

Bioconversion and effect of metabolic inhibitors on secondary metabolites production during alcoholic fermentation

Ricardo Vejarano, Dr.^{1*}; Angie Gil-Calderón, Ing.¹; Antonio Morata, Dr.²

¹ Universidad Privada del Norte (UPN), Trujillo, Perú. ricardo.vejarano@upn.edu.pe

² Universidad Politécnica de Madrid (UPM), Madrid, España

Abstract– The aim of this study was to evaluate the bioconversion of metabolic inhibitors (furfural, o-vanillin, trans-cinnamic acid and copper) during alcoholic fermentation by Saccharomyces cerevisiae, and its effect on secondary metabolites production. The tested yeast shows a good activity to convert furfural and o-vanillin into their derivatives furfuryl alcohol and o-vanillyl alcohol, respectively, both detected in the respective mediums at final of fermentative process. Also, the production of higher alcohols was affected in the presence of o-vainillin and trans-cinnamic acid, and to a lesser extent of copper, with a marked effect obtained by discriminant analysis.

Keywords– Metabolic inhibitors, bioconversion, alcoholic fermentation, secondary metabolites.

Digital Object Identifier (DOI):
<http://dx.doi.org/10.18687/LACCEI2019.1.1.168>
ISBN: 978-0-9993443-6-1 ISSN: 2414-6390

Bioconversion and effect of metabolic inhibitors on secondary metabolites production during alcoholic fermentation

Bioconversión y efecto de inhibidores metabólicos sobre la producción de metabolitos secundarios durante la fermentación alcohólica

Ricardo Vejarano, Dr.^{1*}; Angie Gil-Calderón, Ing.¹; Antonio Morata, Dr.²

¹ Universidad Privada del Norte (UPN), Trujillo, Perú. ricardo.vejarano@upn.edu.pe

² Universidad Politécnica de Madrid (UPM), Madrid, España

Abstract– *The aim of this study was to evaluate the bioconversion of metabolic inhibitors (furfural, o-vanillin, trans-cinnamic acid and copper) during alcoholic fermentation by Saccharomyces cerevisiae, and its effect on secondary metabolites production. The tested yeast shows a good activity to convert furfural and o-vanillin into their derivatives furfuryl alcohol and o-vanillyl alcohol, respectively, both detected in the respective mediums at final of fermentative process. Also, the production of higher alcohols was affected in the presence of o-vanillin and trans-cinnamic acid, and to a lesser extent of copper, with a marked effect obtained by discriminant analysis.*

Keywords: *Metabolic inhibitors, bioconversion, alcoholic fermentation, secondary metabolites.*

Resumen– *El objetivo del estudio fue evaluar la bioconversión de inhibidores metabólicos (furfural, o-vainillina, ácido trans-cinámico y cobre) durante la fermentación alcohólica por Saccharomyces cerevisiae, y su efecto sobre la producción de metabolitos secundarios. La levadura mostró buena actividad para convertir furfural y o-vainillina en sus derivados alcohol furfúrico y alcohol o-vainílico, respectivamente, detectados en los respectivos medios tras el proceso fermentativo. Así mismo, la presencia de o-vainillina y ácido trans-cinámico, y en menor medida de cobre, afectó la producción de los alcoholes superiores, con un marcado efecto obtenido mediante análisis discriminante.*

Palabras clave: *Inhibidores metabólicos, bioconversión, fermentación alcohólica, metabolitos secundarios.*

I. INTRODUCCIÓN

La fermentación alcohólica es uno de los procesos de mayor uso a nivel industrial, utilizada para obtener una amplia variedad de productos con diferentes aplicaciones, desde alimentos como vino, cerveza, pan, etanol, bebidas destiladas, etc., o etanol para aplicaciones farmacéuticas, producción de combustibles, entre otras.

Digital Object Identifier (DOI):

<http://dx.doi.org/10.18687/LACCEI2019.1.1.168>

ISBN: 978-0-9993443-6-1 ISSN: 2414-6390

La fermentación alcohólica se fundamenta en la conversión bioquímica de azúcares como glucosa y/o fructosa, en etanol, proceso llevado a cabo por diversos microorganismos, siendo el más usual la levadura *Saccharomyces cerevisiae* [1], que como todo ser vivo requiere de nutrientes, los cuales obtiene de los sustratos sobre los cuales crece y desarrolla sus procesos metabólicos. No obstante, los sustratos utilizados por *S. cerevisiae* como fuente de nutrientes pueden contener otras sustancias que afecten su metabolismo, produciendo una inhibición de su crecimiento y de su producción de etanol [1-5].

Diversos estudios han sido encaminados con el fin de dilucidar los mecanismos mediante los cuales estos inhibidores metabólicos actúan sobre *S. cerevisiae*, a partir de los cuales se han propuesto diversas estrategias que permitan mejorar el proceso fermentativo, por ejemplo, mediante cultivos adaptativos de la levadura a dosis crecientes de estos inhibidores, o el uso de levaduras genéticamente modificadas [4,6]. Otra estrategia incluye la selección de cepas de levadura que de manera natural presenten alta tolerancia a estos inhibidores, sin ver afectado su crecimiento ni la producción de etanol [7-9].

Inhibidores metabólicos de naturaleza orgánica

Es amplia la variedad de compuestos orgánicos que pueden afectar el metabolismo de *S. cerevisiae*, los cuales incluyen ácidos alifáticos (acético, levulínico, fórmico, etc.), fenilpropanos, aldehídos furánicos (furfural, 5-hidroxitilfurfural, etc.), compuestos vainílicos, glicolaldehído, quinonas, entre otros [3,4,9,10].

Estos compuestos han sido estudiados mayoritariamente en el contexto de la producción de combustibles, especialmente etanol obtenido de material lignocelulósico procedente de biomasa vegetal. Esta biomasa, debido a su compleja composición química debe ser tratada previamente a

fin de separar la celulosa, hemicelulosa y lignina [11]. Los procedimientos mayoritariamente aplicados incluyen la hidrólisis termoácida [12], mediante la cual la celulosa es convertida en su monómero glucosa, azúcar fermentable por *S. cerevisiae* para producir etanol. No obstante, la hidrólisis termoácida, y sus variantes, pueden generar otros compuestos derivados del material lignocelulósico, que incluyen a los inhibidores metabólicos, que afectan el metabolismo fermentativo de *S. cerevisiae* [3,4,9,10].

Tecnológicamente se puede superar los problemas generados por estos inhibidores metabólicos mediante el empleo de levaduras tolerantes, como demostramos en nuestro estudio previo [8], sin ver afectados la producción de etanol y el consumo de azúcares. La utilización de una cepa tolerante de *S. cerevisiae* se basa en su capacidad para metabolizar estos inhibidores y convertirlos en sus derivados menos tóxicos. Por ejemplo, el furfural, *o*-vainillina y ácido *trans*-cinámico (Figura 1) pueden ser convertidos en alcohol furfurílico, alcohol *o*-vainílico y estireno, respectivamente, por *S. cerevisiae* [1,2,9,13].

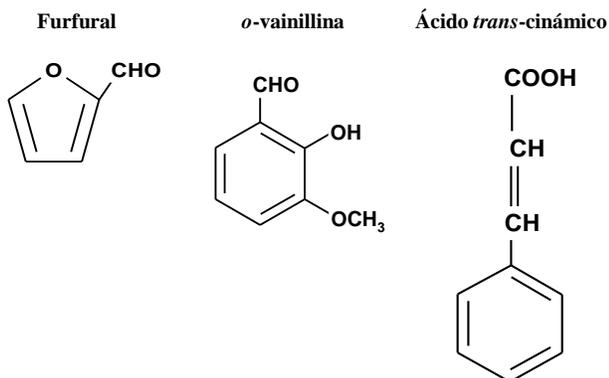


Fig. 1 Inhibidores metabólicos de la fermentación alcohólica por *Saccharomyces cerevisiae*.

Inhibidores metabólicos de naturaleza inorgánica

La presencia de metales pesados constituye un problema en los procesos fermentativos, siendo uno de los metales más estudiados por su efecto inhibitorio sobre *S. cerevisiae* el cobre (Cu), especialmente en el contexto de fermentaciones para la producción de vino. A bajas concentraciones, el Cu es un micronutriente esencial para el crecimiento microbiano. No obstante, restos de este metal pueden aparecer en mostos, y por tanto en vinos, como consecuencia de su uso en el tratamiento de los viñedos contra el mildiu (*Plasmopara viticola*), oidio (*Uncinula necator*) o botritis (*Botrytis cinerea*) [14], siendo sus formas más aplicadas como sulfato de cobre y cloruro de cobre. El Código Internacional de Prácticas Enológicas establece para el Cu un límite máximo residual en vinos de 1 mg/L [15], mientras que la legislación europea establece un máximo residual en uva de 20 mg/kg [16].

Altas concentraciones de Cu pueden inducir la oxidación de los compuestos fenólicos y a concentraciones mayores a 20

mg/L puede afectar la capacidad fermentativa de *S. cerevisiae* [5]. Si bien los mecanismos mediante los cuales el Cu actúa sobre *S. cerevisiae* aún no están del todo claros, su efecto inhibitorio estaría relacionado, entre otros, con el bloqueo de grupos funcionales y modificación conformacional de macromoléculas celulares como ácidos nucleicos, enzimas y otras proteínas, desplazamiento de iones esenciales y principalmente disrupción de la membrana celular [17], además de la producción de radicales libres, promoviendo la peroxidación lipídica y su acción sobre enzimas clave de la vía glicolítica como la alcohol deshidrogenasa (ADH), enolasa, fructosabifosfato aldolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), hexoquinasa, piruvato decarboxilasa, fosfoglicerato quinasa, entre otras [18].

Bioconversión y efecto de los inhibidores metabólicos sobre la producción de compuestos fermentativos secundarios

Previamente demostramos que la selección de cepas tolerantes de *S. cerevisiae* es una adecuada estrategia para superar los inconvenientes de la presencia de los inhibidores metabólicos en medios fermentativos, sin ver afectadas la producción del principal metabolito derivado de la fermentación alcohólica, el etanol, y el consumo de azúcares por la levadura [8], en concordancia con otros estudios [10].

Un aspecto importante es el comportamiento de los inhibidores metabólicos durante el proceso fermentativo. Diversos estudios han reportado la bioconversión de estos compuestos en sustancias menos nocivas para *S. cerevisiae* [1,2,9,13], no obstante, es importante conocer las concentraciones residuales de estos inhibidores metabólicos y las tasas de conversión en sus derivados. En el último caso, solamente se ha reportado tasas de bioconversión de furfural por *S. cerevisiae* [19], y para los demás inhibidores se han postulado hipótesis respecto a cuál sería el destino de estos inhibidores durante el proceso fermentativo [2], o de compuestos análogos como en el caso de vainillina para tratar de explicar la bioconversión de su isómero *o*-vainillina, con mayor efecto inhibitorio [20].

Así mismo, desde el punto de vista cuantitativo la presencia de inhibidores metabólicos puede inducir desviaciones en la ruta metabólica como consecuencia de su efecto sobre las enzimas implicadas en el proceso fermentativo. Por ejemplo, modificar la producción de glicerina, acetaldehído, alcoholes superiores, ente otros compuestos [8,10,21,22], con consecuencias, entre otras, sobre la composición y perfil aromático de bebidas fermentadas como el vino, donde elevadas concentraciones de metabolitos como el acetaldehído, acetato de etilo, etc., pueden conferir connotaciones negativas y rechazo por parte del consumidor [23]. Si bien mayores producciones de otros metabolitos como la glicerina son deseados, así como de determinados compuestos volátiles con repercusión sensorial positiva [24].

En tal sentido el objetivo del estudio fue evaluar la bioconversión de los inhibidores metabólicos durante la

fermentación alcohólica por *S. cerevisiae*, y su efecto sobre la producción de metabolitos secundarios, a fin de dilucidar los posibles mecanismos a través de los cuales la levadura es capaz de contrarrestar los efectos negativos de estos inhibidores, y modifica el contenido de compuestos minoritarios una vez finalizado el proceso fermentativo.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Fermentaciones

Se utilizaron medios a base de mosto de uva Tempranillo. Las concentraciones de azúcar se expresaron como grado alcohólico probable (% GAP) 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, Alemania), *o*-vainillina, ácido *trans*-cinámico (Fluka, Sigma-Aldrich Corp., Suiza), y cobre (Panreac, España), los cuales fueron dosificados al inicio de las fermentaciones. Se empleó la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* 7VA (D.O. Ribera del Duero, España) dada su resistencia mostrada a los inhibidores metabólicos en nuestro estudio previo [8]. Las fermentaciones se realizaron con inóculos a una densidad celular del orden de 10^8 UFC/mL, manteniendo la temperatura a 22 °C.

B. Determinación de glicerina

En base al método oficial OIV-MA-AS312-05 de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), utilizando un equipo de análisis mediante test enzimático Biosystems Y15 (Biosystems S.L., España).

C. 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. [25].

D. Análisis de inhibidores metabólicos y sus derivados tras las fermentaciones

Los inhibidores metabólicos residuales y sus derivados se analizaron en un espectrómetro de masas Agilent 5973 Network acoplado a un cromatógrafo de gases Agilent 6890 N (GC-MS) aplicando la metodología descrita por Morata et al. [26], utilizando como patrones *o*-vainillina, ácido *trans*-cinámico (Fluka, Sigma-Aldrich Corp., Suiza), vainillina, furfural, alcohol furfurílico y 3,4-dimetilfenol como estándar interno (Merck Schuchardt OHG, Alemania).

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 (HSD) de Tukey para determinar las diferencias significativas. Todas las pruebas experimentales se realizaron por cuadruplicado.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. BIOCONVERSIÓN DE LOS INHIBIDORES METABÓLICOS

Análisis de los inhibidores metabólicos y sus derivados mediante GC-MS

La Tabla 1 muestra los tiempos de retención (TR) de los inhibidores metabólicos y los correspondientes derivados, cuyos cromatogramas obtenidos tras las fermentaciones se muestran en la Figura 2.

Solamente en el caso del alcohol furfurílico y del alcohol *o*-vainílico fue posible contrastar los picos con los espectros de masas (*m/z*) de patrones de referencia externos, de acuerdo con la base de datos NIST MS Search 2.0, con lo cual se procedió a calcular las concentraciones de estos derivados.

TABLA 1
TIEMPOS RETENCIÓN (TR) DE LOS INHIBIDORES METABÓLICOS RESIDUALES Y DE SUS DERIVADOS, DETERMINADOS MEDIANTE GC-MS

	Compuesto	TR (min)	Espectro de masa (<i>m/z</i>)
Inhibidor metabólico	Furfural	9.16	96
	<i>o</i> -vainillina	16.99	152
	Ácido <i>trans</i> -cinámico	24.80	147
Derivado metabólico	Alcohol furfurílico	11.56	98/97/81
	Alcohol <i>o</i> -vainílico	21.90	65/136/154
	Estireno	6.46	104/103/78

En la Figura 2 se identificó un pico de tamaño muy reducido a un TR = 6.46 minutos (*m/z* de 104/103/78), que correspondería al estireno producido a partir del ácido *trans*-cinámico por *S. cerevisiae*. Así mismo se identificó restos de ácido *trans*-cinámico (TR = 24.80 minutos) luego de 72 de fermentación.

De modo que a diferencia del furfural y la *o*-vainillina (metabolizados completamente tras 48 horas de fermentación, Figura 3), la cepa evaluada de *S. cerevisiae* necesitaría un mayor tiempo para metabolizar completamente el ácido *trans*-cinámico.

Tasas de bioconversión de furfural y *o*-vainillina

Altas concentraciones de furfural ralentizan la producción de etanol, estimulando la glicólisis como fuente de poder reductor (NADH generado en la conversión de gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-difosfoglicerato), que la levadura utiliza para reducir el furfural a alcohol furfurílico como método de detoxificación, sin afectar el grado alcohólico final [10,13,27].

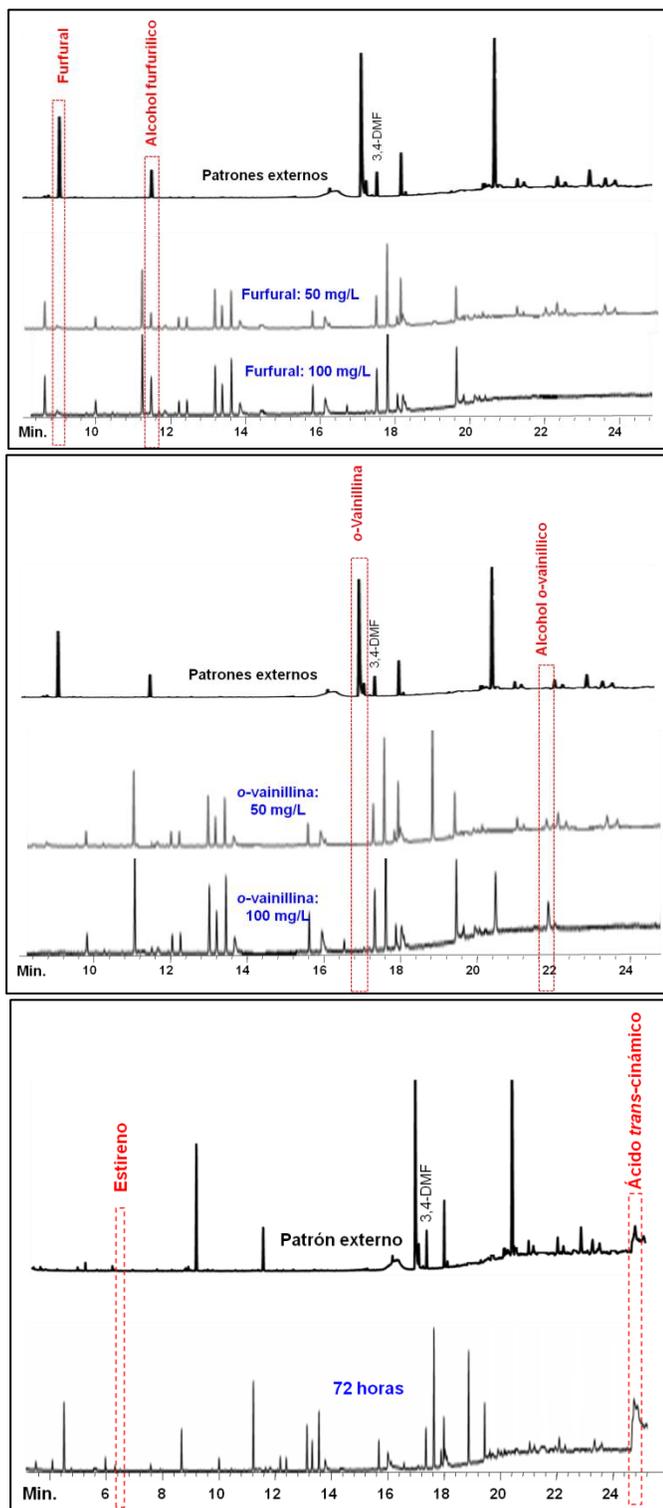


Fig. 2 Cromatogramas obtenidos tras las fermentaciones en presencia de furfural, *o*-vainillina y ácido *trans*-cinámico, e identificación de sus derivados metabólicos (alcohol furfurílico, alcohol *o*-vainílico y estireno, respectivamente) producidos mediante bioconversión por *S. cerevisiae*.

La Tabla 2 muestra las concentraciones de furfural residual tras las fermentaciones, y la cantidad de alcohol furfurílico producido. Los valores de bioconversión son comparables a los obtenidos por Díaz de Villegas et al. [19],

quienes determinaron porcentajes de producción de alcohol furfurílico por *S. cerevisiae* en torno al 70% a partir del furfural añadido. Así mismo, se observa un incremento en la bioconversión a medida que se incrementa la dosis de furfural, lo cual estaría relacionado con el aumento de la capacidad metabólica de la levadura para detoxificar el medio, activando otros mecanismos como el Ciclo de Krebs [10,27] y la vía de las pentosa fosfato (PPP) para generar NADH y NADPH, respectivamente, como poder reductor extra [10,28].

TABLA 2
FURFURAL RESIDUAL Y ALCOHOL FURFURÍLICO PRODUCIDO TRAS LAS FERMENTACIONES. MEDIA \pm DESVIACIÓN ESTÁNDAR (N = 4).

Furfural añadido (mg/L)	Furfural residual (mg/L)	Alcohol furfurílico (mg/L)	Furfural residual (%) *	Tasa de bioconversión (%) **
0	-	-	-	-
50	0.26 \pm 0.01	37.47 \pm 1.40	0.52	74.95
100	0.29 \pm 0.13	75.19 \pm 1.14	0.29	75.19
200	0.23 \pm 0.01	159.5 \pm 2.58	0.12	79.75

* Cantidad residual en base al furfural añadido al medio.

** Alcohol furfurílico producido a partir del furfural añadido.

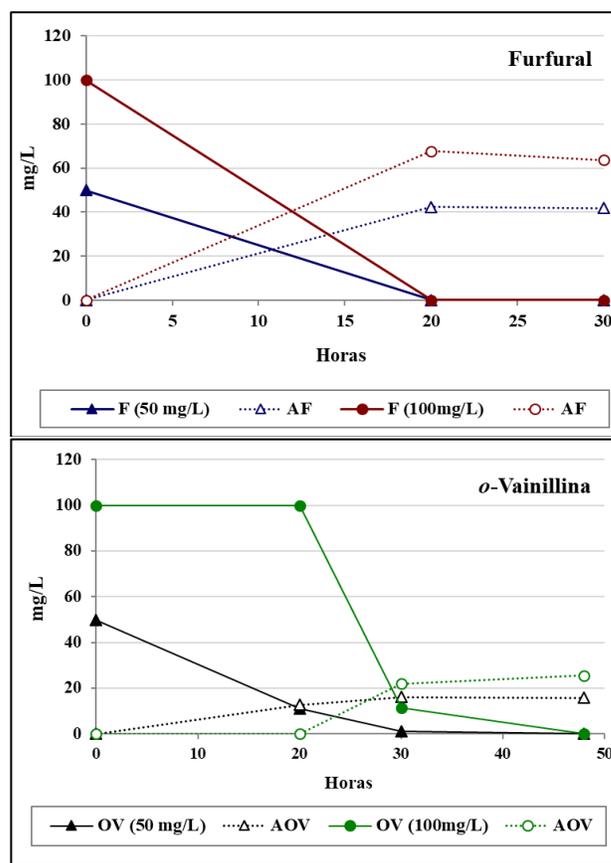


Fig. 3 Bioconversión de furfural (F) y *o*-vainillina (OV) en sus alcoholes derivados alcohol furfurílico (AF) y alcohol *o*-vainílico (AOV), respectivamente, por *S. cerevisiae*.

La Figura 3 muestra que el furfural fue metabolizado completamente a las 20 horas, mientras que la *o*-vainillina requirió de hasta 48 horas, con producciones de alcohol *o*-

vainílico en torno al 32 y 25% a partir de dosis de 50 y 100 mg/L de *o*-vainillina, respectivamente.

La bibliografía no reporta tasas de bioconversión de *o*-vainillina en alcohol *o*-vainílico, no obstante, existen referencias sobre la bioconversión de vainillina en alcohol vainílico por *S. cerevisiae*, a tasas de 100, 69, 41 y 2% a partir de 150, 750, 1500 y 2250 mg/L de vainillina, respectivamente, tras 24 horas de fermentación [20]. De modo que las menores tasas de producción de alcohol *o*-vainílico obtenidas en nuestro estudio (32 y 25%) indicarían un mayor efecto inhibitorio de la *o*-vainillina sobre *S. cerevisiae*, acorde con reportes previos respecto a un mayor efecto inhibitorio con compuestos vainílicos que con compuestos furánicos [3,29].

B. EFECTO DE LOS INHIBIDORES METABÓLICOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Efecto sobre la producción de acetaldehído

Previamente [8] mostramos 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. La presencia de acetaldehído en altas concentraciones indica un efecto de los inhibidores sobre la enzima ADH, dado que como mecanismo de adaptación la levadura utiliza esta enzima para convertir el furfural en alcohol furfúrico [10], o la *o*-vainillina en alcohol *o*-vainílico [3,20], en detrimento de la conversión de acetaldehído a etanol, produciendo por tanto la acumulación de acetaldehído.

Efecto sobre la producción de glicerina

La glicerina se forma para mantener el equilibrio redox intracelular, mediante la producción de NAD⁺ a partir de la reoxidación del NADH citosólico. El NADH es el cofactor requerido por *S. cerevisiae* para reducir el acetaldehído a etanol, así como para reducir los inhibidores metabólicos en sus alcoholes derivados [1].

Los resultados obtenidos (Figura 4) evidencian que el ácido *trans*-cinámico inhibe la producción de glicerina por la cepa 7VA, y a diferentes concentraciones de azúcares en el medio fermentativo. En el medio con 10.0 % GAP el ácido *trans*-cinámico a 50 y 100 mg/L inhibe la producción de glicerina en 0.62 y 0.67 g/L, respectivamente. Los otros inhibidores no muestran un efecto significativo (prueba DSH de Tukey). Mientras que en el medio con 14.1 % GAP (resultados mostrados en nuestro anterior trabajo [8]), las mismas dosis de ácido *trans*-cinámico (50 y 100 mg/L) inhiben significativamente la producción de glicerina (0.77 y 1.23 g/L, respectivamente). Además, en el medio con 14.1 % GAP se obtuvo un efecto de la *o*-vainillina, que a dosis de 50 y 100 mg/L inhibió la producción de glicerina en 0.71 y 0.57 g/l, respectivamente.

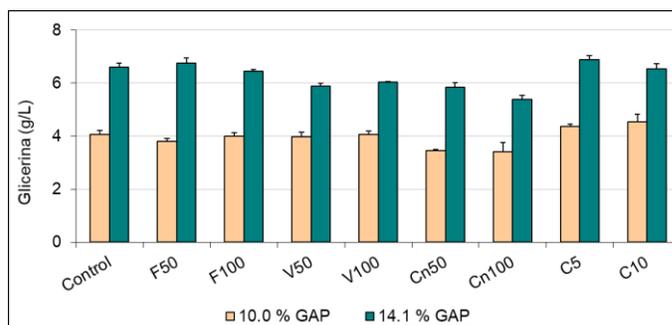


Fig. 4 Producción de glicerina por *S. cerevisiae* en presencia de furfural (F), *o*-vainillina (V), ácido *trans*-cinámico (Cn) y cobre (C) a diferentes niveles de azúcares (% GAP) en el medio. Dosis de inhibidores: F50 indica 50 mg/L de furfural.

Previamente se ha demostrado una mayor afinidad hacia el NADH por la enzima ADH (responsable de reducir furfural a alcohol furfúrico) que por la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH, responsable de reducir dihidroxiacetona fosfato y producir glicerina), generándose una inhibición de tipo competitiva, lo cual podría generar una menor producción de glicerina en presencia de inhibidores metabólicos [22].

Efecto sobre la producción de compuestos volátiles fermentativos

En ambos medios fermentativos (10.0 y 14.1 % GAP) el mayor efecto de los inhibidores metabólicos fue observado en la producción de algunos alcoholes superiores, como se muestra en la Figura 5. Mientras que la producción de los demás compuestos volátiles evaluados (ésteres, acetoína y diacetilo), no se vio afectada (datos no mostrados).

El efecto más evidente fue el incremento del 2,3-butanodiol, sobre todo en presencia de *o*-vainillina y ácido *trans*-cinámico (prueba DSH de Tukey), fenómeno que estaría relacionado al mecanismo de producción de metabolitos neutros para prevenir la acidificación celular [21], especialmente en presencia de ácido *trans*-cinámico; así como la regeneración del exceso de poder reductor asociado a la glicolisis para regular el ratio NADH/NAD⁺ [30], en concordancia con el descenso en la producción de glicerina (Figura 4), debido a una competencia por el poder reductor (NADH) entre las enzimas GPDH y acetoína reductasa [31], claves en la formación de glicerina y 2,3-butanodiol, respectivamente.

Otro de los alcoholes que incrementa su producción en presencia de los inhibidores metabólicos, especialmente *o*-vainillina y ácido *trans*-cinámico, es el propanol. Mientras que la producción de isobutanol, 2-feniletanol y los alcoholes amflicos (2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol) disminuyeron significativamente en presencia de *o*-vainillina y ácido *trans*-cinámico (prueba DSH de Tukey).

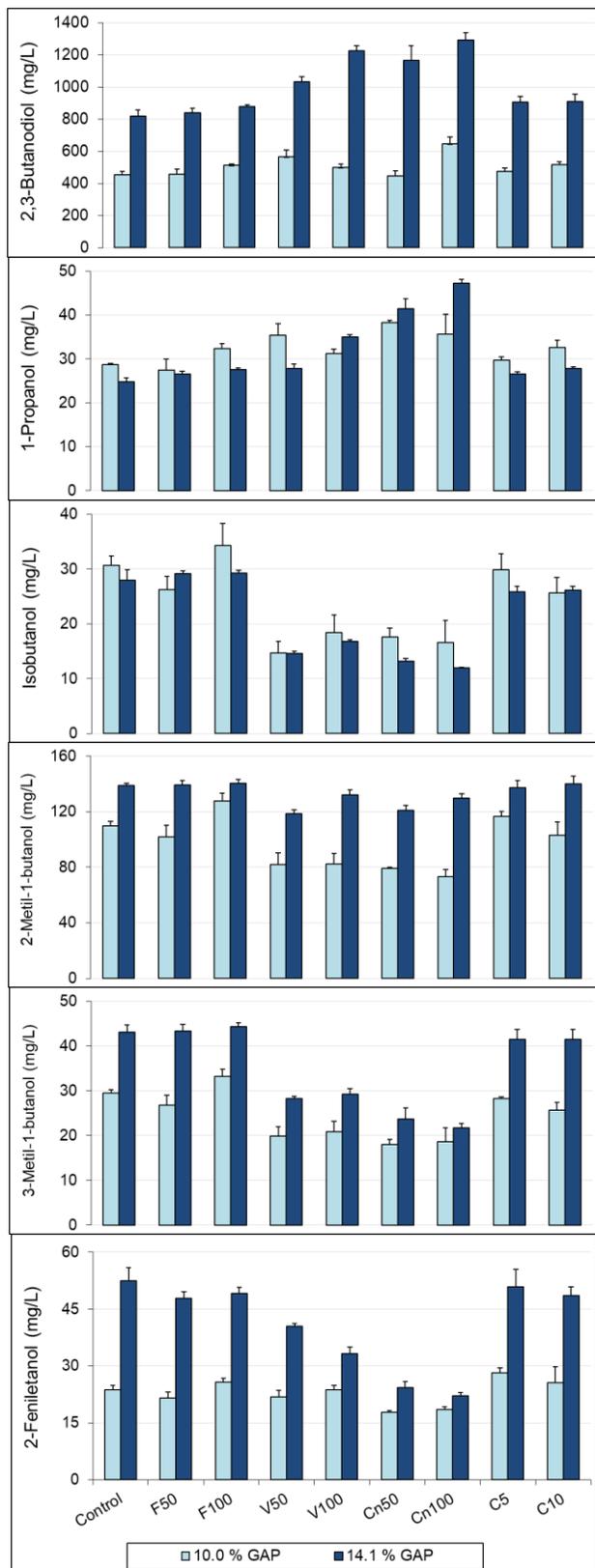


Fig. 5 Efecto de los inhibidores metabólicos sobre la producción de alcoholes superiores por *S. cerevisiae* en presencia de furfural (F), *o*-vainillina (V), ácido *trans*-cinámico (Cn) y cobre (C) a diferentes niveles de azúcares (% GAP) en el medio. Dosis de inhibidores: F50 indica 50 mg/L de furfural.

Finalmente, de acuerdo a nuestros resultados, la naturaleza química de los inhibidores metabólicos es determinante con respecto a su efecto sobre la producción de compuestos volátiles, lo cual se refleja mediante el análisis multiparamétrico usando funciones discriminantes mostrado en la Figura 6, el cual separa claramente las fermentaciones dosificadas con cobre (medio con 10.0 % GAP) y *o*-vainillina y ácido *trans*-cinámico (medios con 10.0 y 14.1 % GAP), lo que indica además el efecto en función del nivel de azúcares en el medio fermentativo.

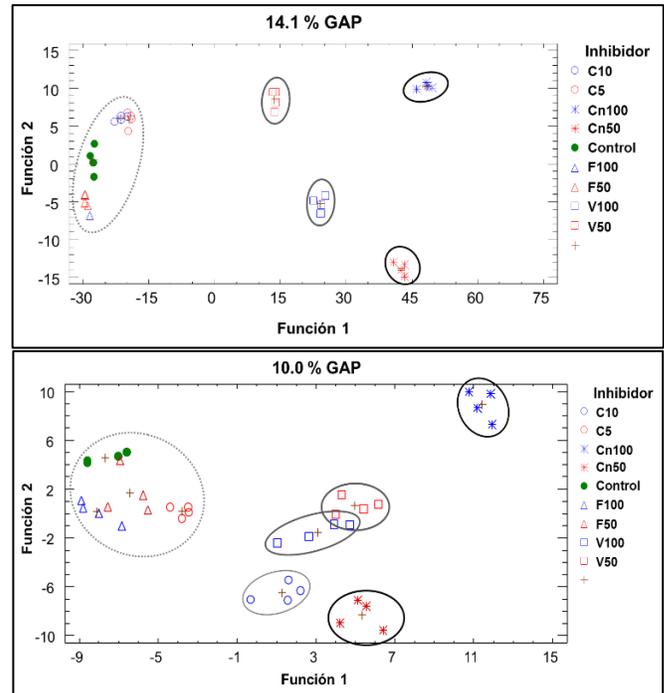


Fig. 6 Análisis discriminante ($p < 0.05$) para la producción de compuestos volátiles fermentativos por *S. cerevisiae* en presencia de furfural (Δ), *o*-vainillina (\square), ácido *trans*-cinámico ($*$) y cobre (\circ) a diferentes niveles de azúcares (% GAP) en el medio. Dosis de inhibidores: F50 indica 50 mg/L de furfural.

IV. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, la cepa 7VA de *S. cerevisiae* mostró una buena actividad para convertir furfural y *o*-vainillina en sus derivados alcohol furfúrico y alcohol *o*-vainílico, respectivamente, detectados en los respectivos medios tras el proceso fermentativo. Se ha podido evidenciar que los inhibidores metabólicos evaluados causan un redireccionamiento de la ruta fermentativa, modificando la producción de metabolitos secundarios. Se ha encontrado que la producción de glicerina disminuye en presencia de *o*-vainillina y ácido *trans*-cinámico. Por su parte, la producción de compuestos volátiles fermentativos se ve modificada significativamente, especialmente de algunos alcoholes superiores, observando un incremento del 2,3-butanodiol y 1-propanol, mientras que el isobutanol, 2-feniletanol y los alcoholes amílicos (2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol) pueden disminuir. Finalmente, de acuerdo con el análisis discriminante aplicado, la naturaleza química de los

inhibidores metabólicos es determinante respecto a su efecto sobre la producción de compuestos volátiles fermentativos, observando un claro efecto en el caso de la *o*-vainillina y el ácido *trans*-cinámico, y en menor medida del cobre.

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo experimental del trabajo se hizo 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). Ricardo Vejarano y Angie Gil-Calderón agradecen a la Universidad Privada del Norte (UPN), por obtener financiamiento a través del proyecto UPN-20191001: Valorización de principios bioactivos y desarrollo de nuevas aplicaciones de excedentes y residuos agroindustriales.

REFERENCIAS

[1] 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.

[2] 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.

[3] 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.

[4] Nguyen, T.T.M., Kitajima, S., Izawa, S. 2014. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) for vanillin tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(3): 263-269.

[5] Sun, X., Liu, L., Zhao, Y., Ma, T., Zhao, F., Huang, W., Zhan, J. 2016. Effect of copper stress on growth characteristics and fermentation properties of *Saccharomyces cerevisiae* and the pathway of copper adsorption during wine fermentation. *Food Chemistry*, 192: 43-52.

[6] 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.

[7] Brandolini, V., Tedeschi, P., Capece, A., Maietti, A., Mazzotta, D., Salzano, G., Paparella, A., Romano, P. 2002. *Saccharomyces cerevisiae* wine strains differing in copper resistance exhibit different capability to reduce copper content in wine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18: 499-503.

[8] Vejarano, R., Gil-Calderón, A., Morata, A. 2018. Effect of metabolic inhibitors on the alcoholic fermentation: Tolerant yeasts. *Proceedings of the LACCEI International Multi-conference for Engineering, Education and Technology*, 171.

[9] 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.

[10] 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.

[11] Callejas, E. y Gasca, V. 2009. Los biocombustibles. *El Cotidiano*, (157): 75-82.

[12] 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.

[13] 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.

[14] García-Esparza, M.A., Capri, E., Pirzadeh, P., Trevisan, M. 2006. Copper content of grape and wine from Italian farms. *Food Additives and Contaminants*, 23(3): 274-280.

[15] OIV. 2018. International Code of Oenological Practices. *International Organization of Vine and Wine (OIV)*. Paris. France.

[16] EC No. 1410/2003. Official Journal of the European Union. Commission Regulation (EC) No. 1410/2003 of 7 August 2003 amending Regulation (EC) No. 1622/2000 laying down certain detailed rules for implementing Council Regulation (EC) No. 1493/1999 on the common organisation of the markets in wine and establishing a Community code of oenological practices and processes.

[17] Stohs, S.J., Bagchi, D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 18: 321-336.

[18] Shanmuganathan, A., Avery, S., Willetts, S., Houghton, J. 2004. Copper-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* targets enzymes of the glycolytic pathway. *FEBS Letters*, 556: 253-259.

[19] Díaz de Villegas, M.E., Villa, P., Guerra, M., Rodríguez, E., Redondo, D., Martínez, A. 1992. Conversion of furfural into furfuryl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biotechnologica*, 12: 351-354.

[20] 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.

[21] Nakashimada, Y., Marwoto, B., Kashiwamura, T., Kakizono, T., Nishio, N. 2000. Enhanced 2,3-butanediol production by addition of acetic acid in *Paenibacillus polymyxa*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90: 661-664.

[22] Palmqvist, E., Almeida, J.S., Hahn-Hägerdal, B. 1999. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 62: 447-454.

[23] Vejarano, R. (2018). *Saccharomyces ludwigii*, control and potential uses in winemaking processes. *Fermentation*, 4(3): 71.

[24] Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M.A., Morata, A., Tesfaye, W., Uthurry, C., Villa, A., Cintora, I., Suárez-Lepe, J.A. 2014. Influence of sequential fermentation with *Torulasporea delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT-Food Science and Technology*, 59: 915-922.

[25] 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.

[26] Morata, A., Vejarano, R., Ridolfi, G., Benito, S., Palomero, F., Uthurry, C., Tesfaye, W., González, C., Suárez-Lepe, J.A. 2013. Reduction of 4-ethylphenol production in red wines using HCDC+ yeasts and cinnamyl esterases. *Enzyme and Microbial Technology*, 52(2): 99-104.

[27] 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.

[28] 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.

[29] Lee, W.G., Lee, J.S., Shin, C.S., Park, S.C., Chang, H.N., Chang, Y.K. 1999. Ethanol production using concentrated oak wood hydrolysates and methods to detoxify. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77-79: 547-59.

[30] Celińska, E., Grajek, W. 2009. Biotechnological production of 2,3-butanediol. Current state and prospects. *Biotechnology Advances*, 27(6): 715-725.

[31] Remize, F., Roustan, J.L., Sablayrolles, J.M., Barre, P., Dequin, S. 1999. Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 143-149.