en función del contenido de azúcares en el medio [20]. Las dosis de o-vainillina fueron de 20, 50, 100 y 200 mg/l, además de un tratamiento combinado o-vainillina + furfural a 50 mg/l cada uno (V50+F50).

La Fig. 3 muestra que la o-vainillina hasta una dosis de 50 mg/l no genera una inhibición significativa en la producción de etanol por la levadura 7VA, en concordancia con el ensayo anterior. No obstante, las dosis de 100 y 200 mg/l produjeron una inhibición total, al igual que en el ensayo anterior. Además la combinación o-vainillina más furfural (V50+F50) no tuvo un efecto significativo sobre la producción de etanol (prueba DSH de Tukey), lo que indicaría que la levadura 7VA posee una alta tolerancia a estos inhibidores.

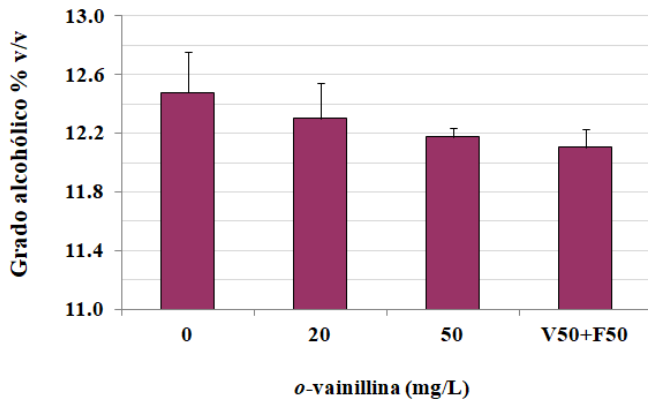


Fig. 3 Grado alcohólico tras las fermentaciones en un medio sintético con 12.5 % de GAP con la levadura 7VA a diferentes dosis de *o*-vainillina y combinación con furfural a 50 mg/l cada uno (V50+F50).

La Tabla 3 muestra los azúcares residuales, los cuales indican que los inhibidores no afectan el consumo de azúcares por la levadura 7VA.

TABLA 3  
AZÚCARES RESIDUALES EN UN MEDIO SINTÉTICO CON 12.5 % DE GAP CON LA LEVADURA 7VA A DIFERENTES DOSIS INICIALES DE O-VAINILLINA Y COMBINACIÓN CON FURFURAL A 50 MG/L CADA UNO (V50+F50)

<i>o</i> -vainillina (mg/l)	Glucosa residual (g/l)
0	1.59 ± 0.31 a
20	3.04 ± 0.47 b
50	4.27 ± 1.08 b
100	*
200	*
V50+F50	2.98 ± 0.40 b

(\*) Inhibición total.  
Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

*Efecto inhibitorio del ácido trans-cinámico: medio a base de mosto con 14.4% de GAP*

Se trabajó con las levaduras 7VA y AWRI796 en un medio con 14.4 % de GAP, con dosis de ácido *trans*-cinámico de 100, 200 y 500 mg/l.

A la dosis de 100 mg/l de ácido *trans*-cinámico se produjo un retraso de 8 días en el inicio de la fermentación con ambas levaduras (Fig. 4), sin afectar el final de la fermentación.

A las dosis de 200 y 500 mg/l ambas levaduras fueron inhibidas totalmente. En un estudio previo [12] se obtuvo una inhibición del 58% en la producción de etanol por *S. cerevisiae* a 1000 mg/l de ácido cinámico.

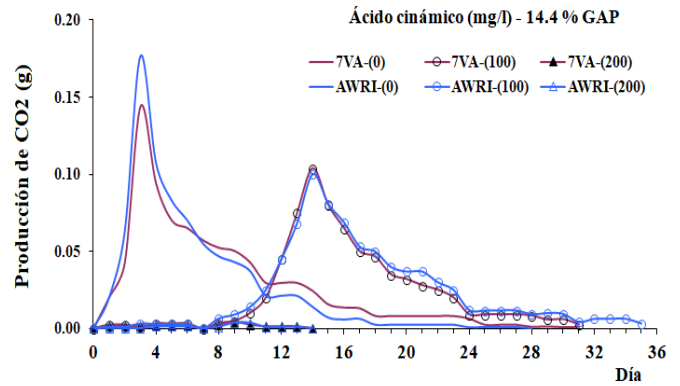


Fig. 4 Cinética fermentativa de las levaduras 7VA y AWRI796 en presencia de ácido *trans*-cinámico.

De acuerdo a la Fig. 5, no se evidenció un efecto significativo en la producción de etanol con ambas levaduras en presencia de ácido *trans*-cinámico (prueba DSH de Tukey).

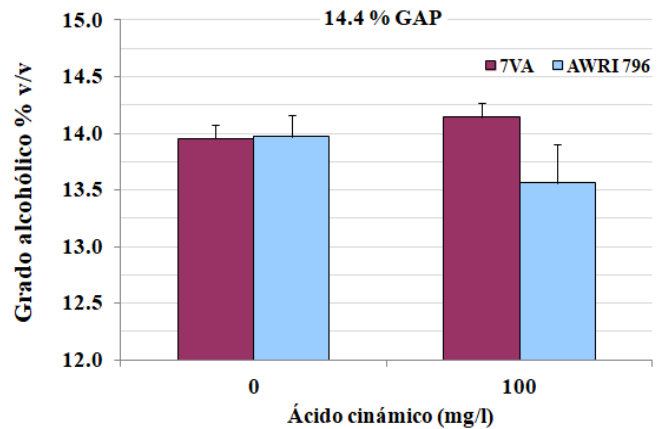


Fig. 5 Grado alcohólico a diferentes dosis de ácido *trans*-cinámico con las levaduras 7VA y AWRI796 en un medio a base de mosto con 14.4 % de GAP.

La Tabla 4 muestra los azúcares residuales obtenidos con ambas levaduras. Se evidencia que en la levadura AWRI796 el ácido *trans*-cinámico afectó el consumo de azúcares.

TABLA 4  
AZÚCARES RESIDUALES A DIFERENTES DOSIS DE ÁCIDO *TRANS*-CINÁMICO CON LAS LEVADURAS 7VA Y AWRI796

Ácido <i>trans</i> -cinámico mg/l	Azúcares residuales (g/l)	
	7VA	AWRI 796
0	3.60 ± 0.13 a	4.28 ± 0.25 a
100	3.39 ± 0.14 a	6.13 ± 1.28 b
200	*	*
500	*	*

(\*) Inhibición total.  
Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

*Efecto inhibitorio del glicolaldehído: medio a base de mosto con 15 % de GAP*

Se trabajó con las levaduras 7VA y AWRI796, a dosis de glicolaldehído de 100 y 200 mg/l. La Fig. 6 muestra un efecto inhibitorio en la levadura AWRI796, con una reducción del grado alcohólico de 0.67 % v/v a 200 mg/l de glicolaldehído. Resultados diferentes a los obtenidos en un estudio previo [11], que con 240 mg/l de glicolaldehído se obtuvo una reducción del grado alcohólico en torno al 51%, aunque en dicho estudio utilizaron un medio con una concentración de glucosa de 100 g/l (aprox. 6% de GAP).

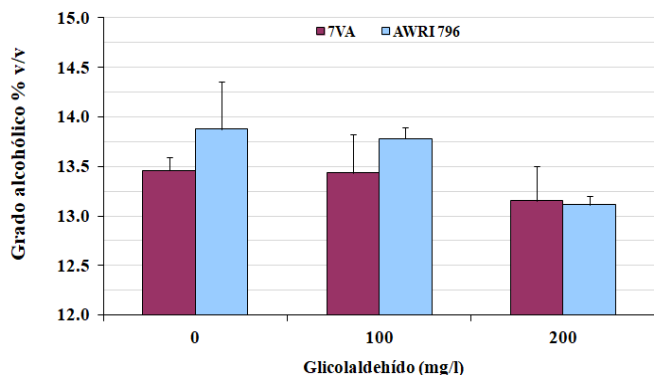


Fig. 6 Grado alcohólico a diferentes dosis de glicolaldehído con las levaduras 7VA y AWRI 796 en un medio a base de mosto con 15 % de GAP.

Con la levadura 7VA no hubo un efecto significativo sobre la producción de etanol (prueba DSH de Tukey), de modo que se podría considerar como una levadura tolerante a este inhibidor, cuyo mecanismo de detoxificación podría ser la conversión en sustancias menos perjudiciales, principalmente etilenglicol, utilizando la enzima ADH [21].

La Tabla 5 muestra los azúcares residuales con ambas levaduras, observándose que la presencia de glicolaldehído no afecta el consumo de azúcares en ambas levaduras.

TABLA 5  
AZÚCARES RESIDUALES A DIFERENTES DOSIS DE GLICOLADEHÍDO CON LAS LEVADURAS 7VA Y AWRI 796 EN UN MEDIO A BASE DE MOSTO CON 15 % DE GAP

Azúcares residuales (g/l)		
Glicolaldehído (mg/l)	7VA	AWRI 796
0	2.84 ± 0.08 a	2.69 ± 0.33 a
200	2.86 ± 0.09 a	2.76 ± 0.11 a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

**B. EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS**

Dada la resistencia mostrada en los ensayos previos, se trabajó únicamente con la levadura 7VA en un medio a base de mosto con 14.1% de GAP.

*Efecto sobre la producción de acetaldehído*

Se considera importante la producción de acetaldehído por ser el metabolito precursor en la síntesis del etanol y su presencia en concentraciones no habituales puede indicar el efecto de los inhibidores metabólicos sobre la enzima ADH en *Saccharomyces cerevisiae*, enzima que sería utilizada para convertir el furfural en alcohol furfurílico [13], la *o*-vainillina en alcohol *o*-vainílico [12,22], o el glicolaldehído en etilenglicol [21], en detrimento de la conversión de acetaldehído a etanol, acumulándose por tanto el acetaldehído en el medio.

La Fig. 7 muestra que la producción de acetaldehído incrementa en presencia de furfural y *o*-vainillina a medida que aumentan las dosis de estos inhibidores, siendo significativo el incremento a 100 mg/l de *o*-vainillina. Los demás bloqueadores parecen no tener un efecto significativo (prueba DSH de Tukey).

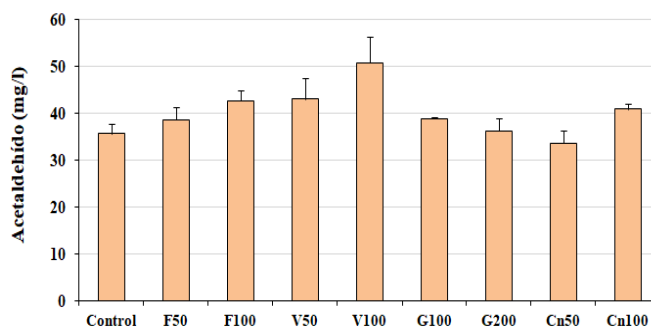


Fig. 7 Producción de acetaldehído por la levadura 7VA en un medio con 14.1% de GAP.

*Efecto sobre la producción de glicerina*

La Fig. 8 muestra la producción de glicerina. En presencia de *o*-vainillina a dosis de 50 y 100 mg/l, disminuye la producción de glicerina en 0.71 y 0.57 g/l, respectivamente, al igual que con el ácido *trans*-cinámico, que a dosis de 50 y 100 mg/l disminuye significativamente la producción de glicerina en 0.77 y 1.23 g/l, respectivamente, con respecto al control. Los otros inhibidores no muestran un efecto significativo (prueba DSH de Tukey).

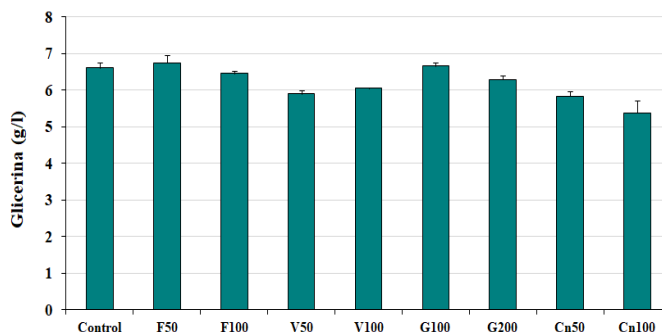


Fig. 8 Producción de glicerina por la levadura 7VA en un medio con 14.1 % de GAP.

#### IV. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, la levadura 7VA sería una interesante opción de cara a contrarrestar el efecto de los inhibidores metabólicos sobre la fermentación alcohólica, con lo cual el rendimiento en la producción de etanol no se vería afectado. Se ha podido evidenciar que con la levadura 7VA los inhibidores evaluados no afectan el consumo de azúcares, de modo que dicha levadura redirigiría el metabolismo fermentativo a la producción de otros metabolitos secundarios. Se ha encontrado que el acetaldehído ha incrementado su producción en presencia de furfural, *o*-vainillina y ácido *trans*-cinámico, mientras que la glicerina puede disminuir en presencia de *o*-vainillina y ácido *trans*-cinámico. Los demás inhibidores al parecer no afectan la producción de estos metabolitos secundarios. Finalmente, se puede considerar que la selección de levaduras tolerantes es una adecuada estrategia a fin de superar los inconvenientes generados por la presencia de inhibidores metabólicos en los medios utilizados para la producción de etanol a partir de materias primas lignocelulósicas, por ejemplo en el contexto de la producción de biocombustibles, específicamente en la producción de bioetanol.

#### AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se ejecutó en la Universidad Politécnica de Madrid (UPM), en el marco del Proyecto de Investigación AGL-2008-05603-C02-01/AGR del Ministerio de Ciencia e Innovación de España (MICINN).

#### REFERENCIAS

- [1] United States Agency International Development, USAID. 2009. Biocombustibles: Alternativa de negocios verdes. Disponible en: <https://www.usaid.gov/sites/default/files/documents/1862/biocombustibles.pdf>.
- [2] González-Piqueras J. y Valero, E. 2011. Energía y desarrollo humano. Un acercamiento a los biocombustibles. *Intec Journal*, 1(2): 66-84.
- [3] REN21. 2009. Renewables Global Status Report: 2009 Update. Paris, REN21 Secretariat. Disponible en: [http://www.ren21.net/Portals/0/documents/activities/gsr/RE\\_GSR\\_2009\\_Update.pdf](http://www.ren21.net/Portals/0/documents/activities/gsr/RE_GSR_2009_Update.pdf).
- [4] Coelho S. 2005. Biofuels - Advantages and Trade Barriers. United Nations Conference on Trade and Development (UNCTAD). Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.613.3127&rep=rep1&type=pdf>.
- [5] Morelos, J. 2016. Análisis de la variación de la eficiencia en la producción de biocombustibles en América Latina. *Estudios Gerenciales*, 32(139): 120-126.
- [6] Magaña, J.L., Torres, E., Martínez, M.T., Sandoval, C., Hernández, R. 2006. Producción de biogás a nivel laboratorio utilizando estiércol de cabras. *Acta Universitaria*, 16(2): 27-37.
- [7] Callejas, E. y Gasca, V. 2009. Los biocombustibles. *El Cotidiano*, (157): 75-82.
- [8] Guadix, A., Guadix, E.M., Páez-Dueñas, M.P., Gonzales-Tello, P. y Camacho, F. 2000. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1): 79-89.
- [9] Tomás-Pejó, E., Alvira, P., Ballesteros, M., Negro, M. 2011. Pretreatment technologies for lignocellulose-to-bioethanol conversion. *Biofuels. Alternative Feedstocks and Conversion Processes*, 149-176.
- [10] Hawkins, G.M., Doran-Peterson, J. 2011. A strain of *Saccharomyces cerevisiae* evolved for fermentation of lignocellulosic biomass displays improved growth and fermentative ability in high solids concentrations and in the presence of inhibitory compounds. *Biotechnology for Biofuels*, 4: 49.
- [11] Jayakody, L.N., Hayashi, N., Kitagaki, H. 2011. Identification of glycolaldehyde as the key inhibitor of bioethanol fermentation by yeast and genome-wide analysis of its toxicity. *Biotechnology Letters*, 33: 285-292.
- [12] Larsson, S., Quintana-Sáinz, A., Reimann, A., Nilvebrant, N.O., Jönsson, L. 2000. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86: 617 - 632.
- [13] Modig T., Liden, G., Taherzadeh, M.J. 2002. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemical Journal*, 363: 769-776.
- [14] Liu, Z., Slininger, P.J., Gorsich, S.W. 2005. Enhanced biotransformation of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124: 451-460.
- [15] Schwarz, K.J., Boitz, L.I., Methner, F.J. 2012. Enzymatic formation of styrene during wheat beer fermentation is dependent on pitching rate and cinnamic acid content. *Journal of the Institute of Brewing*, 118: 280-284.
- [16] Vejarano, R., Morata, A., Loira, I., González, M.C., Suárez-Lepe, J.A. 2013. Theoretical considerations about usage of metabolic inhibitors as possible alternative to reduce alcohol content of wines from hot areas. *European Food Research and Technology*, 237(3): 281-290.
- [17] Ábalos, D., Vejarano, R., Morata, A., González, C., Suárez-Lepe, J.A. 2011. The use of furfural as a metabolic inhibitor for reducing the alcohol content of model wines. *European Food Research and Technology*, 232: 663-669.
- [18] Taherzadeh, M.J., Gustafsson, L., Niklasson, C., Lidén, G. 1999. Conversion of furfural on aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(2): 169-174.
- [19] Heer, D., Heine, D., Sauer, U. 2009. Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to high concentrations of furfural is based on NADPH-dependent reduction by at least two oxidoreductases. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(24): 7631-7638.
- [20] Lu, P., Chen, L., Li, G., Shen, S., Wang, L., Jiang, Q., Zhang, J. 2007. Influence of furfural concentration on growth and ethanol yield of *Saccharomyces kluyveri*. *Journal of Environmental Sciences*, 19: 1528-1532.
- [21] Jayakody, L.N., Horie, K., Hayashi, N., Kitagaki, H. 2012. Improvement of tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to hot-compressed water-treated cellulose by expression of ADH1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(1): 273-283.
- [22] Fitzgerald, D., Stratford, M., Narbad, A. 2003. Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *International Journal on Food Microbiology*, 86: 113-122.