

**Caracterización de levaduras autóctonas en la capacidad
de tolerar inhibidores y desarrollar a altas temperaturas
para su potencial uso biotecnológico**

NOELIA PAOLA ROJO

LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO
Provincia de Mendoza, Argentina
(FECHA)

Caracterización de levaduras autóctonas en la capacidad de tolerar inhibidores y desarrollar a altas temperaturas para su potencial uso biotecnológico

Tesista:

Brom. Noelia Paola Rojo
brom.noerojo@gmail.com

Director de tesis:

Dra. María Cecilia Rojo
rojo.cecilia@inta.gob.ar

Co-Director de Tesis:

Dra. Mariana Combina
combina.mariana@inta.gob.ar

Presidente Comité evaluador: Dra. Lic. Brom. Adriana GIMÉNEZ

Vocales: Lic. Brom. María Eugenia MARTÍNEZ
Lic. Brom. Marcela BERNARDI

Suplente: Lic. Brom. Lucía BECERRA

RESUMEN

La creciente necesidad de desarrollar procesos sostenibles ha impulsado el aprovechamiento de biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol. Entre los subproductos con alto potencial de revalorización se encuentra el orujo de uva, un residuo agroindustrial generado en grandes volúmenes por la industria vitivinícola argentina. Su utilización como sustrato para la producción de bioetanol demanda la selección de levaduras capaces de tolerar las condiciones adversas derivadas del pretratamiento de la biomasa, incluyendo la presencia de inhibidores y temperaturas elevadas compatibles con procesos de sacarificación y fermentación simultánea.

El objetivo del presente estudio fue identificar levaduras autóctonas con capacidad de tolerar inhibidores del crecimiento y altas temperaturas, con potencial aplicación en la producción de bioetanol a partir de orujo de uva. Para ello, se evaluó la tolerancia de 31 cepas aisladas de orujos a inhibidores individuales y combinados, así como su crecimiento a diferentes temperaturas (28 °C, 35 °C y 40 °C). Los ensayos se realizaron en medios de cultivo suplementados con concentraciones crecientes de distintos inhibidores: ácido acético (0,37; 0,65 y 3,30 g/L), hidroximetil-furfural (HMF) (0,06; 0,34 y 0,68 g/L), furfural (0,04; 0,054 y 0,09 g/L) y compuestos fenólicos (0,25; 0,625 y 1,25 g/L). Se utilizaron técnicas de *replica plate* y medición de densidad óptica para evaluar el crecimiento, y los datos fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de Kruskal-Wallis utilizando el software estadístico Infostat.

La condición más restrictiva correspondió a la combinación de altas concentraciones de ácido acético y compuestos fenólicos, sin embargo, la mayoría de las levaduras mostró tolerancia a HMF y furfural, incluso en concentraciones elevadas. A 35 °C, se observó una reducción significativa del crecimiento, y ninguna cepa fue capaz de desarrollarse a 40 °C. Dos cepas destacaron por su tolerancia a inhibidores individuales y combinados, incluyendo altas temperaturas (35°), entre las cuales se encuentran los aislados TT1 y InenB25 que deben ser identificadas por biología molecular por haber mostrado mayor tolerancia a las condiciones evaluadas. Estos resultados permiten seleccionar levaduras autóctonas con características deseables para procesos de producción de bioetanol a partir de orujo de uva, resaltando su tolerancia a inhibidores y su capacidad de crecimiento a temperaturas compatibles con condiciones industriales. La selección de estas cepas es fundamental para optimizar procesos biotecnológicos sostenibles orientados al aprovechamiento de subproductos agroindustriales en el marco de una economía circular.

PALABRAS CLAVES: Orujo de uva, inhibidores químicos, bioetanol, levaduras, economía circular.

ABSTRACT

The growing need to develop sustainable processes has driven the utilization of lignocellulosic biomass for bioethanol production. Among the agro-industrial by-products with high valorization potential is grape pomace, a residue generated in large quantities by the Argentine wine industry. Its use as a substrate for bioethanol production requires the selection of yeast strains capable of tolerating adverse conditions derived from biomass pretreatment, including the presence of inhibitors and elevated temperatures compatible with simultaneous saccharification and fermentation processes.

The aim of the present study was to identify native yeasts capable of tolerating growth inhibitors and high temperatures, with potential application in bioethanol production from grape pomace. To this end, the tolerance of 31 yeast strains isolated from grape pomace was evaluated against individual and combined inhibitors, as well as their growth at different temperatures (28 °C, 35 °C, and 40 °C). The assays were conducted in culture media supplemented with increasing concentrations of different inhibitors: acetic acid (0.37, 0.65, and 3.30 g/L), hydroxymethylfurfural (HMF) (0.06, 0.34, and 0.68 g/L), furfural (0.04, 0.054, and 0.09 g/L), and phenolic compounds (0.25, 0.625, and 1.25 g/L). Growth was assessed using replica plate techniques and optical density measurements, and data were statistically analyzed using the Kruskal–Wallis test with the Infostat statistical software.

The most restrictive condition corresponded to the combination of high concentrations of acetic acid and phenolic compounds. However, most yeasts exhibited tolerance to HMF and furfural, even at elevated concentrations. At 35 °C, a significant reduction in growth was observed, and no strain was able to grow at 40 °C. Two strains stood out for their tolerance to both individual and combined inhibitors, including high temperatures (35 °C). Among them, isolates TT1 and InenB25 should be identified by molecular biology, as they exhibited the highest tolerance to the evaluated conditions.

These findings enable the selection of native yeasts with desirable traits for bioethanol production from grape pomace, highlighting their tolerance to inhibitors and ability to grow at temperatures compatible with industrial processes. The selection of such strains is essential for optimizing sustainable biotechnological processes aimed at the valorization of agro-industrial by-products within a circular bioeconomy framework.

KEYWORDS: Grape pomace, Chemical inhibitors, Bioethanol, Yeasts, Circular economy

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres, por inculcarme los valores necesarios para realizar y transitar este camino, por su apoyo incondicional durante todo este proceso. Gracias por creer en mí y motivarme.

Agradezco profundamente a los docentes que me acompañaron y brindaron su apoyo, confianza y orientación sobre todo en momentos difíciles.

Agradezco mi directora de tesis y codirectora por su acompañamiento, orientación y por compartir con generosidad sus conocimientos. Su guía fue fundamental para el desarrollo y la concreción de este trabajo.

A mis amigas/os y compañeras/os, por su compañía, contención, sus palabras de aliento, motivación y por hacer más liviano y agradable este recorrido.

A la Vida, por cada aprendizaje, cada desafío y cada persona que puso en mi camino para llegar hasta aquí, al Universo y a mis guías por inspirarme a continuar, por recordarme que todo aprendizaje tiene un propósito y que cada desafío es una oportunidad de crecimiento.

Este trabajo es fruto no solo del esfuerzo y dedicación académica, sino también de un camino de transformación personal que me permitió madurar e integrar conocimiento, consciencia y alma.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Materias primas utilizadas para la producción de bioetanol.....	8
1.1.1. Materias primas que contienen lignocelulosa	8
1.1.1.1. Subproducto de la industria vitivinícola: Orujo de uva	9
1.2. Obtención de etanol a partir de materiales lignocelulósicos	12
1.2.1. Descripción de diferentes alternativas de pretratamiento de materias primas que contienen lignocelulosa.....	13
1.2.1.1. Pretratamiento físico	13
1.2.1.2. Pretratamiento químico	14
1.2.1.3. Pretratamiento fisicoquímico	14
1.2.1.4. Pretratamiento biológico	14
1.2.2. Hidrólisis Enzimática	15
1.2.3. Fermentación	15
2. Compuestos tóxicos generados en los pretratamientos y sus efectos sobre los microorganismos	17
2.1. Mecanismos de inhibición de compuestos generados durante los pretratamientos de la biomasa lignocelulósica	17
3. Levaduras termotolerantes, resistentes a inhibidores y etanologénicas	19
2. OBJETIVOS	21
Objetivo General.....	21
Objetivos específicos	21
3. HIPÓTESIS	21
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1. Microorganismos.....	21
4.2 Medios y activación de las levaduras	23
4.3 Caracterización de las levaduras en relación con la tolerancia a diferentes inhibidores del crecimiento y desarrollo a elevadas temperaturas.	23
4.3.1. Evaluación de la tolerancia de las levaduras a inhibidores.	24
4.3.2. Evaluación de la capacidad de las levaduras para crecer a elevadas temperaturas	24
4.3.3. Evaluación de la tolerancia de las levaduras a la combinación de diferentes inhibidores y a diferentes temperaturas.	25

4.4. Evaluación de resultados y selección de levaduras.....	26
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
5.1. Evaluación de la tolerancia de las levaduras a inhibidores	26
5.2. Evaluación del crecimiento de las levaduras en elevadas temperaturas	31
5.3. Evaluación de la tolerancia de las levaduras a la combinación de diferentes inhibidores a diferentes temperaturas.	32
6. CONCLUSIONES	38
7. BIBLIOGRAFÍA.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del orujo de uva calculado sobre base seca.....	10
Tabla 2. Levaduras autóctonas evaluadas en el presente estudio.....	22
Tabla 3. Inhibidores del crecimiento microbiano y sus concentraciones.	24
Tabla 4. concentraciones de los inhibidores del crecimiento microbiano y las combinaciones evaluadas.....	25
Tabla 5. Diferencias en el crecimiento entre aislados microbianos mediante Test Kruskal Wallis.....	30
Tabla 6. Crecimiento de las cepas en diferentes combinaciones de los inhibidores en las dos temperaturas.	33
Tabla 7. Diferencias estadísticas según el test de Kruskal Wallis ($p > 0,05$) para las diferentes combinaciones evaluadas a 28 °C.....	35
Tabla 8. Crecimiento de levaduras en diferentes combinaciones de inhibición.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Posibles métodos de revalorización del orujo de uva a través de la economía circular.	12
Figura 2. a) Peine para <i>replica plate</i> b) Placa multipocillo c) Esquema de diseño de siembra.....	23
Figura 3. Diseño de siembra utilizado en la metodología de <i>screening</i>	26
Figura 4. Crecimiento en <i>replica plate</i> de las levaduras en presencia de diferentes concentraciones de inhibidores.....	27
Figura 5. Tolerancia de levaduras a diferentes concentraciones de inhibidores microbianos.	29
Figura 6. Evaluación del crecimiento de levaduras a diferentes temperaturas	31

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se ha incrementado el uso de la biomasa, en particular la derivada de residuos agrícolas, para la producción de bioetanol y de otros productos químicos, convirtiéndose en uno de los puntos clave en el desarrollo sostenible (Rea Rosero et al., 2022).

El bioetanol es uno de los productos más interesantes por su impacto positivo en el medio ambiente. Actualmente, se produce principalmente a partir de materias primas que contienen azúcar y almidón. Sin embargo, varios tipos de biomasa lignocelulósica disponibles, como residuos agrícolas y forestales, y los cultivos energéticos herbáceos podrían servir como materia prima para la producción de bioetanol, energía, calor y productos químicos de valor añadido. La lignocelulosa es una mezcla compleja de carbohidratos, que necesita un pretratamiento eficiente para hacer accesibles a las enzimas para la producción de azúcares fermentables, que después de la hidrólisis se fermentan en etanol. A pesar de dificultades técnicas y económicas, las materias primas lignocelulósicas renovables representan materias primas que no compiten con la cadena alimentaria y de piensos, estimulando así la sostenibilidad (Bušić et al., 2018).

1.1. Materias primas utilizadas para la producción de bioetanol

Diferentes tipos de biomasa tienen potencial como materia prima para la producción de bioetanol. Debido a su composición química, es decir, fuentes de carbohidratos, forman principalmente tres grupos: (i) materias primas que contienen azúcar: remolacha azucarera, caña de azúcar, melaza, suero, sorgo dulce, (ii) materias primas que contienen almidón: cereales como maíz, trigo, tubérculos como la yuca, y (iii) biomasa lignocelulósica: paja, desechos agrícolas, residuos de cosechas y madera (Mussatto et al., 2010).

Sin embargo, estas materias primas que contienen azúcar y almidón (primera generación) compiten con su uso como alimento o pienso, influyendo así en su oferta. Por lo tanto, la biomasa lignocelulósica (segunda generación) representa una materia prima alternativa para la producción de bioetanol debido a su bajo costo, disponibilidad, amplia distribución y no es competitiva con los cultivos alimentarios y forrajeros. (Tomás-Pejó et al., 2011)

El aprovechamiento de los residuos industriales es un eje prioritario dentro de las acciones para la disminución del impacto ambiental y para contribuir a la economía circular.

1.1.1. Materias primas que contienen lignocelulosa

La producción de bioetanol a partir de materias primas que contienen lignocelulosa es atractiva y sostenible porque la biomasa lignocelulósica es renovable y no competitiva con cultivos alimenticios. Además, el uso de bioetanol obtenido de la biomasa lignocelulósica está relacionado con la considerable reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero (Binod et al., 2010). La biomasa lignocelulósica está

distribuida casi por igual en la Tierra, en comparación con los recursos fósiles, lo que proporciona seguridad de suministro mediante el uso de fuentes de energía domésticas (Soccol et al., 2010).

La biomasa, proveniente de diversas fuentes como plantas, residuos agrícolas y forestales, así como también de industrias y desechos municipales, puede ser utilizada para la producción de bioetanol celulósico (Ling et al., 2008; Senthilkumar et al., 2009). La composición de la biomasa lignocelulósica varía según su materia prima, siendo sus componentes principales los complejos de celulosa-hemicelulosa encapsulados en lignina, junto con azúcares hexosa y pentosa derivados de estas fracciones (Jobling et al., 2004). La lignina, compuesta por compuestos fenólicos, puede ser aprovechada para obtener productos de alto valor añadido (Solomon et al., 2007).

Los materiales que contienen lignocelulosa para la producción de bioetanol forman cuatro grupos principales: **residuos de cultivos** (bagazo de caña y sorgo dulce, rastrojos de maíz, diferentes tipos de paja, cascarillas de arroz, huesos, pulpa de olivo, orujo de uva, madera dura, madera blanda (pino, abeto), **residuos de celulosa** (por ejemplo, papel usado y reciclado), **biomasa herbácea** (heno de alfalfa, pasto varilla y otros tipos de pastos) y **desechos sólidos municipales** (Palmqvist et al., 2000; Favaro et al., 2019).

1.1.1.1. Subproducto de la industria vitivinícola: Orujo de uva

La uva es una de las frutas más reconocidas a nivel mundial, siendo transformada en diversos productos alimenticios, entre los cuales destaca el vino. Una parte considerable de la producción de uva se destina exclusivamente a la vinificación, un proceso industrial que genera cantidades significativas de subproductos. El orujo de uva, compuesto por pieles, semillas y tallos resultantes del prensado de la uva, es considerado el principal subproducto de la elaboración del vino (Kokkinomagoulos & Kandyliis, 2023).

Argentina es el primer productor de vinos en Latinoamérica y el quinto mayor productor del mundo según la Organización Internacional de la Vid y el Vino (OIV, 2021). Según registros del Instituto Nacional de Vitivinicultura, en el año 2024 en Argentina se destinaron a la vinificación aproximadamente 18 millones de quintales de uva, de las cuales, en la provincia de Mendoza se vinificaron alrededor de 12 millones de quintales (INV, 2024).

En el caso de la República Argentina, de acuerdo con la producción anual de vinos y considerando que aproximadamente el 20 % del peso de la uva procesada constituye el orujo, se estima que la producción del año 2024, fue de 384.000 toneladas de este tipo de residuo. Por otro lado, realizando la misma estimación según los valores otorgados por el INV, en Mendoza, la producción de orujo fue de un total aproximado de 60 mil toneladas en el año 2024.

En la República Argentina, se ha estimado que sólo la provincia de Mendoza produce anualmente 141.000 toneladas de este residuo (FAO, 2017). Según la Directiva Marco sobre Residuos del Parlamento Europeo (Directiva 2008/98/CE), la prevención de residuos debe ser la prioridad principal en la gestión de residuos, favoreciendo la reutilización y el reciclaje sobre la valorización energética de los mismos.

Tradicionalmente, el orujo de uva se utiliza para la producción de destilados (grapa), como alimento para animales y fertilizante, y se ha comenzado a estudiar como materia prima para la producción de bioetanol o como fuente de compuestos fenólicos bioactivos (Cáceres et al., 2012; Fontana et al., 2013; Law & Gutierrez, 2013; Toscano et al., 2013).

La variedad de estrategias utilizadas para aprovechar el orujo de uva muestra su alto potencial de revalorización, con estudios en diversas categorías de alimentos y productos industriales. A pesar de ello, se señala la falta de un marco legislativo integral para el uso del orujo de uva en alimentos, así como la necesidad de estudios exhaustivos sobre su costo de revalorización y métodos de extracción de compuestos valiosos de manera ecológica y de calidad alimentaria (Jofre et al., 2022).

La composición química del orujo de uva se puede ver afectada por diferentes factores tales como cultivar, condiciones climáticas, técnicas de cultivo, métodos de elaboración del vino y otros (Zacharof, 2017; AntoniĆ et al., 2020;). Lo más importante es que la co-fermentación del mosto de uva durante la elaboración del vino tinto, que es la principal diferencia entre la elaboración del vino tinto y el blanco, contribuye en gran medida a la variación de la composición del orujo de uva, presentando un desafío importante para su posterior valorización (Jin et al., 2019).

El análisis de la composición química de orujos de uvas rojas y blancas, basado en los estudios que se han realizado, se presenta en la siguiente tabla (tabla 1)

Tabla 1. Composición química del orujo de uva calculado sobre base seca (datos adaptados de Acun & Gül, 2014; Bender et al., 2020; Mohamed Ahmed et al., 2020; AntoniĆ et al., 2020)

Compuesto	Cantidad (g/100 g)	Compuesto	Cantidad (mg/Kg)
Carbohidratos	12,20-40,53	Ash	20450-91000
Fibra Dietaría	17,28-88,70	K	11800-37900
Total			
Fibra Dietaría Insoluble	16,44-63,70	P	120-31570
Fibra Dietaría Soluble	0,72-12,78	Ca	2560-20600
Soluble			
Lignina	23,19-44,50	Mg	700-6440
Glucosa	0,21-26,34	Fe	54-54680
Fructosa	0,38-8,91	Cu	6-2580
Pectina	3,68-4,50	Mn	<0,2-13560
Proteína	5,38-14,41	Zn	14-22510
Nitrógeno Total	1,70-2,42	Na	870-2510
Grasas	1,14-13,90	S	640-1510

Al ser un residuo agroindustrial, el orujo de uva ha sido investigado como una fuente confiable de alimentos. En cuanto a su contenido en azúcar, los orujos de uva tinta y blanca difieren significativamente debido a las diferentes formas en los métodos de vinificación. El orujo de uva tinta contiene menores concentraciones de azúcares solubles (principalmente glucosa y fructosa) debido a la absorción por levaduras durante

la co-fermentación del mosto. Por el contrario, el orujo de uva blanca contiene mayores cantidades de azúcares, por lo que se han propuesto aplicaciones como potenciador del dulzor en productos alimenticios fortificados (Antoničič et al., 2020).

Otro sector donde los subproductos de la vinificación están siendo explorados para su potencial valorización es el de la energía, especialmente en el contexto de los biocombustibles. Los biocombustibles se refieren a aquellos combustibles producidos a partir de fuentes renovables de biomasa, como materiales vegetales. Estos pueden incluir el biodiesel obtenido de aceites vegetales, bioetanol producido mediante fermentación y biogás (Iyyappan et al., 2022). Un estudio realizado por Corbin et al. (2015) investigaron el uso del orujo de uva como fuente de carbohidratos para la producción de bioetanol, logrando rendimientos de hasta 400 litros por tonelada, lo cual es ligeramente superior a otros materiales vegetales lignocelulósicos como la paja de sorgo, la paja de arroz y el bagazo de caña de azúcar. La disponibilidad, el bajo costo y la alta concentración de carbohidratos en estos residuos los convierten en un sustrato ideal (Zeng et al., 2022).

En las próximas décadas, se espera un aumento en la demanda de recursos, tal como lo indican los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la ONU (Goyal et al., 2018). El modelo económico lineal, que se basa en un enfoque de "usar y desechar", ya no es sostenible en términos de oferta y demanda. Este desequilibrio puede dar lugar a una serie de riesgos en los ámbitos social, económico y ambiental. Por ello, se está adoptando un enfoque más sostenible conocido como "modelo de economía circular", que se centra en una gestión y planificación cuidadosa de los recursos a lo largo de la cadena de valor, haciendo uso de logística inversa, técnicas innovadoras e integración de diferentes ecosistemas. Este modelo se basa en el concepto de las "tres R" (reducir, reutilizar, reciclar), y se ha propuesto ampliarlo a las "cuatro R" (agregando recuperar), lo que resulta crucial para la gestión de residuos y la sostenibilidad.

El orujo de uva, como principal subproducto de la vinificación, tiene el potencial de promover la sostenibilidad económica en las bodegas al poder ser reutilizado en diferentes etapas del proceso (figura 1). Además, debido al creciente interés de los consumidores por productos que mejoren la salud, como alimentos con modificaciones nutricionales (bajos en grasas, con fibra añadida, etc.) y alimentos funcionales (según Bimbo et al., 2017), las aplicaciones del orujo de uva se expanden más allá de la vinificación, llegando a la elaboración de nuevos productos alimenticios con posibles propiedades funcionales, lo que introduce el concepto de economía circular.

Desde el punto de vista social, el aprovechamiento de residuos industriales se considera ventajoso, lo que genera un consenso público sobre los beneficios asociados con la protección del medio ambiente.

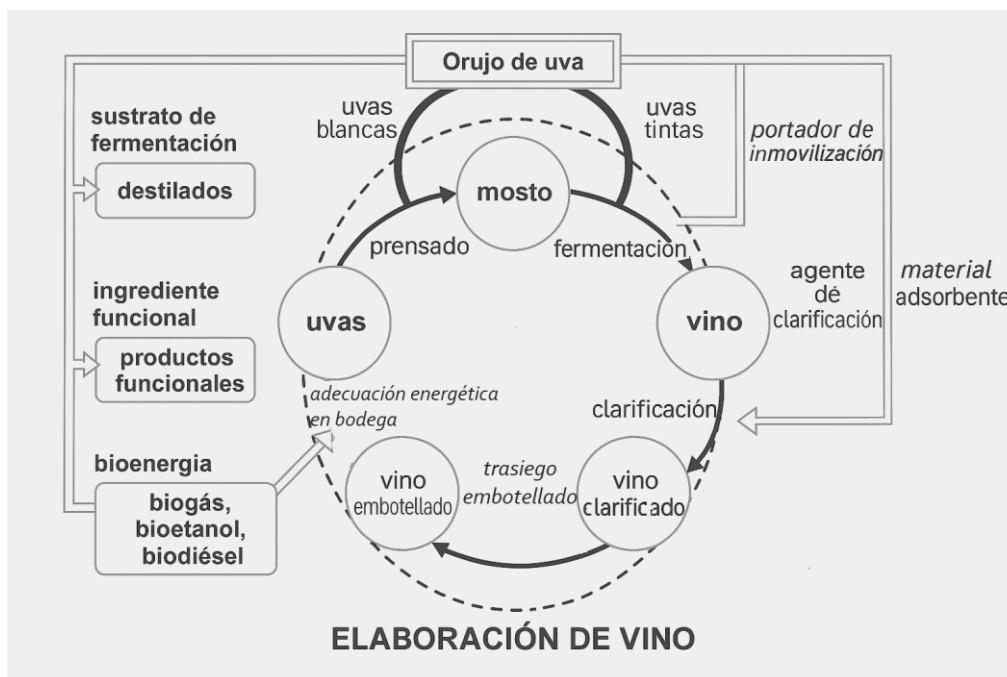


Figura 1. Posibles métodos de revalorización del orujo de uva a través de la economía circular. Figura extraída de Kokkinomagoulos & Kandylis (2023).

1.2. Obtención de etanol a partir de materiales lignocelulósicos

El etanol obtenido a partir de biomasa lignocelulósica es un candidato prometedor como combustible debido a su abundancia y sostenibilidad ambiental. No obstante, el alto costo total del etanol de segunda generación sigue siendo un obstáculo importante que dificulta su viabilidad comercial. La presencia de lignina y la resistencia de la fracción de celulosa a la hidrólisis representan desafíos significativos para la producción de etanol a partir de biomasa celulósica (Favaro et al., 2019).

Debido a la naturaleza recalcitrante de la biomasa, es crucial realizar un tratamiento previo para liberar sus componentes y permitir la hidrólisis y fermentación subsiguientes. Los métodos de pretratamiento se dividen en categorías biológicas, físicas, químicas y fisicoquímicas, cada una con sus ventajas y desventajas específicas, y su elección depende tanto de la fuente de biomasa como de los productos inhibidores resultantes del pretratamiento. El pretratamiento, aunque necesario, consume energía, requiere inversión de capital y a veces implica la generación de compuestos inhibidores/tóxicos durante la degradación de la biomasa. Estos inhibidores incluyen productos químicos, minerales y sales utilizados durante el proceso de pretratamiento, así como también materia orgánica e inorgánica derivada de diversos residuos. Estos desafíos deben ser abordados de manera efectiva para lograr una producción rentable y sostenible de etanol celulósico (Favaro et al., 2019).

El bioetanol producido a partir de materiales lignocelulósicos, también llamado bioetanol de segunda generación se presenta como alternativa de futuro a los biocombustibles de primera generación. Por otro lado, dependiendo de la calidad y cantidad, el bioetanol de segunda generación producido puede destinarse también a industrias farmacéuticas o cosméticas aportando etanol de origen natural (Favaro et al. 2019).

Una de las principales fuentes de hexosas y pentosas es sin duda, la biomasa de tipo lignocelulósico proveniente principalmente de residuos agrícolas, dado a su elevado contenido de celulosa y hemicelulosa. La biomasa lignocelulósica típicamente contiene un 43 % de celulosa, un 27 % de lignina, un 20 % de hemicelulosa y un 10 % de otros componentes. El fraccionamiento de esta biomasa para obtener los polímeros de celulosa y hemicelulosa es un proceso complejo debido al alto contenido de lignina, que dificulta la separación de los polisacáridos para su posterior hidrólisis. Por lo tanto, se necesitan tratamientos físicos, químicos, biológicos o una combinación de estos métodos lo suficientemente robustos para permitir la separación de los polímeros sin generar productos secundarios no deseados (Favaro et al., 2019).

Es por ello, que la mayoría de los procesos de obtención de bioetanol a partir de lignocelulosas, comienzan con un pretratamiento de hidrólisis de la parte hemicelulósica, seguido de una hidrólisis enzimática de la parte celulósica y una fermentación llevada a cabo por levaduras, de los azúcares resultantes (Bothast & Schlicher, 2005). Un pretratamiento ideal permite reducir el contenido de lignina, disminuir la cristalinidad de la celulosa e incrementar el área superficial. Existen, en general, diversos pretratamientos, los cuales se clasifican en función de la forma en que atacan al material lignocelulósico: mecánicos, térmicos, químicos, físico-químicos y biológicos.

1.2.1. Descripción de diferentes alternativas de pretratamiento de materias primas que contienen lignocelulosa

La elección del pretratamiento depende de la naturaleza de la materia prima y de la formación de subproductos durante el tratamiento seleccionado. El pretratamiento, y su elección tiene un gran impacto en todas las etapas posteriores de la producción de bioetanol. Las condiciones extremas utilizadas durante los pretratamientos conducen a la síntesis de compuestos tóxicos, como furfural e HMF, ácidos carboxílicos como ácido acético, fórmico y levulínico, y compuestos fenólicos como aldehídos, cetonas, ácidos p-cumárico y ferúlico. Estos compuestos son inhibidores potenciales de la levadura. Se propusieron estrategias para reducir su impacto en el rendimiento del bioproceso: (i) eliminación de inhibidores mediante extracción con disolventes, intercambio iónico, sobre encalado, uso de zeolitas o enzima lacasa, (ii) uso de cepas de levadura tolerantes a inhibidores, y (iii) selección de un pretratamiento efectivo que cause una mínima degradación del azúcar y mínima formación de inhibidores. La mayoría de los métodos de desintoxicación eliminan sólo parcialmente los inhibidores, pero también contribuyen a la pérdida de azúcar, lo que aumenta aún más los costos del proceso final (Tomás-Pejó et al., 2011).

1.2.1.1. Pretratamiento físico

El pretratamiento físico (mecánico) incluye la molienda por ejemplo molienda con dos rodillos, molienda de bolas o martillos y molienda coloidal o vibroenergética, irradiación rayos gamma, haz de electrones, microondas y otros por ejemplo hidrotermal, expansión, extrusión o métodos de pirólisis. Después de los pretratamientos físicos, la reducción del tamaño de partícula y la cristalinidad de la biomasa lignocelulósica tiene un impacto en el aumento de la superficie específica y la reducción del grado de polimerización (Sung & Cheng, 2002). Sin embargo, el tamaño de las partículas debe optimizarse, las partículas muy pequeñas no son deseables debido al alto consumo de energía durante la molienda y al impacto negativo en el pretratamiento (Talebna et al., 2010).

1.2.1.2. Pretratamiento químico

Los pretratamientos químicos incluyen:

Ácidos (ácido sulfúrico, clorhídrico, fosfórico o nítrico), álcalis (hidróxido de sodio o potasio), amoníaco o sulfito de amonio, o tratamiento con gas (dióxido de cloro, dióxido de nitrógeno o dióxido de azufre) también como adición de agentes oxidantes (oxígeno, ozono, peróxido de hidrógeno), líquidos iónicos (líquidos iónicos a base de imidazolio) y solventes (metanol, etanol, acetona, glicerol, etilenglicol, etc.). El objetivo principal del empleo del pretratamiento ácido es solubilizar la hemicelulosa, haciendo que la celulosa sea más accesible a las enzimas. Los pretratamientos ácidos utilizan ácidos concentrados o diluidos (Tomás-Pejó et al., 2011). Sin embargo, los ácidos concentrados (ácido sulfúrico o ácido clorhídrico) son buenos agentes de hidrólisis con características corrosivas y peligrosas (Sung & Cheng, 2002). La principal desventaja de la hidrólisis ácida es la formación de inhibidores, ya que los azúcares fermentables liberados pueden ser descompuesto en furfural de pentosas e HMF de hexosas. Estos compuestos son inhibidores del crecimiento de células de levadura que tienen un impacto negativo en la eficiencia de la producción de bioetanol por ejemplo, reducción del crecimiento de levadura, rendimiento y productividad de etanol (Kootstra et al., 2010).

Alcalinos (hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio e hidróxido de amonio). En el pretratamiento se aplican temperaturas y presiones más bajas que en otros métodos de pretratamiento (Mosier et al., 2005). El pretratamiento alcalino aumenta la digestibilidad de la celulosa y es más eficaz para la solubilización de lignina (Carvalho et al., 2008). Sin embargo, el alto costo de los álcalis es uno de los principales inconvenientes (Talebnia et al., 2010).

1.2.1.3. Pretratamiento fisicoquímico

Los pretratamientos fisicoquímicos comprenden diversas técnicas, entre ellas la oxidación húmeda, la explosión de vapor, de fibra con amoníaco, con CO₂ o SO₂, el uso de microondas, ultrasonidos y el pretratamiento líquido con agua caliente. La explosión de vapor consiste en tratar la biomasa lignocelulósica con vapor saturado a alta presión y temperatura, seguido de una rápida liberación de la presión, lo que genera una descompresión explosiva del material. Este proceso se realiza generalmente entre 160 y 260 °C, con presiones de 0,69 a 4,83 MPa, durante un corto período de tiempo (de varios segundos a pocos minutos), antes de exponer la biomasa nuevamente a presión atmosférica (Öhgren et al., 2007). Durante este tratamiento, parte de la hemicelulosa y la lignina se degradan. Si bien se considera un pretratamiento económicamente viable, puede provocar la pérdida parcial de xilanos, una disrupción incompleta de la matriz lignina-carbohidratos y la formación de compuestos inhibidores del crecimiento microbiano.

1.2.1.4. Pretratamiento biológico

En comparación con la mayoría de los demás métodos de pretratamiento, los pretratamientos biológicos se consideran más respetuosos con el medio ambiente. Esto se debe a que no requieren el uso de productos químicos, el consumo energético es relativamente bajo, no presentan problemas de corrosión, no generan flujos de residuos y producen la menor cantidad de compuestos inhibidores (Sánchez, 2009). En estos procesos se emplean microorganismos, como los hongos de pudrición blanca, marrón y blanda, que degradan principalmente la lignina y la hemicelulosa. Sin embargo, estos

microorganismos no son eficaces en la degradación de la celulosa (Sánchez, 2009). A pesar de sus ventajas ambientales, una de las principales limitaciones de los pretratamientos biológicos es que la tasa de hidrólisis de la biomasa lignocelulósica es muy baja (Kumar et al., 2009).

1.2.2. Hidrólisis Enzimática

La segunda fase comprende la hidrólisis enzimática, proceso catalizado por enzimas celulasas, cuyo propósito es la degradación de la celulosa. El uso del pretratamiento como se explicaba anteriormente facilita el desarrollo de esta etapa. Cabe destacar que en la mayoría de los procesos existe un primordial interés por los azúcares provenientes de la celulosa, sin embargo, la tendencia actual es el aprovechamiento integral de la biomasa, y en especial de otros azúcares como las pentosas, provenientes de la hemicelulosa, conllevando al uso de enzimas que actúen sobre dichas sustancias como es el caso de las xilanasas (Riaño et al., 2010).

1.2.3. Fermentación

Los hidrolizados obtenidos después del pretratamiento y la hidrólisis enzimática de la lignocelulosa contienen pentosas y hexosas que pueden ser transformadas en etanol mediante fermentación de azúcares.

Para la fermentación de glucosa a etanol se utilizan microorganismos, más frecuentemente *Saccharomyces cerevisiae*. Es capaz de metabolizar mono y disacáridos (por ejemplo, glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa), pero no pentosas (por ejemplo, xilosa y arabinosa). Además, *S. cerevisiae* no es capaz de asimilación directa de celulosa y hemicelulosa (Chu & Lee, 2007). La tecnología del ADN recombinante o los microorganismos fermentadores de pentosas (p. ej. *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* y *Candida shehatae*) se utilizan para superar esta desventaja (Quintero & Cardona, 2011). Estos microorganismos fermentadores de pentosas tienen una tasa de producción de etanol al menos cinco veces menor que la producción de etanol a partir de glucosa por *S. cerevisiae*. Además, la tolerancia al oxígeno y al etanol de estos microorganismos también es de 2 a 4 veces menor (Claassen et al., 1999). Últimamente se han realizado muchos esfuerzos para obtener un microorganismo ideal que sea capaz de producir etanol a partir de cualquier carbohidrato (Kang et al., 2014; Baeyens et al., 2015).

El proceso de fermentación para la producción de bioetanol puede desarrollarse mediante tres estrategias principales:

- i) Hidrólisis y fermentación separadas (HFS), en la cual la hidrólisis del material lignocelulósico y la fermentación de los azúcares resultantes se realizan en etapas y reactores distintos
- ii) Sacarificación y fermentación simultánea (SFS), donde la hidrólisis enzimática y la fermentación ocurren de manera simultánea en un mismo biorreactor, optimizando el tiempo y reduciendo la inhibición por azúcares
- iii) Bioprocesos consolidados (BPC), que emplean microorganismos capaces de realizar tanto la degradación enzimática de los polisacáridos como la fermentación de los azúcares liberados, integrando todas las etapas en un único reactor (Abo et al., 2019).

La sacarificación y fermentación simultánea (SFS) es un proceso óptimo para la producción de etanol a partir de fuentes lignocelulósicas dado que como los procesos de hidrólisis enzimática y fermentación ocurren dentro del mismo biorreactor, esto reduce el costo de producción y los riesgos de contaminación e inhibición enzimática, mejorando el rendimiento de bioetanol (Luo et al., 2008; Abo et al., 2019). Los azúcares liberados por hidrólisis enzimática son inmediatamente utilizados por el microorganismo. La temperatura óptima para SFS de alrededor de 38 °C es un compromiso entre las temperaturas óptimas de hidrólisis (45–50 °C) y fermentación (30 °C). Se puede lograr una mejora de la SFS mediante la selección de enzimas mejoradas y cepas de levadura tolerantes a altas temperaturas (Brethauer & Wyman., 2010). Para utilizar la temperatura de fermentación más cercana a la temperatura óptima de hidrólisis, se han estudiado levaduras y bacterias termotolerantes (Binod y col., 2010).

Las principales ventajas del SFS son: (i) aumento de la tasa de hidrólisis a través de la reducción de la inhibición de la celulasa por los azúcares liberados, (ii) menor demanda de enzimas, (iii) mayor rendimiento de bioetanol, (iv) menor requisito de condiciones estériles, (v) bioproceso más corto, y (vi) menos costoso (Binod et al., 2010; Kang et al., 2014; Haq et al., 2016). Las principales desventajas del SFS son las temperaturas incompatibles de hidrólisis y fermentación, tolerancia microbiana al etanol e inhibición de enzimas por etanol (Quintero & Cardona, 2011)

Los principales factores que obstaculizan las configuraciones actuales de fermentación simultánea son: (i) la presencia de compuestos tóxicos formados durante el pretratamiento que limitan el crecimiento de la levadura, (ii) la utilización incompleta de los azúcares disponibles en la biomasa y (iii) los altos costos asociados con las celulasas comerciales necesarias para la hidrólisis enzimática. Los enfoques tradicionales a menudo incluyen el lavado de los sólidos insolubles en agua para eliminar inhibidores, sin embargo, esto conlleva la pérdida de azúcares solubles, principalmente xilosa (Jobling, 2004).

Aún existe un amplio margen para desarrollar cepas de levadura más tolerantes a los inhibidores, capaces de cofermentar eficientemente tanto la xilosa como la glucosa.

La alta temperatura es una de las condiciones necesarias para la sacarificación y fermentación simultáneas de la biomasa lignocelulósica y puede afectar significativamente a la levadura. El estrés por calor se sabe que altera la estabilidad de las proteínas, la membrana celular y las estructuras del citoesqueleto, lo que conduce a disfunción de las proteínas, desequilibrios metabólicos (Verghese et al., 2012), pérdida de actividad metabólica (Woo et al., 2014) y defectos en la transferencia de ARN de transferencia (ARNt) por acumulación de ARNt aberrante debido a cambios en el procesamiento de intermediarios al cambiar las células a condiciones de alta temperatura (Foretek et al., 2016). La respuesta al choque térmico es una vía citoprotectora fundamental que permite a la levadura hacer frente al estrés por altas temperaturas, mediante la activación de la síntesis de proteínas de choque térmico (HSP) (Verghese et al., 2012).

Una estrategia para mejorar la eficiencia de las enzimas sería encontrar cepas de levadura termotolerantes, capaces de tolerar y fermentar a temperaturas más altas, como 40 °C o más. Se han encontrado cepas de levadura naturales capaces de fermentar glucosa a etanol a 42 °C (Chu & Lee, 2007). De acuerdo con la literatura, *Kluyveromyces marxianus* y *K. fragilis* tienen la mayor productividad de etanol a 42 °C (Ballesteros et al., 1991).

2. Compuestos tóxicos generados en los pretratamientos y sus efectos sobre los microorganismos

Durante el pretratamiento, el material lignocelulósico es a menudo degradado a compuestos inhibidores, que son tóxicos para el metabolismo microbiano (Amiri & Karimi, 2018). Los compuestos inhibidores incluyen ácidos carboxílicos, furanos de la degradación de los azúcares como el furfural o HMF y compuestos fenólicos como el ácido cumárico y el ácido ferúlico (Paniagua-Garcia et al., 2018). Además de los inhibidores habituales contenidos en hidrolizados de biomasa podemos considerar también al ácido acético y otros ácidos como fórmico y levulinico como derivados de los pretratamientos (Yanget al., 2015). Se ha demostrado que estos inhibidores pueden afectar la viabilidad del proceso e incluso detener completamente la fermentación (Favaro et al., 2013; Paniagua-Garcia et al., 2018).

2.1. Mecanismos de inhibición de compuestos generados durante los pretratamientos de la biomasa lignocelulósica

Durante el pretratamiento de biomasa lignocelulósica, la fracción de hemicelulosa se descompone en una mezcla de oligosacáridos y monosacáridos, cuya composición depende de la intensidad del proceso de hidrólisis. Esta degradación genera ácido acético (Chenet et al., 2012), mientras que la descomposición de la lignina produce compuestos fenólicos y aromáticos como 4-hidroxibenzaldehído, ácido 4-hidroxibenzoico, vainillina, alcohol dihidroconiferílico, coniferil aldehído, siringaldehído y ácido siringico y libera contaminantes de metales pesados (Christopher et al., 2014; Jonsson & Martín, 2016).

El pretratamiento de la fracción celulósica también conlleva la producción de aldehídos furánicos furfural y HMF, derivados de la deshidratación de pentosas y azúcares hexosas, respectivamente, ácidos débiles y compuestos fenólicos. La mayor descomposición de los aldehídos furánicos resulta en la generación de ácidos débiles como ácido fórmico y levulínico (Palmqvist y col., 2000; Almeida y col. 2007). Todos estos compuestos inhibidores son citotóxicos y afectan el crecimiento microbiano, el metabolismo y la eficiencia en la producción de etanol (Klinke et al., 2004; Pienkos & Zhang., 2009).

La producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica presenta desafíos adicionales para las cepas de levadura, incluyendo altas concentraciones de inhibidores, disponibilidad de xilosa y otros C5, desequilibrio redox, y carga metabólica derivada de la posible ingeniería genética requerida.

Los compuestos fenólicos también tienen la capacidad de penetrar en las membranas celulares y pueden ser incorporados en ellas (Heipieper et al., 1994). Estos compuestos interfieren con la función de las proteínas, alteran la relación proteína-lípido y afectan el funcionamiento de los transportadores de azúcar y iones en la membrana celular (Xie et al., 2016). Esto tiene repercusiones en la función celular, incluyendo la clasificación y señalización, y puede provocar inflamación en la membrana (Caspeta et al., 2015)

El efecto de los ácidos débiles, especialmente del ácido acético, sobre la fisiología y el rendimiento de *S. cerevisiae* han sido objeto de estudio y revisión recientemente (Palma et al., 2018). Los ácidos inhibidores afectan la permeabilidad y fluidez de la membrana celular, así como los procesos celulares como el transporte de nutrientes y la transducción de energía. En condiciones de pH ácido necesarias para la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica, los ácidos débiles ingresan a la célula de levadura en su forma protonada (-COOH) y se disocian en el citoplasma de pH casi neutro, liberando iones de hidrógeno (H⁺) que conducen a la acidificación intracelular (Ullah et al., 2012). Para mantener la homeostasis del pH intracelular, esta acidificación

es contrarrestada por la actividad de la H⁺-ATPasa, que exporta H⁺ a expensas del consumo de ATP. Además, la acumulación de aniones dentro de las células puede ser tóxica y afectar funciones metabólicas esenciales, como la glucólisis. La forma aniónica del ácido probablemente es exportada por varios transportadores de resistencia a múltiples fármacos (MDR), contribuyendo también al agotamiento de ATP en la célula de levadura (Palma et al., 2018). Como consecuencia, el agotamiento del ATP limitará aún más la actividad de las ATPasas, lo que resulta en la disipación del gradiente electroquímico transmembrana de protones y compromete el funcionamiento de los sistemas de transporte secundario de solutos y el mantenimiento de la homeostasis iónica en la célula de levadura (Palma et al., 2018).

También se sabe que los ácidos débiles inhiben las enzimas glicolíticas, lo que impide la regeneración de ATP (Pampulha & Loureiro-Dias, 1990) y conduce a un agotamiento de la energía, y por otro lado, estos ácidos causan estrés oxidativo, lo cual se manifiesta en la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), tanto por el aumento de H⁺ en el citosol como por la disminución del glutatión reducido (GSH), un eliminador de estas especies reactivas de oxígeno (Guo & Olsson, 2014). La tasa de producción de ROS también aumenta significativamente a altas temperaturas como resultado del estrés por calor (Morano et al., 2012). En la levadura, las ROS se neutralizan a través de procesos enzimáticos y no enzimáticos, siendo estos últimos dependientes de NADPH como fuente de equivalentes de reducción (Herrero y col., 2008). Para compensar la oxidación de NADPH, la levadura incrementa gradualmente el flujo a través de las vías de pentosas y del ácido acético (Celton et al., 2012). Esto resulta en un aumento en la producción de ácido acético a altas temperaturas, lo que representa un efecto sinérgico que disminuye tanto el crecimiento como la tasa de producción de etanol.

De manera similar, los aldehídos furánicos como el furfural y el HMF también aumentan la generación de ROS al actuar como electrófilos reactivos con tiol y agotar los niveles de GSH (Allen et al., 2010; Kim & Hahn, 2013). Algunos compuestos fenólicos también se ha informado que causan estrés oxidativo (Nguyen et al., 2014b); sin embargo, aún no se comprende completamente el mecanismo detrás de su participación en la acumulación de ROS. La acumulación de ROS en la levadura eventualmente resulta en daño en las membranas mitocondriales y vacuolares, la cromatina nuclear y el citoesqueleto de actina (Allen et al., 2010).

En la célula de levadura, los furanos se convierten en sus correspondientes alcoholes menos tóxicos a través de reacciones mediadas por oxidorreductasas dependientes de NAD(P)H, lo que eventualmente conduce a un desequilibrio redox (Ask et al., 2013). Esta disminución en el potencial de reducción del compartimento intracelular de la levadura también contribuye al estrés oxidativo, ya que el NADPH es necesario para la reducción del glutatión oxidado, lo que lleva a una disminución de los niveles de GSH.

Además, la levadura *S. cerevisiae* tiene la capacidad de detoxificar compuestos fenólicos convirtiéndolos en derivados menos tóxicos, ya sea a través de una serie de descarboxilaciones y oxidaciones (Adeboye et al., 2015; Adeboye et al., 2017) o mediante reducciones dependientes de NADPH (Nguyen et al., 2014a; Wang et al., 2016). Estas reacciones también pueden contribuir a un desequilibrio redox dependiendo de la prevalencia de compuestos fenólicos derivados del pretratamiento de lignocelulosa.

Además de los efectos metabólicos mencionados, los inhibidores derivados de la lignocelulosa también provocan cambios estructurales en la célula de levadura, principalmente en su envoltura celular. Se sabe que estos compuestos conducen a la reducción de la estabilidad de la membrana plasmática y su permeabilidad selectiva al disminuir su contenido de ergosterol (Godinho et al., 2018) o al alterar su relación proteína-lípidos (Campos y col., 2009). Esta disminución en la integridad de la envoltura

celular de la levadura facilita significativamente y aumenta la entrada de compuestos inhibidores en la célula de levadura, contribuyendo sinérgicamente a su efecto tóxico.

De hecho, Ding y colaboradores (2011) observaron que los graves efectos del ácido acético en las células de levadura fueron potenciados por la presencia de fenol y furfural, debido a la pérdida de integridad de la membrana y la inhibición del metabolismo. Esta sinergia entre ácidos débiles, furanos y compuestos fenólicos ha sido reconocida durante mucho tiempo como la principal causa de la alta toxicidad de los hidrolizados lignocelulósicos, ya que el efecto acumulativo de los inhibidores presentes en un hidrolizado es mucho mayor que la suma de sus efectos tóxicos individuales (Palmqvist et al., 1999; Klinke et al., 2003; Keating et al., 2006; Ding et al., 2011).

3. Levaduras termotolerantes, resistentes a inhibidores y etanológicas

Durante miles de años, la levadura *S. cerevisiae* ha sido empleada en la producción de alimentos fermentados y bebidas como pan, vino, cerveza y sake. Su historia de uso se remonta a épocas antiguas, donde la selección de esta levadura para aplicaciones industriales se basaba más en la experiencia práctica acumulada que en fundamentos científicos específicos. La evolución de cepas industriales para la producción de etanol de primera generación, obtenido a partir de azúcares de caña y cereales, ha estado históricamente arraigada en el conocimiento adquirido en destilerías y elaboración de cervezas de alta gravedad (HG). Sin embargo, los desafíos planteados por las nuevas aplicaciones biotecnológicas de las levaduras, como la producción de biocombustibles de segunda generación y productos químicos verdes derivados de lignocelulosa, requieren una reconsideración en la selección y el desarrollo industrial de estos organismos (Cunha et al., 2019).

A pesar de los avances en la adaptación de cepas industriales de levadura para fermentaciones biotecnológicas, todavía existe un amplio margen para mejoras significativas. Los procesos industriales actuales a menudo se limitan al uso de cepas ya existentes o modificadas, con escasa exploración de nuevas cepas naturales. La demanda creciente de utilizar un rango más amplio de sustratos, aumentar la productividad y la producción de nuevos compuestos en la industria ha generado un interés considerable en mejorar el uso de cepas industriales actuales y en la selección o desarrollo de levaduras con propiedades no convencionales (Pereira et al., 2010c). Además, gran parte de los avances en biología molecular para la hidrólisis y fermentación eficientes se han centrado mayormente en cepas de laboratorio o en un número limitado de cepas industriales de levadura, lo que sugiere que existen oportunidades emocionantes para aislar o diseñar variantes de levadura con rendimientos superiores a los de las cepas actualmente explotadas en muchos procesos (Favaro et al., 2019).

En este contexto, de acuerdo con West y Kennedy (2014), se ha planteado la necesidad de investigar y aislar cepas de levaduras termotolerantes capaces de operar a temperaturas superiores a 40°C, especialmente para el proceso de SFS. La hidrólisis enzimática por celulasas tiene una temperatura óptima alrededor de 45 a 50°C, pero la mayoría de las levaduras etanológicas tienen una temperatura óptima entre 30 y 37°C (Taylor et al., 2009). Esta discrepancia plantea desafíos técnicos significativos en la producción de etanol a partir de lignocelulosa. Por lo tanto, se ha enfocado la atención en las cepas etanológicas termotolerantes capaces de llevar a cabo la SFS de lignocelulosas, lo que podría representar una solución a estos desafíos (Araqueet al., 2008).

Un área de interés creciente es el estudio de las levaduras capaces de crecer a temperaturas elevadas, ya que presentan ventajas en distintos procesos industriales en comparación con las levaduras tradicionales (Koedrit et al., 2008). Estas levaduras

termotolerantes no solo pueden operar eficientemente a temperaturas elevadas, sino que también muestran una mayor resistencia a compuestos inhibitorios del crecimiento y al efecto inhibitorio del etanol (Abdel-Banat et al., 2010). Por lo tanto, se considera que las levaduras termotolerantes podrían desempeñar un papel crucial en la mejora de la eficiencia y la resistencia de los procesos de fermentación industrial.

S. cerevisiae ocupa un lugar destacado debido a su capacidad inherente para producir etanol a partir del ácido pirúvico generado durante el catabolismo del azúcar. Este proceso implica la conversión del ácido pirúvico en etanol a través de acetaldehído, con la participación crucial de la enzima alcohol deshidrogenasa que regenera NAD⁺ para mantener la glucólisis y la producción de ATP en curso. Como organismo evolucionado para la producción de etanol, *S. cerevisiae* posee características altamente deseables tanto para la industria de bebidas como para aplicaciones de bioetanol recientemente revisadas (Walker et al., 2012; Jansen et al., 2017). Entre estas características se encuentra su capacidad para tolerar altas concentraciones de etanol, una cualidad común en las cepas de levadura utilizadas en dichas industrias. En entornos de fermentación de azúcar de alta gravedad (HG), la industria actualmente puede alcanzar fácilmente concentraciones de bioetanol superiores al 20% v/v, llegando incluso a un 23% v/v en fermentaciones muy HG (Inglede, 2017).

Además de su resistencia al etanol, *S. cerevisiae* exhibe una fisiología única en entornos de alta concentración de azúcar, lo que le permite un transporte pasivo eficiente de azúcar y un flujo rápido de glucosa hacia la producción de etanol a través de la glucólisis, incluso en presencia de oxígeno (lo que se conoce como efecto Crabtree positivo). Esta capacidad es especialmente ventajosa en entornos industriales a gran escala, donde la ausencia de oxígeno añade una capa adicional de complejidad (Favaro et al., 2019).

En el contexto de las biorrefinerías basadas en lignocelulosa, se ha observado un creciente interés en comprender y mejorar la respuesta y adaptación de *S. cerevisiae* a múltiples tensiones, como la presencia de inhibidores microbianos derivados del proceso de pretratamiento de la biomasa (Della-Bianca et al., 2013; Cunha et al., 2019). La liberación de estos inhibidores, principalmente ácidos débiles, furanos y compuestos fenólicos, puede afectar significativamente la eficiencia de la fermentación. Aunque *Saccharomyces cerevisiae* es el organismo más utilizado para la producción de etanol, estos inhibidores derivados de la lignocelulosa pueden afectarlo significativamente, junto con otros desafíos como la utilización de pentosas y las altas temperaturas necesarias para una eficiente sacarificación y fermentación simultáneas.

Por tanto, comprender mejor la respuesta y adaptación de la levadura a estas múltiples tensiones es crucial para diseñar estrategias que mejoren su robustez y capacidad de bioconversión a partir de biomasa lignocelulósica. Esta revisión proporciona una visión general de los principales inhibidores derivados de diferentes materias primas resultantes de diversos pretratamientos de biomasa, y describe los principales mecanismos de respuesta de la levadura a su presencia, así como a las tensiones inducidas por la utilización de xilosa y las altas temperaturas, con un énfasis especial en el efecto sinérgico de múltiples inhibidores/estresores. Además, se destacan casos exitosos de mejora de la tolerancia de *S. cerevisiae*, especialmente aquellos asociados con otras condiciones fisiológicas relevantes.

Finalmente, el estudio de las levaduras termotolerantes, resistentes a inhibidores y etanologénicas, especialmente *S. cerevisiae*, desempeña un papel fundamental en la mejora de los procesos de fermentación industrial y en la producción de bioetanol a partir de fuentes renovables como la lignocelulosa. El uso combinado de cepas de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* con estas capacidades puede representar un enfoque prometedor para superar los desafíos actuales en la industria de biocombustibles y productos químicos verdes.

La innovación biotecnológica requiere de investigación que explore una gran variedad de microorganismos tolerantes a inhibidores y a altas temperaturas para optimizar el rendimiento etanólico de este tipo de proceso de transformación lignocelulósica.

Es importante destacar que la adecuada selección de levaduras resistentes a ciertos inhibidores, y que fermenten el hidrolizado del orujo de uva a elevadas temperaturas, resulta estratégico para el aprovechamiento de residuos de la industria vitivinícola. Al respecto, el grupo de investigación del laboratorio de microbiología enológica de EEA INTA Mendoza está llevando a cabo un proyecto para el aprovechamiento del orujo de uva para la producción de bioetanol. Avances en el mismo han permitido caracterizar la composición química de diferentes orujos y se están evaluando diferentes pretratamientos, se han caracterizado las actividades enzimáticas en especies de levaduras aisladas a partir de orujos de la región y pertenecientes a la Colección de Microorganismos INTA Mendoza (CoMIM).

La presente propuesta se enmarca en este proyecto y pretende contribuir a la caracterización de estas levaduras mediante la evaluación de su tolerancia a inhibidores del crecimiento y elevadas temperaturas producidos durante el proceso de obtención de bioetanol.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Contribuir a la selección de levaduras nativas aisladas de orujos de uva con capacidad para tolerar diferentes inhibidores y elevadas temperaturas, para ser utilizadas en la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica.

Objetivos específicos

- a) Evaluar la capacidad de diferentes levaduras autóctonas para tolerar concentraciones individuales y combinadas de inhibidores generados durante los pretratamientos de biomasa lignocelulósica.
- b) Evaluar la capacidad de diferentes levaduras autóctonas para crecer a elevadas temperaturas, las cuales son comúnmente utilizadas en los procesos de producción de bioetanol.
- c) Seleccionar aquellas levaduras autóctonas más resistentes a inhibidores y con mayor tolerancia a altas temperaturas para su potencial utilización en la producción de bioetanol a partir de orujo de uva.

3. HIPÓTESIS

Se plantea la hipótesis de que existen levaduras localmente aisladas capaces de tolerar concentraciones de inhibidores del crecimiento y desarrollar en rangos de temperaturas que se utilizan generalmente durante el proceso de pretratamiento y sacarificación de la biomasa lignocelulósica.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Microorganismos

Se evaluaron 31 levaduras, 16 de ellas aisladas de fermentaciones de orujos de uva blanco provenientes de viñedos de la provincia de Mendoza, 14 pertenecientes a la Colección de Microorganismos de INTA Mendoza (CoMIM) que presentan diferentes orígenes de aislamiento y una levadura que fue aislada de termitas proveniente de la provincia de Corrientes (tabla 2). Algunas levaduras han sido previamente identificadas mientras que otras no. Esta identificación se realizará en un futuro y de acuerdo con los resultados que se obtengan.

Tabla 2. Descripción de las cepas de levaduras autóctonas evaluadas en los ensayos de tolerancia a inhibidores.

	II	IC	Nomenclatura	Especie	Sustrato de aislamiento	Lugar de aislamiento
CoMIM	1	1	INS 15	<i>S. cerevisiae</i>	Suelo de viñedo	Luján de Cuyo
	2	2	INS 18	<i>S. cerevisiae</i>	Suelo de viñedo	Luján de Cuyo
	3	3	INBK 28	<i>S. cerevisiae</i>	Corteza de viñedo	Luján de Cuyo
	4	4	Mb40NA1	<i>S. cerevisiae</i>	Uva Malbec	Luján de Cuyo
	5	5	Mb40NC2	<i>S. cerevisiae</i>	Uva Malbec	Luján de Cuyo
	22	23	MC9	<i>Z. rouxii</i>	Mosto Concentrado	Rivadavia
	25	24	SJ1	<i>C. vinaria</i>	ND	San Juan
	26	25	SJ2	<i>C. sake</i>	ND	San Juan
	27	26	SJ3	<i>D. vanrijiae</i>	ND	San Juan
	28	27	E3	<i>D. bruxellensis</i>	Vino Malbec	La Consulta
Aisladas de Orujos en fermentación	29	-	CH30	<i>D. bruxellensis</i>	Vino Merlot	Luján de Cuyo
	30	28	BMB1	<i>W. anomalus</i>	ND	San Juan
	22	21	INenB2.2	NI	ND	Luján de Cuyo
	23	22	INenB2.5	NI	ND	Luján de Cuyo
	6	6	TT1	NI	Orujo ttorrontés	Luján de Cuyo
	7	7	CRI 2	NI	Orujo criolla	Luján de Cuyo
	8	8	CRI 4	NI	Orujo criolla	Luján de Cuyo
	9	9	MALR 1	NI	Orujo malbec	Luján de Cuyo
	10	10	CSI 1	NI	Orujo c. sauvignon	Luján de Cuyo
	11	11	CSI 4	NI	Orujo c. sauvignon	Luján de Cuyo
	12	12	GRE 12	NI	Orujo grenache	Luján de Cuyo
13	13	GRE 23	NI	Orujo grenache	Luján de Cuyo	
14	14	GRE 27	NI	Orujo grenache	Luján de Cuyo	
15	15	MAI 4	NI	Orujo moscatel amarillo	Luján de Cuyo	
16	16	CPPN 32	NI	Orujo pinot noir	Agrelo	
17	-	CPPN 33	NI	Orujo pinot noir	Agrelo	
18	17	CPCH 31	NI	Orujo chardonay	Agrelo	
19	18	CPCH 32	NI	Orujo chardonnay	Agrelo	
20	19	CPCH 41	NI	Orujo chardonnay	Agrelo	
21	20	CPCH 42	NI	Orujo chardonnay	Agrelo	
31	-	TSC22	NI	Termitas	Corrientes	

NI: no identificado; ND: no determinado

Nota: De las 31 cepas inicialmente evaluadas (II), tres no mostraron crecimiento en la condición control (17, 29 y 31) y fueron descartadas para las pruebas con inhibidores combinados. Las cepas restantes (n = 28) fueron reenumeradas para su evaluación posterior (IC).

4.2 Medios y activación de las levaduras

Las levaduras fueron activadas en medio YPD (10 g/L extracto de levadura, 20 g/L peptona, 20 g/L glucosa) a 28° C durante 24-48 hs. Las suspensiones de levaduras que se usaron como inóculos se ajustaron a una DO= 0,3 en espectrofotómetro a 600 nm equivalente a una concentración de 10⁶ células/mL

4.3 Caracterización de las levaduras en relación con la tolerancia a diferentes inhibidores del crecimiento y desarrollo a elevadas temperaturas

Para la evaluación se empleó una metodología de *screening* que permite analizar un elevado número de levaduras bajo diferentes condiciones experimentales. Se utilizó un abordaje de *replica plate*, mediante el cual suspensiones de cada levadura ajustadas a una DO de 0,3, fueron dispuestas en una placa madre de micropocillos y posteriormente transferidas de forma simultánea a los distintos medios de cultivo (Figura 2 a,b). El diseño de siembra se muestra en la figura 2c: la placa 1 incluye las levaduras numeradas del 1 al 21, dispuestas en tres columnas y siete filas, mientras que la placa 2 contiene las levaduras del 22 al 31 junto con un control negativo.

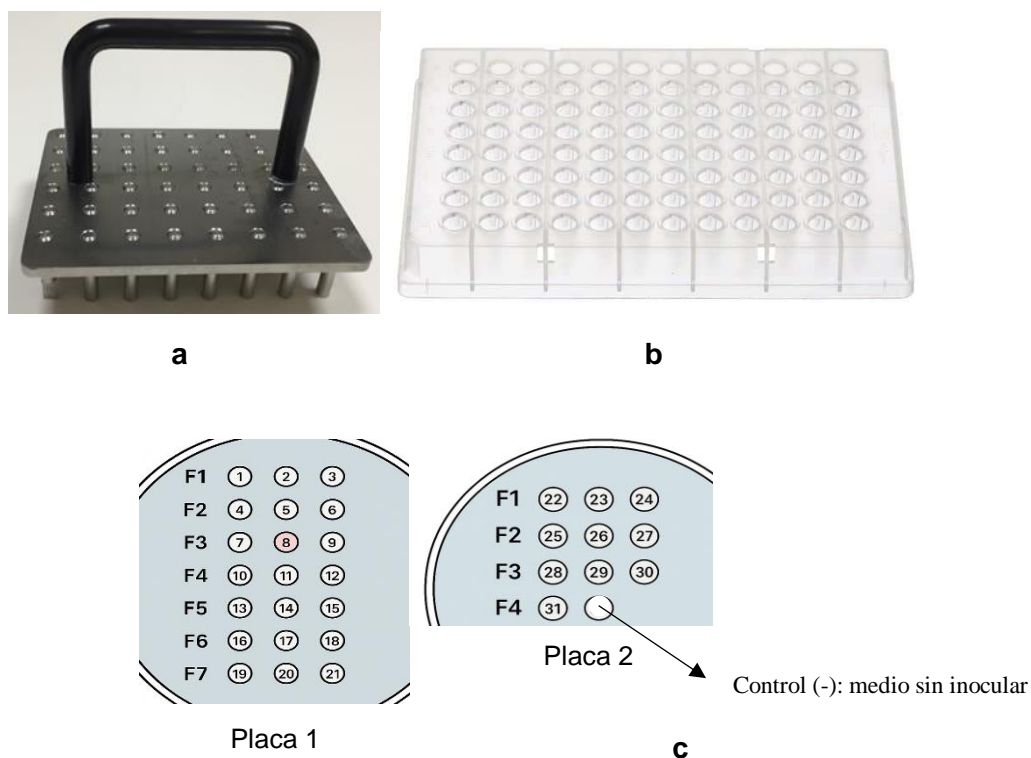


Figura 2. a) Peine para *replica plate* b) Placa multipocillo c) Esquema representativo del diseño de siembra utilizado en la metodología de *screening*. Cada número corresponde a un tipo de levadura diferente.

4.3.1. Evaluación de la tolerancia de las levaduras a inhibidores individuales

Cada suspensión de levaduras cultivada en medio líquido YPD y ajustada previamente a una densidad óptica (DO) de 0,3 se inoculó, mediante la técnica de *replica plate*, en placas que contenían medio Yeast Nitrogen Base (YNB; Sigma-Aldrich Co.) suplementado con 20 g/L de glucosa y con concentraciones crecientes de los distintos inhibidores detallados en la tabla 3. El medio YNB, ampliamente utilizado para el cultivo de levaduras, proporciona una fuente equilibrada de nitrógeno, vitaminas, oligoelementos y sales minerales necesarias para su crecimiento. El pH se ajustó a 4,5 cuando fue necesario, valor comúnmente empleado en procesos de producción de bioetanol (Lin & Tanaka, 2006). Como control, se utilizaron placas inoculadas en medio YNB sin inhibidores. Todas las placas se incubaron a 28 °C durante 7 días, y el ensayo se realizó por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

Tabla 3. Inhibidores del crecimiento microbiano y sus concentraciones.

COMPUESTO INHIBIDOR	CONCENTRACIÓN g/L
Ácido acético	0,37 - 0,65 - 3,30
5-HMF	0,06 - 0,34 - 0,68
Furfural	0,04 - 0,054 - 0,09
Compuestos fenólicos totales	0,25 - 0,625 - 1,25

Para el tratamiento mencionado como compuestos fenólicos totales, se utilizaron los ácidos p-cumárico y ferúlico ya que están naturalmente presentes en las uvas y son los principales compuestos fenólicos vinculados a la lignina en la uva (Yan et al., 2010). Se utilizaron en una proporción de 8:1 (ácido p-cumárico-ácido ferúlico) donde la suma de ambos compuestos se correspondió con la concentración total de compuestos fenólicos evaluada. Este ensayo permitió conocer aquellas levaduras que tienen la capacidad de crecer con los diferentes inhibidores de manera individual.

4.3.2. Evaluación de la capacidad de las levaduras para crecer a elevadas temperaturas

El ensayo de crecimiento de las levaduras a elevadas temperaturas se evaluó utilizando el método de *replica plate*. Cada levadura fue crecida en medio líquido YPD. Se realizó una suspensión de a una DO de 0,3 y estas suspensiones fueron utilizadas para la siembra *replica plate* de placas con medio YNB suplementado con 20 g/L glucosa. El pH del medio se ajustó a 4,5. Como control negativo se utilizaron placas de medio YNB con el agregado de glucosa sin inocular y como control positivo las placas inoculadas incubadas a 28 °C. Todas las placas se incubaron a diferentes temperaturas (°C): 28±1, 35±2, 40±2 durante 3 a 7 días. El ensayo se realizó por triplicado. Con los datos obtenidos se realizó el análisis estadístico para datos no paramétricos correspondiente utilizando el software Infostat.

4.3.3. Evaluación de la tolerancia de las levaduras a la combinación de diferentes inhibidores y a diferentes temperaturas.

Para evaluar la tolerancia de las levaduras a la combinación de inhibidores presentes en muestras de orujo pretratadas, se seleccionaron las siguientes concentraciones:

1. **Ácido acético:** Se utilizó la concentración máxima a la cual se observó crecimiento en el punto 4.3.1 (0,65 g/L) y una concentración intermedia, entre 0,65 y 3,3 g/L, de 1,9 g/L, ya que la máxima concentración evaluada previamente resultó ser muy restrictiva (3,3 g/L).
2. **Compuestos fenólicos:** Se seleccionó una concentración de 0,94 g/L, situada entre la concentración intermedia evaluada en el punto 4.3.1 y la concentración más restrictiva (1,25 g/L). Esta última también fue seleccionada para el ensayo combinado.
3. **Furfural e HMF:** Se seleccionaron las dos concentraciones más altas en las que se observó crecimiento de las levaduras en el punto 4.3.1.

Esto dio como resultado cuatro combinaciones de los cuatro compuestos inhibidores en dos concentraciones cada uno, por triplicado (ver tabla 4). El ensayo se realizó a 28 °C y 35 °C durante 10 días.

Tabla 4. Concentraciones de los inhibidores del crecimiento microbiano y las combinaciones evaluadas

INHIBIDORES (g/L)	TRATAMIENTOS COMBINADOS			
	C1	C2	C3	C4
Ácido acético	1,9	1,9	0,65	0,65
HMF	0,68	0,34	0,68	0,34
Furfural	0,09	0,054	0,09	0,054
Compuestos fenólicos	0,94	1,25	0,94	1,25

Para este ensayo se utilizó una metodología alternativa debido a la dimensión del estudio y con el objetivo de realizar, en el futuro, un modelado probabilístico que permita identificar las condiciones menos restrictivas para las levaduras. El ensayo se llevó a cabo en medio líquido YNB (Sigma-Aldrich Co.). Se empleó un espectrofotómetro a 600 nm para realizar una medición inicial del crecimiento y otra medición al finalizar el ensayo, 10±3 días posteriores a la incubación a 28 °C y 35 °C. La densidad óptica (D.O.) inicial fue establecida en 0,3, equivalente a una concentración de 10⁶ células/mL por encima del límite de detección del equipo.

Para cada medición, se asumió crecimiento (codificado como 1) cuando se observó un aumento de la D.O. de $\geq 0,2$ respecto a la D.O. inicial. En cambio, se registró como no crecimiento (codificado como 0) cuando la D.O. inicial no aumentó en los 10 días de duración del ensayo. Las respuestas para cada réplica se registraron de forma independiente, y la matriz binaria completa se sometió a un análisis estadístico.

4.4. Evaluación de resultados y selección de levaduras

Los resultados de la caracterización de los aislados permitieron conocer si las levaduras presentan capacidades de tolerancia a diferentes inhibidores y sus combinaciones, así como su capacidad para crecer a temperaturas elevadas. Estos resultados posibilitaron la selección de las levaduras más promisorias para ser utilizadas en futuros ensayos de producción de bioetanol a partir de orujo de uva. Con los datos obtenidos se realizó el análisis estadístico para datos no paramétricos utilizando el software Infostat (Di Rienzo et al., 2020). Se aplicó el test de Kruskal-Wallis, dado que las variables analizadas (crecimiento/no crecimiento) no siguen una distribución normal y corresponden a datos de tipo ordinal o categórico transformado a valores numéricos (0 y 1). Este test no paramétrico permite comparar medianas entre más de dos grupos independientes sin requerir homogeneidad de varianzas ni normalidad en los datos, lo que lo convierte en una herramienta adecuada para evaluar diferencias significativas en la tolerancia de las levaduras frente a los distintos tratamientos con inhibidores.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Evaluación de la tolerancia de las levaduras a inhibidores individuales

Los resultados de la evaluación de los inhibidores de manera individual mediante *replica plate* mostraron que la mayoría de las levaduras crecieron en las concentraciones bajas e intermedias de todos los inhibidores evaluados (ácido acético, HMF, furfural y fenoles) (figura 4). Asimismo, cabe destacar, que los aislados 17 (CPPN33), 29 (CH30 *B. bruxellensis*) y 31 (TSC22) no desarrollaron a 28 °C (la condición considerada como control) por lo que fueron descartadas para el siguiente análisis (ver punto 5.2).

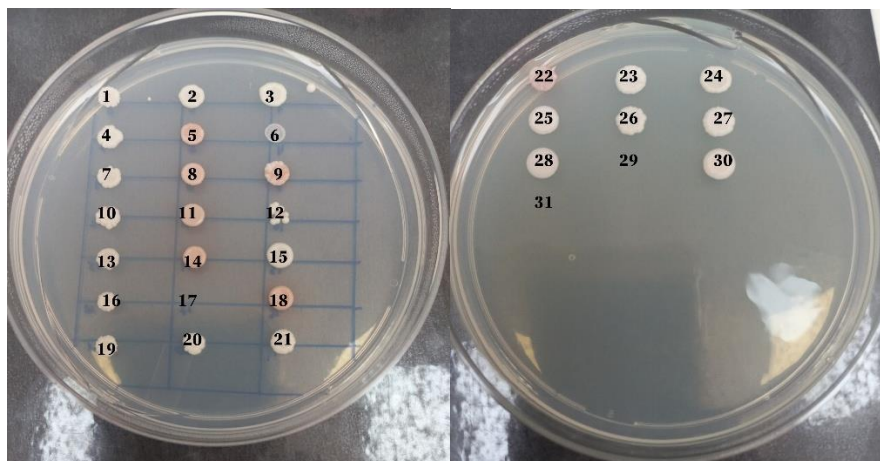


Figura 3. Diseño de siembra utilizado en la metodología de *screening*. Cada número corresponde a un tipo de levadura diferente.

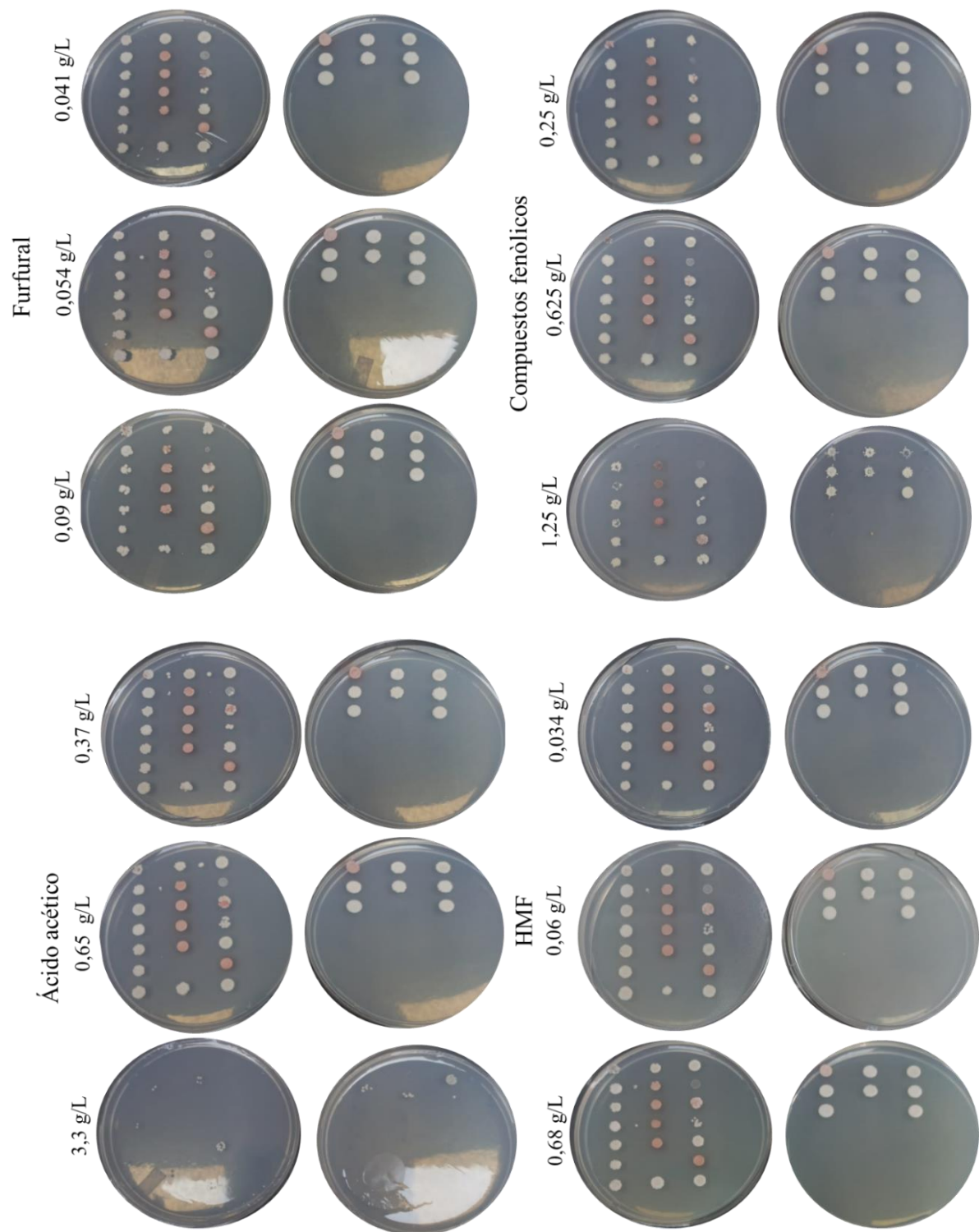


Figura 4. Crecimiento en *replica plate* de las levaduras en presencia de diferentes concentraciones de inhibidores.

La figura 5 muestra el porcentaje de crecimiento de las levaduras frente a diferentes inhibidores químicos, ácido acético, HMF, furfural y compuestos fenólicos; evaluados a distintas concentraciones. En todos los casos se observa que la respuesta de las cepas varía según el tipo de inhibidor y la dosis aplicada. El ácido acético fue el compuesto que más afectó el crecimiento de las levaduras. A concentraciones bajas (0,37 y 0,65 g/L) la mayoría de las cepas mantuvo su crecimiento, mientras que al aumentar la concentración a 3,3 g/L se registró una marcada disminución en la proporción de levaduras viables, alcanzando niveles de inhibición cercanos al 70 %. Este comportamiento refleja el fuerte efecto inhibitorio de este ácido orgánico, conocido por afectar la integridad de la membrana celular y alterar el metabolismo fermentativo de las levaduras. En contraste, frente a los compuestos HMF y furfural, se observa una tendencia opuesta: las levaduras conservaron altos porcentajes de crecimiento en todas las concentraciones analizadas. En particular, tanto con 0,06 g/L y 0,68 g/L de HMF como con 0,04 g/L, 0,054 g/L y 0,09 g/L de furfural, más del 90 % de las cepas logró desarrollarse, indicando una buena tolerancia a estos aldehídos. Por su parte, los fenoles presentaron un efecto intermedio. En las concentraciones más bajas (0,25 g/L y 0,625 g/L) la mayoría de las cepas creció sin inconvenientes, mientras que al aumentar la dosis a 1,25 g/L se evidenció una reducción del crecimiento, con alrededor del 60 % de las cepas aún viables. Esto sugiere un efecto dosis-dependiente, donde concentraciones elevadas de compuestos fenólicos comienzan a limitar la proliferación celular. Estos resultados sugieren que algunos inhibidores, como el ácido acético y los fenoles totales, inducen una respuesta de tolerancia dependiente de la concentración, evidenciada por la disminución del número de cepas capaces de crecer a medida que aumenta la dosis. En cambio, para otros compuestos, como el HMF y el furfural, las concentraciones evaluadas no generaron variaciones en la respuesta de tolerancia entre las cepas, mostrando un patrón de crecimiento/no crecimiento independiente de la concentración. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Paniagua et al. (2018), quienes identificaron al ácido acético como uno de los principales inhibidores en la fermentación de hidrolizados derivados de residuos agroindustriales de *switchgrass*. Asimismo, los compuestos fenólicos constituyeron el segundo grupo más restrictivo, en concordancia con lo señalado por Wang et al. (2016), quienes demostraron que los ácidos fenólicos derivados de la paja de arroz afectan la fermentación etanólica por *Pichia stipitis*, destacando a los ácidos fenólicos libres como los más tóxicos. De forma similar, Hou et al. (2018) observaron en *S. cerevisiae* que el efecto inhibitorio de los compuestos fenólicos aumenta con la concentración. En contraste, el furfural y el HMF presentaron un bajo poder inhibitorio en las condiciones evaluadas, ya que el 96 % de las levaduras creció en todos los tratamientos. Esto sugiere que, aunque son compuestos comunes en hidrolizados lignocelulósicos, se requieren concentraciones más elevadas para generar un efecto inhibitorio significativo. Estos resultados coinciden con los de Saucedo Gutiérrez (2024), quien reportó que concentraciones de furfural de 0,1–0,3 % (v/v) no afectaron el crecimiento de *Scheffersomyces stipitis*, y con Paniagua et al. (2018), quienes concluyeron que el HMF no interfiere de manera significativa en la fermentación de hidrolizados ácidos de *switchgrass*.

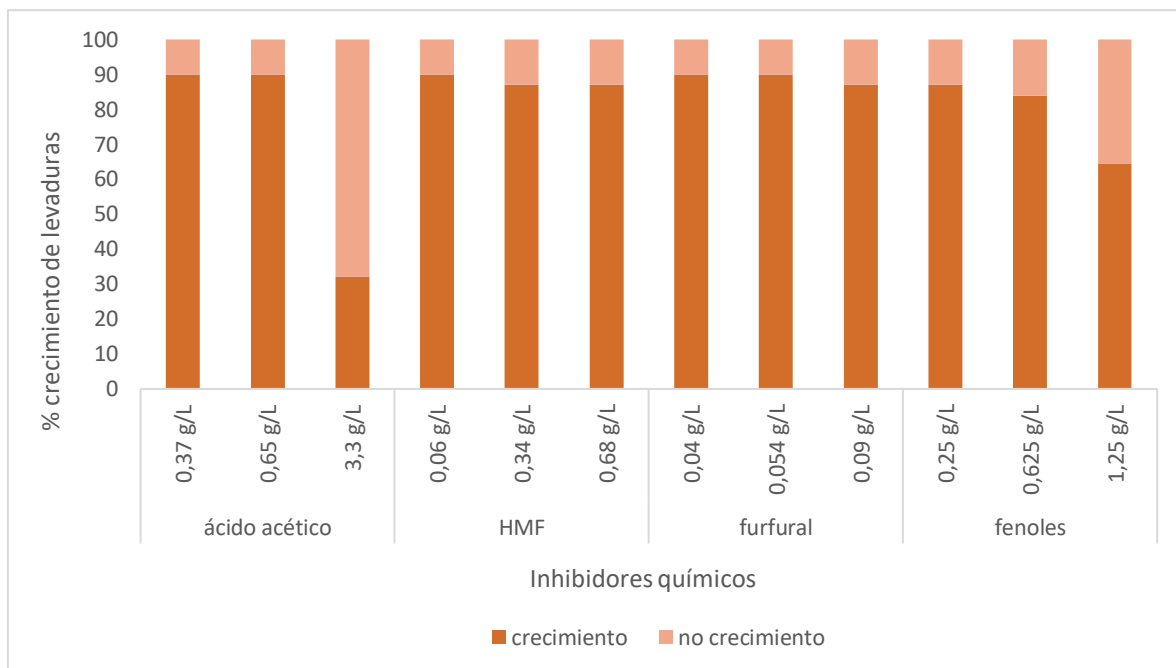


Figura 5. Tolerancia de levaduras a diferentes concentraciones de inhibidores microbianos.

Los resultados del test de Kruskal–Wallis ($p = 0,0017$) evidencian diferencias significativas en la capacidad de crecimiento entre los distintos aislados de levaduras evaluados frente a los compuestos inhibidores. Este valor de p menor a 0,05 confirma que la respuesta de crecimiento no fue homogénea entre los grupos, reflejando variabilidad intraespecífica en la tolerancia de las cepas autóctonas analizadas (ver ANEXO 1).

En la tabla 5 se observa que los aislados que integran el grupo B (medias próximas a 1,00 y desviación estándar nula o mínima) corresponden a las levaduras que mantuvieron crecimiento en la mayoría de las condiciones ensayadas. Dentro de este grupo se destacan nueve cepas: Mb40NC2 (aislado 5), MALR1 (aislado 9), GRE23 (aislado 13), MAI4 (aislado 15), CPCH32 (aislado 19), CPCH42 (aislado 21), SJ3 (aislado 27), E3 (aislado 28) y BMB1 (aislado 30) que presentaron una mayor tolerancia frente a todos los inhibidores, incluso en concentraciones elevadas. Estas levaduras lograron crecer de manera consistente, lo que sugiere la presencia de mecanismos fisiológicos de resistencia, posiblemente asociados a la capacidad de detoxificación de compuestos furánicos y fenólicos o a la estabilidad de membrana frente a estrés ácido. En contraste, los aislados con medias inferiores (0,42–0,83) mostraron una respuesta menos favorable. Entre ellos, el aislado 4 (Mb40NA1, identificado como *S. cerevisiae*) presentó la media de crecimiento más baja ($0,42 \pm 0,51$), ubicándose dentro del grupo A y diferenciándose significativamente del resto. Esta cepa mostró inhibición marcada incluso a concentraciones bajas e intermedias de los inhibidores, lo que indica una menor robustez fisiológica y una incapacidad para adaptarse a condiciones adversas. Por esta razón, fue descartada de los ensayos posteriores. Asimismo, los aislados 1, 2 y 3, también pertenecientes a *S. cerevisiae*, se ubicaron en un grupo intermedio (A–B), con medias de 0,75–0,83 y desviaciones estándar moderadas, lo que sugiere una tolerancia variable dentro de la misma especie.

Tabla 5. Diferencias en el crecimiento entre aislados microbianos mediante Test de Kruskal Wallis

Aislado	Medias	D.E	Kruskal Wallis Test (p> 0,05)	
			A	B
5	1	0		
9	1	0		
13	1	0		
15	1	0		
19	1	0		
21	1	0		
25	1	0		
26	1	0		
27	1	0		
6	0,92	0,29		
7	0,92	0,29		
8	0,92	0,29		
10	0,92	0,29		
11	0,92	0,29		
12	0,92	0,29		
14	0,92	0,29		
16	0,92	0,29		
18	0,92	0,29		
20	0,92	0,29		
22	0,92	0,29		
23	0,92	0,29		
24	0,92	0,29		
28	0,92	0,29		
30	0,92	0,29		
1	0,83	0,39		
2	0,83	0,39		
3	0,75	0,45		
4	0,42	0,51		

Este comportamiento heterogéneo dentro del género *Saccharomyces* coincide con lo reportado en la literatura, donde se ha demostrado que la resistencia a compuestos derivados del pretratamiento lignocelulósico puede variar significativamente entre cepas de la misma especie, dependiendo de su origen ecológico y de sus adaptaciones metabólicas (Almeida et al., 2007; Hasunuma & Kondo, 2012). En síntesis, los resultados de la tabla 5 demuestran que, aunque existe variabilidad entre los aislados, la mayoría de las levaduras autóctonas presentan una alta tolerancia global frente a los inhibidores evaluados.

5.2. Evaluación del crecimiento de las levaduras en elevadas temperaturas

Se evaluó el crecimiento de las levaduras a temperaturas más altas (35°C y 40°C) y a la temperatura óptima (28°C), que generalmente se utiliza para su desarrollo. Todas las levaduras evaluadas crecieron a la temperatura óptima (28°C), salvo las excepciones de CPPN33 (aislado 17), *B. bruxellensis* CH30 (aislado 29) y TSC22 (aislado 31), que no crecieron a ninguna temperatura, ni siquiera en la condición control (figura 6).

Al aumentar la temperatura a 35°C, se identificó que otras tres levaduras no toleraron este incremento: INBK28 (aislado 3), Mb40NA1 (aislado 4) ambas identificadas como *S. cerevisiae* y el aislado11, CSI4 (no identificado aun). La mayoría de las levaduras fueron capaces de crecer a 35°C, aunque dos de ellas lo hicieron más lentamente: Mb40NC2 (aislado 5-*S. cerevisiae*) y CS11 (aislado 10), aún no identificada. No se observó crecimiento en ninguna de las levaduras evaluadas a 40°C, la temperatura más alta.

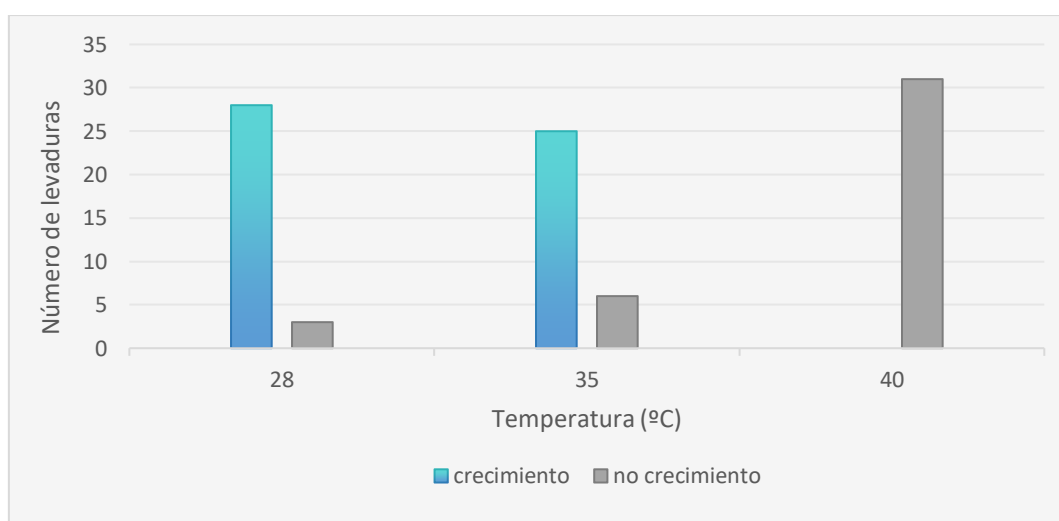


Figura 6. Evaluación del crecimiento de levaduras a diferentes temperaturas

Es importante destacar que las cepas TT1 (aislado 6) y CPCH32 (aislado 19), ambas aisladas de orujos de uva, demostraron una alta tolerancia tanto a los inhibidores evaluados como a la temperatura elevada. Esta doble tolerancia sugiere un potencial biotecnológico relevante, especialmente para su aplicación futura en procesos industriales donde las condiciones suelen implicar estrés combinado por compuestos tóxicos y temperaturas elevadas.

Diversos estudios han señalado que la selección de levaduras con resistencia simultánea a múltiples factores de estrés, como acidez, altas concentraciones de etanol o temperaturas superiores a 35 °C, puede contribuir a mejorar la robustez y estabilidad de los cultivos durante la fermentación (Almeida et al., 2007; Liu, 2011; Hasunuma & Kondo, 2012). Si bien en este trabajo no se evaluaron condiciones fermentativas, la identificación de cepas nativas con perfiles de tolerancia amplios representa un paso inicial valioso para su posterior análisis en ensayos de producción de bioetanol a partir de sustratos lignocelulósicos

Por otro lado, los resultados obtenidos en este estudio se alinean con investigaciones previas que han resaltado el valor de ambientes naturales y extremos, como el orujo de uva, para el aislamiento de cepas de *S. cerevisiae* con elevada tolerancia a múltiples factores de estrés propios de la fermentación de biomasa lignocelulósica. En particular, se ha reportado que este tipo de sustratos, caracterizados por condiciones

desfavorables como bajo contenido de nutrientes, presencia de etanol residual, exposición a radiación solar y ácidos orgánicos débiles, pueden ejercer una presión selectiva natural sobre la microbiota, favoreciendo la aparición de levaduras innatamente resistentes. Tal es el caso de la cepa Fm17, aislada a partir de orujo de uva, que mostró una elevada tolerancia a temperaturas de hasta 40 °C, altos niveles de azúcares (200 g/L de glucosa) y diversos inhibidores presentes en hidrolizados ácidos (Favaro y col., 2013).

5.3. Evaluación de la tolerancia de las levaduras a la combinación de diferentes inhibidores a diferentes temperaturas.

Los resultados mostraron que en general, los inhibidores combinados, generaron condiciones más restrictivas para el crecimiento de las levaduras que los mismos de manera individual, y más restrictivas aun cuando a esas condiciones fueron evaluadas a elevada temperatura (35 ± 2 °C) (tabla 6). No obstante, tanto 28 °C como a 35 °C, la condición más restrictiva para la mayoría de las levaduras fue la condición 2 como puede observarse en la tabla 6. Este tratamiento combina las concentraciones más elevadas de los dos inhibidores más restrictivos del crecimiento de las levaduras ácido acético y compuestos fenólicos con la menor concentración HMF y furfural.

Además, se puede observar en la tabla 6 que en orden decreciente de restricción del crecimiento, se ordenan el tratamiento C4, luego el C3 y finalmente el C1 el cual resulta ser la combinación menos restrictiva para el crecimiento microbiano a 28°C.

Tabla 6. Crecimiento de las cepas en diferentes combinaciones de los inhibidores en las dos temperaturas evaluadas.

	Aislado	28°C				35°C			
		C1	C2	C3	C4	C1	C2	C3	C4
1	INS15 <i>S. cerevisiae</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
2	INS18 <i>S. cerevisiae</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
3	INBK28 <i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Mb40NA1 <i>S. cerevisiae</i>	+	-	+	+	-	-	-	-
5	Mb40NC2 <i>S. cerevisiae</i>	+	-	+	+	-	-	-	-
6	TT1	+	-	+	+	+	-	+	+
7	CRI2	+	-	-	-	-	-	-	-
8	CRI4	+	-	+	+	-	-	-	-
9	MALR1	+	-	+	-	-	-	-	-
10	CS11	-	-	-	-	-	-	-	-
11	CS14	+	-	+	+	-	-	-	-
12	GRE12	+	-	+	+	-	-	-	-
13	GRE23	+	-	+	-	+	-	-	-
14	GRE27	+	-	+	-	-	-	-	-
15	MAI4	+	-	-	-	-	-	-	-
16	CPPN32	+	-	+	+	-	-	-	-
17	CPCH31	+	-	+	+	-	-	-	-
18	CPCH32	+	-	+	+	-	-	-	-
19	CPCH41	+	-	+	+	-	-	-	-
20	CPCH42	+	-	+	+	-	-	-	-
21	InenB22	+	-	+	+	-	-	-	-
22	InenB25	+	-	+	+	+	-	-	+
23	MR9 <i>Z. rouxii</i>	+	-	+	+	-	-	+	-
24	SJ1 <i>C. vinaria</i>	+	-	+	+	-	-	-	-
25	SJ2 <i>C. sake</i>	+	-	+	+	-	-	+	-
26	SJ3 <i>D. varinijae</i>	+	-	+	+	-	-	-	-
27	E3 <i>B. bruxellensis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-
28	BMB1 <i>W. anomalus</i>	+	-	+	+	-	-	-	-

+ (crecimiento), - (no crecimiento)

Finalmente, como se observa en la tabla 6, los resultados mostraron que un 64% de las levaduras (18/28) fueron capaces de resistir a 3 de los tratamientos combinados (C1, C3 y C4) a 28°C.

A 35 °C, todas las condiciones evaluadas presentaron un efecto fuertemente inhibitorio sobre el crecimiento de las levaduras. El tratamiento C2 volvió a destacarse como el más restrictivo, ya que ninguna cepa logró desarrollarse en esta combinación de compuestos a 35°C. Los demás tratamientos ensayados a esta temperatura elevada también mostraron una marcada inhibición, en general, el 82 % de los aislados (23 de 28) no presentó crecimiento. Solo tres cepas lograron desarrollarse en los tratamientos C1 y C3, mientras que únicamente dos lo hicieron en la condición C4 a 35 °C (tabla 6)

La tabla 7 presenta las combinaciones de inhibidores (C1, C2, C3 y C4) utilizadas para evaluar su efecto sobre el crecimiento de levaduras, junto con las letras asignadas por el test de Kruskal–Wallis, que indican diferencias significativas entre tratamientos. El análisis estadístico mediante el test de Kruskal–Wallis reveló diferencias altamente significativas entre las combinaciones evaluadas ($p < 0,0001$). El tratamiento C2, que combina las mayores concentraciones de ácido acético (1,9 g/L) y compuestos fenólicos (1,25 g/L), mostró el efecto inhibitorio más fuerte, ubicándose en el grupo A, significativamente diferente del resto de las combinaciones. Esto evidencia un efecto aditivo o sinérgico entre ambos inhibidores principales, responsables de una marcada reducción del crecimiento. En contraste, el tratamiento C1, que también presenta alto ácido acético (1,9 g/L) pero una menor proporción de fenoles (0,94 g/L), se ubicó en el grupo C, reflejando el menor efecto restrictivo del conjunto. Esta diferencia significativa con respecto a C2 indica que los compuestos fenólicos juegan un rol determinante en la inhibición, incluso más relevante que el ácido acético en las condiciones evaluadas. El tratamiento C4, caracterizado por baja concentración de ácido acético (0,65 g/L) y elevado contenido de fenoles (1,25 g/L), se agrupó en el grupo B, mostrando un efecto intermedio. Su diferencia significativa con C1 (C) y C2 (A) sugiere que, aun en presencia reducida de ácido acético, los fenoles mantienen un poder inhibitorio considerable. Por su parte, el tratamiento C3 presentó las concentraciones más altas de HMF (0,68 g/L) y furfural (0,09 g/L), pero bajos niveles de ácido acético y fenoles (0,65 g/L y 0,94 g/L, respectivamente). Este tratamiento fue clasificado dentro del grupo BC, sin diferencias significativas con C4 (B) ni con C1 (C), lo que indica un efecto moderado, atribuible a la leve potenciación del poder inhibitorio de los HMF y furfurales en presencia de otros compuestos.

En conjunto, las diferencias significativas observadas entre los tratamientos confirman que el factor más influyente en la restricción del crecimiento de levaduras es la concentración de compuestos fenólicos, seguida del ácido acético, mientras que HMF y furfural presentan un efecto menor, aunque pueden contribuir de forma sinérgica cuando coexisten con otros inhibidores.

Tabla 7. Diferencias estadísticas según el test de Kruskal Wallis ($p > 0,05$) para las diferentes combinaciones evaluadas a 28 °C

Inhibidores	Combinaciones				T (°C)
	1	2	3	4	
Ácido acético (g/L)	1,9	1,9	0,65	0,65	28
HMF (g/L)	0,68	0,34	0,68	0,34	
Furfural (g/L)	0,09	0,054	0,09	0,054	
Fenoles (g/L)	0,94	1,25	0,94	1,25	
Kruskal Wallis Test	C	A	BC	B	
($p > 0,05$)					

El análisis estadístico global mediante el test de Kruskal–Wallis mostró diferencias altamente significativas entre las combinaciones de inhibidores ($p < 0,0001$), tanto a 28 °C como a 35 °C, evidenciando un efecto diferencial en la tolerancia de las levaduras frente a las distintas condiciones (ANEXO 2). En la tabla 8 se detallan estos resultados a nivel combinado, mostrando el comportamiento de cada aislado en ambas temperaturas. En general, los efectos inhibidores sinérgicos de los tratamientos combinados se evidenciaron en la pérdida progresiva de la capacidad de crecimiento de las levaduras, independientemente de su especie u origen de aislamiento, siguiendo el orden de restricción creciente $C1 \leq C3 \leq C4 \ll C2$.

Tabla 8. Clasificación de cepas de levaduras según su comportamiento frente a combinaciones de inhibidores a 28 °C y 35 °C.

La exposición simultánea a los principales inhibidores derivados del pretratamiento de biomasa lignocelulósica (ácido acético, furfural, HMF y compuestos fenólicos) evidenció una respuesta diferencial entre los 28 aislados de levaduras evaluados (tabla 8). En términos generales, el efecto combinado de estos compuestos resultó más restrictivo que el observado en los ensayos individuales, lo que sugiere una acción sinérgica en la inhibición del crecimiento celular. Este fenómeno es coherente con reportes previos que indican que la interacción entre ácidos orgánicos y aldehídos incrementa el daño oxidativo y compromete la integridad de la membrana plasmática, afectando la homeostasis iónica y la actividad enzimática intracelular (Liu et al., 2019; Almeida et al., 2007).

-Comportamiento a 28 °C. A 28 °C se identificaron tres grupos fenotípicos claramente diferenciados. El **grupo A**, integrado por 8 aislados (1, 2, 5, 9, 10, 11, 14, 15), mostró una marcada sensibilidad a las combinaciones evaluadas, sin evidencias de crecimiento detectable en la mayoría de las condiciones, representando el 29 % del total. El **grupo B**, compuesto por 17 cepas (7, 8, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 y 28), exhibió un crecimiento parcial o moderado frente a determinadas combinaciones, representando el 61 % del total. Este grupo sugiere la existencia de mecanismos de defensa fisiológicos, como la activación de bombas de eflujo, sistemas antioxidantes o modificaciones en la composición lipídica de la membrana, que confieren una tolerancia intermedia a los estresores químicos. Por último, el **grupo C**, representado exclusivamente por el aislado 6 (TT1), mostró la mayor capacidad de crecimiento bajo todas las condiciones combinadas. Este comportamiento sugiere una tolerancia constitutiva o adaptativa superior, posiblemente vinculada a una mayor eficiencia en la detoxificación de aldehídos o en la reparación de daños oxidativos.

-Comportamiento a 35 °C. El incremento de la temperatura a 35 °C intensificó el efecto inhibitorio de las combinaciones, reduciendo significativamente la cantidad de cepas capaces de crecer. En estas condiciones, las diferencias entre cepas se tornaron más homogéneas debido a la acción combinada del estrés térmico y químico.

El **grupo A** incluyó 17 aislados (1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 21, 24, 26 y 28) que no mostraron crecimiento, representando el 61 % del total.

Aislado	T (°C)	
	28	35
1	A	A
2	A	A
5	A	A
6	C	B
7	B	A
8	B	A
9	A	A
10	A	A
11	A	A
12	B	A
13	B	AB
14	A	A
15	A	A
16	B	A
17	B	A
18	B	AB
19	B	AB
20	B	AB
21	B	A
22	B	B
23	B	AB
24	B	A
25	B	AB
26	B	A
27	B	AB
28	B	A

El **grupo AB**, constituido por 7 cepas (13,18,19,20,23, 25 y 27), presentó un crecimiento débil o lento, equivalente al 25 %, indicando una capacidad parcial de adaptación a las condiciones restrictivas.

El **grupo B**, reducido a solo dos aislados (6 y 22), mantuvo crecimiento en la mayoría de las combinaciones, representando apenas el 7 % del total.

Estos resultados demuestran que el aumento de temperatura produjo una disminución significativa en la resistencia global. La sensibilidad térmica acentuó los efectos de los inhibidores, posiblemente debido a la desestabilización de proteínas de membrana y la pérdida de fluidez lipídica, que limitan la capacidad de las células para mantener la homeostasis y detoxificar compuestos reactivos.

Entre las cepas más destacadas se encuentran los aislados 6 (TT1) y 22 (InenB25), ambos provenientes de orujos en fermentación. Estas cepas conservaron su viabilidad y capacidad de crecimiento tanto a 28 °C como a 35 °C, lo que sugiere una resistencia intrínseca a condiciones de estrés múltiple. Dicha característica las posiciona como candidatas prometedoras para procesos de fermentación a altas temperaturas o con presencia de inhibidores, típicos de la hidrólisis y fermentación simultánea (SSF) de biomasa lignocelulósica.

En conjunto, los resultados demuestran una tendencia clara: el efecto inhibitorio aumenta en forma sinérgica con la temperatura, generando un desplazamiento del comportamiento global hacia la sensibilidad. Sin embargo, la persistencia de ciertos aislados con crecimiento detectable sugiere la existencia de variabilidad intraespecífica en la tolerancia al estrés químico-térmico, probablemente asociada a diferencias genéticas o adaptaciones ecológicas derivadas del origen ambiental de los aislamientos.

En conjunto, estas levaduras demuestran un potencial biotecnológico relevante, dada su capacidad de crecer a 35 °C y resistir la mayoría de las combinaciones evaluadas, aunque todas mostraron inhibición total frente a la condición C2, confirmada como la más restrictiva.

Estos hallazgos contrastan con lo reportado por Saucedo Gutiérrez (2024) en su trabajo de tesis, quien observó que la combinación eficaz de inhibidores fue la de furfural y ácido acético a concentraciones de 0,2 % y 0,3 % (v/v), respectivamente, que inhibió el crecimiento de la cepa *Scheffersomyces stipitis*. Estos resultados resaltan la importancia de evaluar los efectos sinérgicos entre inhibidores y sus concentraciones, ya que dichos efectos no siempre son evidentes cuando los compuestos se analizan de manera individual. En este sentido, Chen et al. (2016) destacan que la formación de inhibidores durante el pretratamiento, especialmente ácido acético y compuestos fenólicos, representa un obstáculo crítico para la eficiencia fermentativa, el cual debe ser mitigado mediante el desarrollo de cepas tolerantes o estrategias de detoxificación.

Cabe destacar que la metodología empleada permitió una evaluación integral mediante técnicas de cultivo en *replica plate* y ensayos en medio líquido con monitoreo de crecimiento por densidad óptica. Esta aproximación no sólo permitió caracterizar el efecto de cada inhibidor individual y en combinación, sino que también sienta las bases para futuros estudios de modelado probabilístico que puedan predecir el comportamiento de las levaduras frente a diferentes condiciones de estrés.

En conjunto, los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en la literatura científica y refuerzan la idea de que la selección de levaduras tolerantes a múltiples inhibidores y a temperaturas elevadas es una estrategia clave para avanzar en la viabilidad de procesos de producción de bioetanol a partir de residuos lignocelulósicos como el orujo de uva. Esta selección debe considerar no sólo la tolerancia individual,

sino también la capacidad de las cepas de sobreponerse al efecto sinérgico de los inhibidores y al estrés térmico, condiciones inherentes a los procesos industriales

6. CONCLUSIONES

- La mayoría de las levaduras evaluadas muestran tolerancia a concentraciones bajas e intermedias de los inhibidores ensayados de manera individual, como ácido acético, HMF, furfural y fenoles. Sin embargo, el crecimiento de las levaduras se ve significativamente afectado en las concentraciones más altas de ácido acético y fenoles (ácido p-cumárico y ácido ferúlico).
- En ausencia de inhibidores, todas las levaduras, con excepción de tres, fueron capaces de crecer a 28 °C. La mayoría mostró crecimiento a 35 °C, pero ninguna de ellas creció a 40 °C.
- Las combinaciones de inhibidores evaluadas a niveles bajos e intermedios a 28 °C produjeron efectos completamente restrictivos sobre el crecimiento de todas las levaduras (combinación 2), así como condiciones poco restrictivas que solo inhibieron el crecimiento del 11% (3/28) de los aislados 3, 10 y 27 (combinación 1).
- Las combinaciones más restrictivas se asociaron con altas concentraciones de fenoles totales y elevado ácido acético, mientras que las menos restrictivas estuvieron relacionadas con bajas concentraciones de fenoles totales.
- El aumento de la temperatura a 35 °C restringió drásticamente el grupo de levaduras que toleraron alguno de los tratamientos combinados.
- Se seleccionaron dos levaduras: TT1 (aislado 6) y InenB25 (aislado 22), que deben ser identificadas por biología molecular, por haber mostrado mayor tolerancia a las condiciones combinadas evaluadas.
- Estas cepas serán objeto de evaluaciones y caracterizaciones adicionales para determinar su potencial uso en diversos procesos biotecnológicos.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Banat, B.M.A., Hoshida, H., Ano, A., Nonklang, S., Akada, R. (2010). High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast?. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85(4) 861-867. doi: 10.1007/s00253-009-2248-5.

Abo Bodjui Olivier, Gao Ming, Wang Yonglin, Wu Chuanfu, Ma Hongzhi & Wang Qunhui. (2019). Lignocellulosic biomass for bioethanol: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes Review. *Rev Environ Health* <https://doi.org/10.1515/reveh-2018-0054>.

Acun, S., Gül, H. (2014). Effects of grape pomace and grape seed fours on cookie quality. *Qual Assur Saf Crop Foods.* 6 (1) 81–88. <https://doi.org/10.3920/QAS2013.0264>.

Adeboye, P.T., Bettiga, M., Aldaeus, F., Larsson, P.T., Olsson, L. (2015). Catabolism of coniferyl aldehyde, ferulic acid and p-coumaric acid by *Saccharomyces cerevisiae* yields less toxic products. *Microb Cell Factories.* 14:149. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0338-x>.

Adeboye, P.T., Bettiga, M., Olsson, L. (2017). ALD5, PAD1, ATF1 and ATF2 facilitate the catabolism of coniferyl aldehyde, ferulic acid and p-coumaric acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep.* 7:42635. <https://doi.org/10.1038/srep42635>.

Allen, S.A., Clark, W., McCaffery, J.M., Cai, Z., Lanctot, A., Slininger, P.J., Liu, Z.L., Gorsich, S.W. (2010). Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels.* 3:2. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-2>.

Almeida, J.R.M., Modig, T., Petersson, A., y col. (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol.* 82, 340–349.

Amiri, H., Karimi, K. (2018). Pretreatment and hydrolysis of lignocellulosic wastes for butanol production: Challenges and perspectives. *Bioresorce Technology.* 270, 702-721.

Antonić, B., Jančíková S, Dordević, D., Tremlová, B. (2020) Grape pomace valorization: a systematic review and meta-analysis. *Foods.* 9 (11), 1627. <https://doi.org/10.3390/foods9111627>.

Araque, E., Parra, C., Rodríguez, M.J., Baeza, J. (2008). Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. *Enzyme MicrobTech.* 43 (2) 120-123. doi:10.1016/j.enzmictec.2008.02.007.

Ask, M., Bettiga, M., Mapelli, V., Olsson, L. (2013). The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels.* 6 (1) 22. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-22>.

Baeyens, J., Kang, Q., Appels, L., Dewil, R., Lv, Y., Tan, T. (2015). Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. *Prog Energy Combust Sci.* 47, 60–88. <https://doi.org/10.1016/j.peccs.2014.10.003>.

Ballesteros, I., Ballesteros, M., Cabañas, A., Carrasco, J., Martín, C., Negro, M.J. y col. (1991). Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cellulose to ethanol. *Appl Biochem Biotechnol.*;28/29: 307–15. <https://doi.org/10.1007/BF02922610>.

Bender, A.B.B., Speroni, C.S., Moro, K.I.B., Morisso, F.D.P., dos Santos, D.R., da Silva, L.P., Penna, N.G. (2020). Effects of micronization on dietary fiber composition, physicochemical properties, phenolic compounds, and antioxidant capacity of grape pomace and its dietary fiber concentrate. *LWT* 117:108652. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108652>.

Bimbo, F., Bonanno, A., Nocella, G., Viscecchia, R., Nardone, G., De Devitiis, B., Carlucci, D. (2017). Consumers' acceptance and preferences for nutrition-modified and functional dairy products: a systematic review. *Appetite* 113:141– 154. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.02.031>

Binod P, Sindhu R, Singhanian RR, Vikram S, Devi L, Nagalakshmi S., y col. (2010). Bioethanol production from rice straw: An overview. *Bioresour Technol.* 101(13) 4767–74. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.079>.

Bothast, R.J., Schlicher, M.A. (2005). Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol.* 67:19–25.

Brethauer, S., Wyman, C.E. (2010). Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresour Technol.* 101 (13) 4862-74. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.009>.

- Bušić, A., Marđetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Ivančić Šantek, M., Komes, D., Novak, S., Šantek, B. (2018). Bioethanol Production from Renewable Raw Materials and Its Separation and Purification: A Review. *Food Technology and Biotechnology*. 56 (3) 289-311. doi: 10.17113/ftb.56.03.18.5546
- Cáceres, C. X., Cáceres, R. E., Hein, D., Molina, M. G., Pia, J. M. (2012). Biogas production from grape pomace: thermodynamic model of the process and dynamic model of the power generation system. *International Journal of Hydrogen Energy*. 37, 10111-10117.
- Campos, F.M., Couto, J.A., Figueiredo, A.R., Toth, IV, Rangel, A.O., Hogg, T.A. (2009). Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*. 135(2) 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.031>.
- Carvalho, F., Duarte, L.C., Gírio, F.M. (2008). Hemicellulose biorefineries: A review on biomass pretreatments. *J Sci Ind Res (India)*. 67,849–64.
- Caspeta, L., Castillo, T., Nielsen, J. (2015). Modifying yeast tolerance to inhibitory conditions of ethanol production processes. *Front Bioeng Biotechnol*. 3:184.
- Celton, M., Goelzer, A., Camarasa, C., Fromion, V., Dequin, S. (2012). A constraint-based model analysis of the metabolic consequences of increased NADPH oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*. 14, 366–379. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2012.03.008>.
- Chen, X., Shekiri, J., Franden, M.A., y col. (2012). The impacts of deacetylation prior to dilute acid pretreatment on the bioethanol process. *Biotechnol Biofuels*. 5:8.
- Chen, H., Fu, X., (2016). Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 57, 468–478. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.069>
- Christopher, L.P., Yao, B., Ji, Y. (2014). Lignin biodegradation with laccase-mediator systems. *Front Energy Res*. 2:12.
- Chu, B.C., Lee, H. (2007). Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. *Biotechnol Adv*. 25 (5) 425–41. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.04.001>.
- Claassen, P.A.M., van Lie, r J.B., Lopez Contreras, A., van Nie, l E.W.J., Sijtsma, L., Stams, A.J.M., y col. (1999). Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Appl Microbiol Biotechnol*. 52 (6)741–55. <https://doi.org/10.1007/s002530051586>.
- Cunha, J.T., Romani1, A., Costa C.E., Isabel Sá-Correia, I., Domingues, L. (2019). Molecular and physiological basis of *Saccharomyces cerevisiae* tolerance to adverse lignocellulose-based process conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 103,159–175. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9478-3>.
- Corbin, K. R., Hsieh, Y. S. Y., Betts, N. S., Byrt, C. S., Henderson, M., Stork, J., DeBolt, S., Fincher, G. B., & Burton, R. A. (2015). *Grape marc as a source of carbohydrates for bioethanol: Chemical composition, pre-treatment and saccharification*. *Bioresource Technology*, 193, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.030>
- Della-Bianca, B.E., Basso, T.O., Stambuk, B.U., y col. (2013). What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? *Appl Microbiol Biotechnol*. 97:979–991.

Ding, M.Z., Wang, X., Yang, Y., Yuan, Y.J. (2011). Metabolomic study of interactive effects of phenol, furfural, and acetic acid on *Saccharomyces cerevisiae*. *OMICS* 15 (10) 647–653. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0003>.

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2020). *InfoStat versión 2020* [Software]. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. <https://www.infostat.com.ar>

Espinosa-Negrín, A.M., López-González, L.M., Casdelo-Gutiérrez, N.L. (2022). Pretratamientos aplicados a biomásas lignocelulósicas: una revisión de los principales métodos analíticos utilizados para su evaluación. *Revista Cubana de Química*. 34 (1) 87-110.

Favaro, L., Basaglia, M., Trento, A. *et al.* (2013). Exploring grape marc as a source for new thermotolerant and inhibitor-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation bioethanol production. *Biotechnol Biofuels*. 6, 168 (2013). <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-168>

Favaro, L., Jansen, T., van Zyl, W.H. (2019) Exploring industrial and natural *Saccharomyces cerevisiae* strains for the bio-based economy from biomass: the case of bioethanol, *Critical Reviews in Biotechnology*. 39 (6) 800-816. DOI: 10.1080/07388551.2019.1619157.

Fontana, A., Antonioli, A., Bottini, R. (2013). Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61, 8987–9003.

Foretek, D., Wu, J., Hopper, A.K., Boguta, M. (2016). Control of *Saccharomyces cerevisiae* pre-tRNA processing by environmental conditions. *RNA* 22:339–349. <https://doi.org/10.1261/rna.054973.115>.

Godinho, C.P., Prata, C.S., Pinto, S.N., Cardoso, C., Bandarra, N.M., Fernandes, F., Sá-Correia, I. (2018). Pdr18 is involved in yeast response to acetic acid stress counteracting the decrease of plasma membrane ergosterol content and order. *Sci Rep* 8(1) 7860. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26128-7>.

Goyal, S., Esposito, M., Kapoor, A. (2018) Circular economy business models in developing economies: lessons from India on reduce, recycle, and reuse paradigms. *Thunderbird Int Bus Rev*. 60 (5)729–740. <https://doi.org/10.1002/tie.21883>.

Guo, Z., Olsson, L. (2014). Physiological response of *Saccharomyces cerevisiae* to weak acids present in lignocellulosic hydrolysate. *FEMS Yeast Res*. 14(8):1234–1248. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12221>.

Hasunuma, T., & Kondo, A. (2012). Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1207–1218. Describe diferencias de tolerancia entre cepas industriales y de laboratorio de *S. cerevisiae* en respuesta a inhibidores del pretratamiento.

Haq, F., Ali, H., Shuaib, M., Badshah, M., Hassan, S.W., Munis, M.F.H., Chaudhary, H.J. (2016). Recent progress in bioethanol production from lignocellulosic materials: A review. *Int J Green Energy*. 13 (14) 1413–41. <https://doi.org/10.1080/15435075.2015.1088855>

Heipieper, H.J., Weber, F.J., Sikkema, J., y col. (1994). Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends Biotechnol*. 12, 409–415.

Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., Cabisco, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta*. 1780 (11) 1217–1235. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.12.004>.

Hou, J., Qiu, Z., Han, H., & Zhang, Q. (2018). Toxicity evaluation of lignocellulose-derived phenolic inhibitors on *Saccharomyces cerevisiae* growth by using the QSTR method. *Chemosphere*, 201, 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.008>

Ingledew, W. (2017). Very high gravity (VHG) and associated new technologies for fuel alcohol production. In: Walker G.M., Abbas, C., Ingledew, W.M., Pilgrim, C., editors, *The alcohol textbook*. 6th ed. Duluth: Lallemand Biofuels & Distilled Spirits. 363–376.

Iyyappan, J., Gurunathan, B., Gopinath, M., Vaishnavi, A., Prathiba, S., Kanishka, V., Gomathi, K., Dhithya, V. (2022) Advances and sustainable conversion of waste lignocellulosic biomass into biofuels. In: Gurunathan B, Sahadevan R (eds) *Biofuels and bioenergy*. Elsevier, Amsterdam, pp 167– 206. <https://doi.org/10.1016/C2020-0-02574-0>.

Jansen, M.L.A., Bracher, J.M., Papapetridis, I., y col. (2017). *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation ethanol production: from academic exploration to industrial implementation. *FEMS Yeast Res*. 17:fox044.

Jin, Q., O’Hair, J., Stewart, A.C., O’Keefe, S.F., Neilson, A.P., Kim, Y.T., McGuire, M., Lee, A., Wilde, r G., Huang, H. (2019) Compositional characterization of diferent industrial white and red grape pomaces in Virginia and the potential valorization of the major components. *Foods*. 8 (12) 667. <https://doi.org/10.3390/foods8120667>.

Jobling, S. (2004). Improving starch for food and industrial applications. *Curr Opin Plant Biol*. 7 (2) 210–8. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2003.12.001>.

Jofre, C., Campderrós, M.E., Rinaldoni, A.N. (2022). Valorización de subproductos: el orujo de uva como ingrediente funcional. *Publitéc S.A.E.C.Y.M; La alimentación Latinoamericana*. 364, (12) 44-50.

Jonsson, L.J., Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresour Technol*. 199:103–112.

Kang, Q., Appels, L., Tan, T., Dewil, R. (2014). Bioethanol from lignocellulosic biomass: Current findings determine research priorities. *Sci World J*. Article ID 298153. <https://doi.org/10.1155/2014/298153>.

Keating, J.D., Panganiban, C., Mansfield, S.D. (2006). Tolerance and adaptation of ethanologenic yeasts to lignocellulosic inhibitory compounds. *Biotechnol Bioeng* 93 (6) 1196–1206. <https://doi.org/10.1002/bit.20838>.

Kim, D., Hahn, J-S. (2013). Roles of the Yap1 transcription factor and antioxidants in *Saccharomyces cerevisiae*’s tolerance to furfural and 5-hydroxymethylfurfural, which function as thiol-reactive electrophiles generating oxidative stress. *Appl Environ Microbiol*. 79 (16) 5069–5077. <https://doi.org/10.1128/aem.00643-13>.

Klinke, H.B., Olsson, L., Thomsen, A.B., Ahring, B.K. (2003). Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: wet oxidation and fermentation by yeast. *Biotechnol Bioeng*. 81 (6) 738–747. <https://doi.org/10.1002/bit.10523>.

Klinke, H.B., Thomsen, A.B., Ahring, B.K. (2004). Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl Microbiol Biotechnol.* 66,10–26.

Koedrith, P., Dubois, E., Scherens, B., Jacobs, E., Boonchird, C., Messengu, F. (2008). Identification and characterization of a thermotolerant yeast strain isolated from banana leaves. *Science Asia.* 34, 147-152. doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2008.34.147.

Kokkinomagoulos, E., Kandylis, P. (2023). Grape Pomace, an Undervalued By-Product: Industrial Reutilization within a Circular Economy Vision. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology.* 22, 739-773.

<https://doi.org/10.1007/s11157-023-09665-0>.

Kootstra, A.M.J., Beeftink, H.H., Scott, E.L., Sanders, J.P.M. (2010). Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Biochem Eng J.* 46 (2) 126–31. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.04.020>.

Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J., Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind Eng Chem Res.* 48 (8) 3713–29. <https://doi.org/10.1021/ie801542g>.

Law, L., Gutierrez, N. (2013). Butanol production by submerged fermentation of white grape pomace. *Current Biotechnology.* 2, 114-116.

Lin, Y., & Tanaka, S. (2006). *Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 627–642. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0229-X>.

Ling, K.C. (2008). Whey to ethanol: A biofuel role for dairy cooperatives?. USDA Rural Development: Research Report 214. Available from: <http://www.rd.usda.gov/files/RR214.pdf>.

Luo, P., Liu, Z., Yang, C., Wang, G. (2008). Study of simultaneous saccharification and fermentation for steam exploded wheat straw to ethanol. *Front Chem Eng China.* 2, 447–451. doi: 10.1007/s11705-008-0069-1.

Mohamed Ahmed, I.A., Özcan, M.M., Al Juhaimi, F., Babiker, E.F.E., Ghafoor K., Banjanin, T., Osman, M.A., Gassem, M.A., Alqaf, H.A.S. (2020). Chemical composition bioactive compounds mineral contents and fatty acid composition of pomace powder of diferent grape varieties. *Journal Food Process Preserve.* 44 (7) e14539. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14539>.

Morano, K.A., Grant, C.M., Moye-Rowley, W.S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 190,1157–1195. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128033>.

Mosier N., Wyman, C., Dale, B.D., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol.* 96(6):673–86. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>.

Mussatto, S.I., Dragone, G., Guimarães, P.M.R., Silva, J.P.A., Carneiro, L.M., Roberto, I.C., et al. (2010). Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnol Adv.* 28 (6), 817–30. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.001>.

Nguyen, T.T., Kitajima, S., Izawa, S. (2014a). Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) for vanillin tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng.* 118 (3) 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.02.025>.

Nguyen, T.T.M., Iwaki, A., Ohya, Y., Izawa, S. (2014b). Vanillin causes the activation of Yap1 and mitochondrial fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng.* 117 (1) 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.06.008>.

Öhgren, K., Vehmaanperä, J., Siika-Aho, M., Galbe, M., Viikari, L., Zacchi, G. (2007). High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated corn stover for ethanol production. *Enzyme Microb Technol.* 40 (4) 607–13. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.05.014>.

Palma, M., Guerreiro, J.F., Sa-Correia, I. (2018). Adaptive response and tolerance to acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*: a physiological genomics perspective. *Front Microbiol.* 9:274. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00274>.

Palmqvist, E., Grage, H., Meinander, N.Q., Hahn-Hägerdal, B. (1999). Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnol Bioeng.* 63 (1) 46–55. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)10970290\(19990405\)63:13.O.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)10970290(19990405)63:13.O.CO;2-J).

Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresour Technol.* 74,17–24.

Pampulha, M.E., Loureiro-Dias, M.C. (1990) Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 34 (3),375–380. <https://doi.org/10.1007/bf00170063>.

Paniagua-Garcia, A.I. Hijosa-Valsero, M., Diez-Antolinez, R., Sanchez, M.E. Coca, M. (2018). Enzymatic hydrolysis and detoxification of lignocellulosic biomass are not always necessary for ABE fermentation: the case of *Panicum virgatum*. *Biomass Bioenergy.* 116, 131–139.

Pereira, F.B., Guimarães, P.M.R., Teixeira, J.A., Domingues, L. (2010c). Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains for efficient very high gravity bio-ethanol fermentation processes. *Biotechnol Lett.* 32, 1655–1661. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0330-9>.

Pienkos P.T., Zhang, M. (2009). Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. *Cellulose.* 16,743–762.

Quintero, J.A., Cardona, C.A. (2011). Process simulation of fuel ethanol production from lignocellulosics using aspen plus. *Ind Eng Chem Res.* 50 (10) 6205–12. <https://doi.org/10.1021/ie101767x>.

Rea Rosero, V.J., Carrera, J.A., Chimbo, J.E., Pilco, C.J., Guana, D.M. (2022). Obtaining of bioethanol from lignocellulosic agricultural waste. *Studies in Environmental and Animal Sciences.* 3 (3), 784-803. DOI: 10.54020/seasv3n3-023.

Riaño, A. S., Morales, A. G., Hernández, J. M., Barrero, C. R. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Tumbaga,* 1(5), 61-91.

Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv.* 27 (2) 185–94. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>.

Saucedo Gutiérrez, J. J. (2024). Efecto del furfural y el ácido acético en la fermentación y bioenergética de *Scheffersomyces stipitis* y *Saccharomyces cerevisiae* (Tesis de grado, Ingeniero en Biotecnología). Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química. <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/10400>.

Senthilkumar, V., Gunasekaran, P. (2009). Bioethanol from biomass production of ethanol from molasses. In: Pandey A, editor. Handbook of plant-based biofuels. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. 73–86.

Soccol, C.R., Faraco, V., Karp, S., Vandenberghe, L.P.S., Thomaz-Soccol, V., Woiciechowski, A., Pandey, A. (2011). Lignocellulosic bioethanol: Current status and future perspectives. In: Pandey A, Larroche C, Ricke SC, Dussap CG, Gnansounou E, editors. Biofuels – Alternative feedstocks and conversion processes. Oxford, UK: Academic Press. 101–22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00005-X>.

Solomon, B.D., Barnes, J.R., Halvorsen, K.E. (2007). Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy. Biomass Bioenergy. 31 (6) 416–25. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.01.023>.

Sun, Y., Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. Bioresour Technol. 83(1) 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7).

Talebnia, F., Karakashev, D., Angelidaki, I. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. Bioresour Technol. 101(13) 4744–53. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.080>.

Taylor, M.P., Eley, K.L., Martin, S., Tuffin, M.I., Burton S.G., Cowan, D.A. (2009). Thermophilic ethanologenes: future prospects for second-generation bioethanol production, doi: 10.1016/j.tibtech.2009.03.006. Trends Biotechnol. 27 (7) 398-405.

Tomás-Pejó, E, Alvira P, Ballesteros M, Negro MJ. (2011). Pretreatment technologies for lignocellulose-to-bioethanol conversion. In: Pandey A, Larroche C, Ricke SC, Dussap CG, Gnansounou E, editors. Biofuels – Alternative feedstocks and conversion processes. Oxford, UK: Academic Press. pp. 149–76. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00007-3>.

Toscano, G., Riva, G., Duca, D., Foppa Pedretti, E., Corinaldesi, F., Rossini, G. (2013). Analysis of the characteristics of the residues of the wine production chain finalized to their industrial and energy recovery. Biomass Bioenergy. 55, 260–267, doi: 10.1016/j.biombioe.2013.02.015

Ullah, A., Orij, R., Brul, S., Smits, G.J. (2012). Quantitative analysis of the modes of growth inhibition by weak organic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Environ Microbiol. 78 (23) 8377– 8387. <https://doi.org/10.1128/AEM.02126-12>.

Vergheze, J., Abrams, J., Wang, Y., Morano, K.A. (2012). Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system. Microbiol Mol Biol Rev. 76, 115–158. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05018-11>.

Walker, G.M., Brosnan, J.M., Bringhurst, T.A., y col. (2012). Selecting new distilling yeasts for improved fermentation and for sustainability. In: Walker GM, Fotheringham R, Goodall IH, Murray D. Editors. Distilled spirits: science and sustainability. Nottingham: Nottingham University Press/The Institute of Brewing and Distilling. 1–10.

Wang, X., Liang, Z., Hou, J., Bao, X., Shen, Y. (2016). Identification and functional evaluation of the reductases and dehydrogenases from *Saccharomyces*

cerevisiae involved in vanillin resistance. *BMC Biotechnol.* 16:31. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0264-y>.

West, T.P., Kennedy, I.I. (2014). Isolation of thermotolerant yeast strains for ethanol production: A need for new approaches. *J Microb Biochem Technol.* 6: 120. doi: 10.4172/1948-5948.

Woo, J.M., Yang, K.M., Kim, S.U., Blank, L.M., Park, J.B. (2014) High temperature stimulates acetic acid accumulation and enhances the growth inhibition and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* under fermenting conditions. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98:6085– 6094. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5691-x>.

Xie. R., Tu, M., Elder, T. (2016). Substituent effect of phenolic aldehyde inhibition on alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Energy Fuels.* 30, 3078–3084.

Yan J., Hu Z., Pu Y., Brummer, E.C., Ragauskas, A.J. (2010). Chemical composition of four switchgrass populations. *Biomass Bioener.* 34, 48-53.

Zacharof, M.P. (2017). Grape winery waste as feedstock for bioconversions: applying the biorefinery concept. *Waste Biomass Valorization.* 8 (4) 1011–1025. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9674-2>.

Zeng, J., Zeng, H., Wang, Z. (2022). Review on technology of making biofuel from food waste. *International Journal Energy Resource.* 46 (8) 10301–10319. <https://doi.org/10.1002/er.7868>.