



**Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de
Jalisco A.C.**

Unidad de Biotecnología industrial

Producción de los aromas 2-Feniletanol y 2-Feniletilacetato
mediante levaduras no-*Saccharomyces* a partir de vinazas tequileras.

MCA José de Jesús Rodríguez Romero

Comité de tesis:

Director: Dr. Javier Plácido Arrizon Gaviño

Co-directora: Dra. Lorena Amaya Delgado

Asesora interna: Dra. Anne Gschaedler Mathis

Asesor Externo: Dr. César Arturo Aceves Lara

Asesora externa: Dra. Cristina Ferreira Silva

Agradecimientos

A mis padres y mi hermana, los pilares que siempre han sido mi apoyo.

A mi futura esposa, que siempre creyó en mí y me apoyó para que emprendiera este viaje que fue el doctorado.

También quiero agradecer a las diversas instituciones que me apoyaron a lo largo de mi formación, sobre todo a los miembros de mi comité, por ayudarme a crecer como profesional.

Este trabajo fue apoyado a través del programa de becas CONACYT con número de registro 291137; El fondo FSE-CONACYT-SENER de los proyectos 248090 y 245750, así como al programa “Plan de Movilidad AGARED 2017”, y finalmente al CIATEJ, por el apoyo económico y la oportunidad de formar parte del plantel como estudiante.

Resumen

Las vinazas son desechos líquidos del proceso de la producción de tequila, las cuales provocan un severo impacto ambiental cuando son vertidas sin ningún tratamiento previo, por lo que una opción para el uso de estos residuos es obtener productos de valor agregado derivados de procesos fermentativos del metabolismo de microorganismos tales como las levaduras, produciendo compuestos como el 2-feniletanol (2-PE) y el 2-feniletacetato (2-PEA), moléculas aromáticas utilizados en diversas aplicaciones industriales.

En este estudio, se evaluaron 4 especies de levaduras (*Wickerhamomyces anomalus*, *Candida glabrata*, *Candida utilis*, y *Candida parapsilosis*) en dos medios químicamente definidos, así como vinazas de tequila como medio de cultivo. Los resultados obtenidos demuestran una tolerancia moderada al aumento de la concentración del 2-PE, con una concentración de hasta 1 g/L para la levadura *C. glabrata*, mientras que la levadura *W. anomalus* logró continuar con su crecimiento en la concentración máxima de 3 g/L.

En los estudios realizados se encontraron diferencias en la producción de los compuestos aromáticos, dependiendo del medio y la especie de levadura evaluada. En las vinazas tequileras, la mayor concentración del éster 2-PEA (65mg/L) fue obtenida con la levadura *C. glabrata*, y se encontró que la presencia de compuestos inhibidores disminuyó la producción de biomasa y la síntesis de estos compuestos. Durante las fermentaciones con vinazas tequileras, la demanda química y bioquímica de oxígeno se redujo en más del 50%. Es por ello, que las vinazas tequileras son adecuadas para producir este tipo de metabolitos de interés industrial, tales como el 2-PE y 2-PEA, los cuales se encontró que pueden ser obtenidos a partir de la ruta del shikimato.

Como resultados importantes se encontró que fue posible obtener un punto de partida viable para el mejoramiento en la producción de estos compuestos aromáticos a través de una red metabólica utilizando la herramienta de Análisis de Balance de Flujos (FBA por sus siglas en inglés), el cual fue validado a partir de los datos experimentales obtenidos en las pruebas de fermentación con medios

definidos y vinazas tequileras, ya que se logró incrementar la concentración de este metabolito a las 72 horas de fermentación con un máximo de 330 mg/L, el cual representa un aumento del 478%.

Contenido

Agradecimientos	2
Resumen.....	3
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES	9
1.1 Tequila: Generalidades, elaboración y producción.....	9
1.2 Vinazas.....	10
1.2.1 Composición	11
1.2.2 Impacto ecológico	13
1.3 Compuestos aromáticos fenólicos y alcoholes superiores	14
1.3.1 Obtención y rutas de síntesis de alcoholes superiores y sus ésteres	14
1.4 Levaduras <i>no-Saccharomyces</i>	19
1.5 Modelado metabólico de levaduras no-convencionales	20
1.5.1 Principios del modelado basado en restricciones.....	20
1.5.2 Herramientas y bases de datos para la reconstrucción de redes metabólicas.....	22
1.5.3 Análisis de balance de flujos	23
1.5.4 Modos elementales de flujo.....	24
1.6 Diseños experimentales en bioprocesos.....	25
CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN	27
CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS.....	28
CAPÍTULO 4. OBJETIVOS	29
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	29
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
CAPÍTULO 5. METODOLOGÍA	30
5.1 Microorganismos.....	30
5.2 Evaluación del crecimiento de levadura en medio químicamente definido.....	31
5.3 Evaluación de la capacidad nativa de levaduras <i>no-Saccharomyces</i> en la producción de 2-feniletanol y 2-fenietilacetato.....	32
5.4 Caracterización fisicoquímica de vinazas tequileras.....	33
5.5 Evaluación de la capacidad nativa de levaduras <i>no-Saccharomyces</i> en la producción de 2-feniletanol y 2-fenietilacetato a partir de vinazas tequileras	34
5.5.1 Evaluación en la reducción de la demanda química y bioquímica de oxígeno por levaduras durante la fermentación de vinazas tequileras.....	34
5.6 Cromatografía de Gases	35
5.7 Modelado de la red metabólica de levaduras <i>no-Saccharomyces</i>	36

5.8 Pruebas de inhibición del 2-feniletanol sobre el crecimiento de levaduras no-convencionales	36
5.9 Planteamiento del diseño experimental y condiciones de cultivo para el incremento de la producción de 2-feniletanol	38
CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
6.1 Evaluación de la producción de 2-feniletanol y 2-feniletilacetato en condiciones de catabolismo y síntesis De Novo.....	41
6.2 Caracterización fisicoquímica de vinazas tequileras	44
6.3 Fermentaciones de levaduras no-convencionales en vinazas tequileras para la producción de 2-feniletanol y 2-feniletilacetato.....	49
6.3.1 Reducción de la demanda Química y Bioquímica de Oxígeno de vinazas tequileras	52
6.4 Modelado metabólico y análisis de Modos Elementales.....	53
6.5 Pruebas de inhibición del 2-feniletanol sobre el crecimiento de levaduras no-convencionales	61
6.6 Planteamiento del diseño experimental y condiciones de cultivo para el incremento de la producción de 2-feniletanol.....	67
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES	75
CAPÍTULO 8. Perspectivas futuras.....	77
8.1 Enfoque del análisis de transcriptoma de <i>W. anomalus</i>	77
8.1.1 Diseño experimental del análisis de transcriptoma de <i>W. anomalus</i>	78
8.2 Enfoque de la recuperación del producto 2-Feniletanol	80
CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA.....	82
CAPÍTULO 10. APÉNDICES	91
Apéndice 1 Composición del medio químicamente definido.	91
Apéndice 2 Medición de azúcares reductores con Ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS).....	92
Apéndice 3 Análisis de muestras por HPLC.....	93
Apéndice 3.1 Columna 87H (Carbohidratos y Ácidos Orgánicos)	93
Apéndice 3.2 Columna 18C (Inhibidores).....	95
Apéndice 4 Abreviaciones y conjunto de reacciones de la red metabólica construida.....	97

Índice de figuras

FIGURA 1	15
FIGURA 2	16
FIGURA 3	18
FIGURA 4	30
FIGURA 5	37
FIGURA 6	50
FIGURA 7	53
FIGURA 8	54
FIGURA 9	56
FIGURA 10	59
FIGURA 11	61
FIGURA 12	62
FIGURA 13	63
FIGURA 14	64
FIGURA 15	67
FIGURA 16	69
FIGURA 17	71
FIGURA 18	72
FIGURA 19	74
FIGURA 20	78

Índice de tablas

TABLA 1 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LAS VINAZAS TEQUILERAS (ADAPTADO DE LÓPEZ-LÓPEZ Y COL., 2010).....	12
TABLA 2 LISTA DE LEVADURAS NO-SACCHAROMYCES ESTUDIADAS.....	31
TABLA 3 CONDICIONES DE LAS VARIABLES CON SUS DIFERENTES NIVELES PARA LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS A PARTIR DE VINAZAS TEQUILERAS.....	39
TABLA 4 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS	40
TABLA 5 EVALUACIÓN DE LOS AZÚCARES CONSUMIDOS, RENDIMIENTOS DE BIOMASA, PRODUCCIÓN DE 2-FENILETANOL (2-PE) Y 2-FENILETILACETATO (2-PEA) POR LEVADURAS EN DIFERENTES MEDIOS.	41
TABLA 6 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS DIFERENTES VINAZAS TEQUILERAS.....	46
TABLA 7 COMPUESTOS INHIBIDORES PRESENTES EN VINAZAS TEQUILERAS.....	48
TABLA 8 ANÁLISIS DE MODOS ELEMENTALES (EMs) DEL METABOLISMO DE LEVADURAS NO CONVENCIONALES.....	60
TABLA 9 INHIBICIÓN POR 2-PE POR PRUEBAS CUALITATIVAS	61
TABLA 10 VELOCIDADES ESPECÍFICAS DE CRECIMIENTO DE LEVADURAS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES INICIALES DE 2-PE	64
TABLA 11 CUANTIFICACIÓN DE ETANOL, 2-PE Y 2-PEA EN LAS CINÉTICAS DE INHIBICIÓN DE LAS LEVADURAS A) C. GLABRATA Y B) W. ANOMALUS	66
TABLA 12 RESULTADOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS	68
TABLA 13 CONDICIONES DE LOS ESTADOS A EVALUAR PARA EL ANÁLISIS DE TRANSCRIPTOMA.....	79

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1 Tequila: Generalidades, elaboración y producción

La bebida del Tequila es un destilado de origen mexicano del jugo de agave fermentado. El destilado se obtiene específicamente después de la fermentación de jugo del agave Azul (*Agave tequilana* Weber var. azul). Este producto cuenta con una “denominación de origen”, lo cual limita su producción y cultivo a la región este de México, en el estado de Jalisco y algunas localidades del Estado de Tamaulipas, Nayarit, Michoacán y Guanajuato (Villanueva-Rodríguez et al., 2016).

La elaboración de Tequila, así como sus parámetros de calidad se encuentran especificados en la legislación mexicana por medio de la ‘Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012, Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones.’ De acuerdo a esta norma, el Tequila puede ser clasificado en dos categorías: Tequila 100% y Tequila. La diferencia radica en el porcentaje de azúcares derivados de la planta de agave que sean utilizados en la producción del Tequila; ya que en el Tequila 100%, los azúcares deben provenir exclusivamente de la planta de *A. tequilana*; esta especie se caracteriza por la síntesis y acumulación de un carbohidrato de reserva; fructanos altamente ramificados que algunos autores han llamado con el nombre de agavinas (Crispín-Isidro et al., 2014; French, 1989; Pollock & Chatterton, 1988; Praznik et al., 2013) , mientras que en el Tequila es posible la adición de hasta un 49% de azúcares fermentables de una fuente externa al jugo de agave. La fermentación, como en todas las bebidas alcohólicas, es una etapa clave en la elaboración del Tequila. En esta etapa, los azúcares del agave son metabolizados en etanol, dióxido de carbono, y otros compuestos responsables de las características sensoriales por la acción de diversos microorganismos, especialmente las levaduras.

1.2 Vinazas

Las vinazas son el residuo final de la destilación del etanol y de varios compuestos aromáticos, sus características y composición dependen principalmente de la materia prima utilizada en el proceso de destilación del que provienen. La utilización de azúcar de caña, remolacha y agave da como resultado vinazas con un alto contenido de sólidos solubles (España-Gamboa et al., 2011). Se caracterizan por contener altos niveles de materia orgánica e inorgánica, una alta temperatura de salida del proceso ($>90^{\circ}\text{C}$) y un bajo pH (3.0-4.5) (Carvajal-Zarrabal et al., 2012), lo cual resulta en un desecho extremadamente agresivo con el medio ambiente, ya que la mayor parte de las veces, estos efluentes no reciben el tratamiento adecuado previo a su descarga en los cuerpos acuíferos. Resulta interesante y además alarmante, el hecho de la presencia de un extenso vacío de información en el tratamiento o aprovechamiento de estos residuos industriales.

Diversos estudios han evaluado y establecido estrategias para el tratamiento de estos desechos bajo diferentes perspectivas. España-Gamboa et al. (2011) presentan una recopilación de los tratamientos aplicados a las vinazas en los últimos años, donde se incluyen procesos químicos, fisicoquímicos y biológicos, destacando la reducción de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) por medio de fermentaciones con bacterias, hongos y levaduras.

Bajo este mismo enfoque, López-López (2010) analizó diferentes opciones de tratamiento, y donde se propone 5 casos de escalamiento, ya que las tecnologías más empleadas en el tratamiento de aguas no son eficaces para los residuos de las vinazas; concluyendo que los más prometedores son aquellos que involucran un proceso biológico anaerobio y uno químico oxidativo.

1.2.1 Composición

Las vinazas, residuos provenientes de la destilación en el proceso de elaboración de bebidas alcohólicas como el tequila, consisten principalmente en lodos de la destilación, y son los principales contribuyentes del volumen y carga de materia orgánica, aun cuando existen otros componentes que usualmente contribuyen al volumen y a la heterogeneidad del efluente.

Entre estos componentes pueden encontrarse los flujos de la limpieza de la fermentación, (bajos en volumen, sin embargo, la materia orgánica puede alcanzar alrededor de 5000 mg/L de demanda química de oxígeno (DQO)), tales como condensados, agua de enfriamiento, etc. (Christofolletti et al., 2013).

Las vinazas generalmente contienen altas concentraciones de sólidos disueltos, tal como se puede observar en la Tabla 1, y de los cuales el 50% pueden llegar a ser compuestos no volátiles provenientes de la fermentación, azúcares reductores, compuestos fenólicos y polifenólicos, además de altas concentraciones de sales minerales (CIATEJ, 2015). Presentan un carácter ácido, con un pH que oscila entre 3.5 a 5, y tienen una coloración marrón oscura debido a la presencia de compuestos fenólicos (como ácidos tánico y húmico) y melanoidinas (Carvajal-Zarrabal et al., 2012; López-López, 2010; Salgado José et al., 2010).

Como contaminantes orgánicos son muy agresivas, debido a sus altos valores de demanda bioquímica de oxígeno (35,000-50,000 mg O₂/L). Dadas estas características, las vinazas son efluentes peligrosos y recalcitrantes, cuyo depósito en cuerpos acuáticos y suelos causa un severo impacto ambiental (Robles-González et al., 2012).

Tabla 1 Características fisicoquímicas de las vinazas tequileras (Adaptado de López-López y col., 2010).

Parámetro	Vinazas Tequileras 100% Agave		Vinazas Tequileras 51% Agave	
	Intervalo de Valores	Valor Promedio ¹	Intervalo de Valores	Valor Promedio ²
pH (U.P)	3.4 - 4.5	3.5	3.2 - 4.5	3.6
Grasa y Aceites (mg/L)	10 - 100	86	10 - 120	116.00
DBO Total (mg/L)	35,000 - 60,000	39,041	16,000 - 36,000	26,300
DBO Soluble (mg/L)	25,000 - 50,000	32,423	14,000 - 35,000	25,500
DQO Total (mg/L)	60,000 - 100,000	72,820	28,000 - 68,000	44,560
DQO Soluble (mg/L)	40,000 - 80,000	56,809	25,000 - 65,000	41,600
Sólidos Totales (mg/L)	25,000 - 50,000	43,757	35,058.00	28,559
Sólidos Suspendidos Totales (mg/L)	2,000 - 8,000	6,482	1,000 - 10,000	1,700
Sólidos Suspendidos Fijos (mg/L)	10 - 500	418	20 - 2,000	100
Sólidos Suspendidos Volátiles (mg/L)	1,990 - 7,500	6,063	980 - 8,000	1,600
Sólidos Disueltos Totales (mg/L)	23,000 - 24,000	37,275	24,258.00	26,859
Sólidos Sedimentables (ml/L)	10 - 900	329	2 - 600	150
Alcalinidad Total (mg/L)	< 6.00	2	< 6.00	2
Acidez Total (mg/L)	1,500 - 6,000	2816	150 - 1,500	335,40
Acidez Fija (mg/L)	1,480 - 5,800	2198	100 - 1200	270,00
Acidez Volátil (mg/L)	20 - 200	45	20 - 100	65,40
Calcio (mg/L)	200 - 1,100	507	200 - 1,100	270
Magnesio (mg/L)	100 - 300	141	100 - 300	230
Potasio (mg/L)	150 - 650	374	150 - 650	348
Sulfatos (mg/L)	0.3 - 0.3	0.78	0.3 - 0.3	0.88
Fosfatos Totales (mg/L)	100 - 700	264	100 - 700	0.78
Nitrógeno Total (mg/L)	20 - 150	67	20 - 150	86.10
Nitrógeno Orgánico (mg/L)	20 - 100	49	20 - 100	80.50
Nitrógeno Amoniacal (mg/L)	15 - 14	33	15 - 14	5.60
Azúcares Reductores Totales (% peso)	0.5 - 2.0	1.58	0.5 - 10.0	2.50
Azúcares Directos (% peso)	0.4 - 1.0	1.15	0.4 - 1.0	0.30
Cobre (mg/L)	< 0.3	1.17	< 3.0	0.90
Níquel (mg/L)	< 0.02	0.01	< 0.02	0.01
Hierro (mg/L)	< 45	13.80	< 80	3810
Zinc (mg/L)	< 1.0	0.35	< 1.0	0.20

1. Promedio de cinco muestras de vinazas
2. Promedio de tres muestras de vinazas

De acuerdo a López-López (2010), se ha demostrado que la composición final de las vinazas, depende de las materias primas empleadas en la elaboración de los dos tipos de tequila; encontrándose diferencias en parámetros fisicoquímicos importantes que repercuten en la viabilidad para la utilización de procesos biológicos para tratar efluentes tequileros.

1.2.2 Impacto ecológico

La descarga descontrolada de vinazas en los suelos puede afectar de manera negativa en su calidad, el contenido de sales minerales y su alta acidez puede afectar la salinidad y basicidad del suelo, provocando un deterioro en la estructura, porosidad y fertilidad del suelo. Del mismo modo, el alto contenido de sólidos produce un “taconamiento” en los suelos, dando lugar a condiciones anaeróbicas, las cuales repercuten en un efecto de toxicidad en los cultivos por la acumulación de una gran variedad de sustancias generadas en la fermentación, como ácido acético, ácido láctico, glicerol y nitrógeno amoniacal (Yavuz, 2007).

Debido a que las vinazas abandonan las industrias a temperaturas alrededor de los 50-80 °C, pueden incrementar la temperatura del cuerpo acuático que las recibe, disminuyendo el oxígeno disuelto por debajo del nivel crítico para la supervivencia de los peces (Alves et al., 2015; Christofolletti et al., 2013).

Por otro lado, la turbidez y el color asociado al contenido de melanoidinas y el contenido de sólidos solubles en las vinazas, dificultan la penetración de la luz solar, afectando los procesos fotosintéticos de la vida acuática (Robles-González et al., 2012).

Aun cuando algunos países han tomado medidas más severas con estándares más estrictos para la descarga de efluentes provenientes de la destilación de alcohol (Asghar et al., 2008), en México aún no se cuenta con una legislación actualizada que regule de manera adecuada el tratamiento de estos residuos.

1.3 Compuestos aromáticos fenólicos y alcoholes superiores

Los polifenoles son un conjunto muy heterogéneo de moléculas que presentan en su estructura una serie de grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas. Estos compuestos fenólicos participan en numerosos procesos fisiológicos de los vegetales, siendo sintetizados por una vía metabólica común a partir de la fenilalanina (del Pozo Bayón, 2011); Por otro lado, los alcoholes superiores no se obtienen mediante la cinética habitual de la fermentación alcohólica sino que aparecen principalmente durante su curso catabólicamente, a través de una desaminación de aminoácidos utilizados por las levaduras para obtener nitrógeno amoniacal (Alvarez, 2005). Sin embargo, además de la síntesis a partir del catabolismo de aminoácidos, en levaduras existe una ruta complementaria, conocida como vía del Shikimato, en donde en condiciones de deficiencia de nitrógeno, es posible dirigir el flujo de carbono a la síntesis de aminoácidos aromáticos que posteriormente se integran a la vía catabólica en el metabolismo del nitrógeno (Haibo et al., 2014; Kim et al., 2014). Ambos procesos se mencionan a mayor detalle en la siguiente sección.

1.3.1 Obtención y rutas de síntesis de alcoholes superiores y sus ésteres

Las levaduras sintetizan estos alcoholes por la descarboxilación de los cetoácidos, seguida de una reducción del aldehído al alcohol correspondiente. Los cetoácidos se sintetizan por dos vías: catabólica, a partir de los aminoácidos, o anabólica, a partir de los azúcares disponibles; ambas vías pueden coexistir durante el proceso de la fermentación, sin embargo, la contribución relativa de cada vía depende del nivel y la composición de nitrógeno asimilable, así como de la oxigenación, la temperatura, y de la concentración de ácidos grasos y ácido pantoténico. Los principales alcoholes superiores son: el isobutanol, 3-metil-butanol, 2-feniletanol e isobutanol (Álvarez-Ainza et al., 2009; Hazelwood et al., 2008).

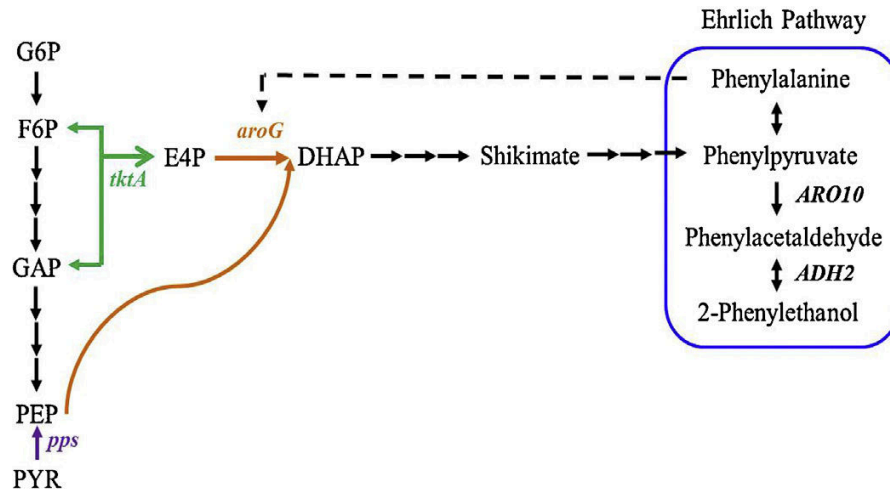


Figura 1

Ruta de Producción de alcoholes superiores en levaduras. Imagen tomada de (Yin et al., 2015).

Los aminoácidos que son asimilados por la ruta de Ehrlich (valina, leucina, isoleucina, metionina, y fenilalanina), después de la reacción inicial de transaminación, se transforman en α -cetoácidos que no pueden ser redirigidos al metabolismo central del carbono. Primeramente, estos α -cetoácidos son excretados en el medio de cultivo, y las células de las levaduras los transforman en alcoholes superiores o ácidos por medio de la ruta de Ehrlich, tal como puede observarse en la Figura 2. El actual interés científico por la ruta de Ehrlich se sustenta en la creciente demanda de compuestos aromáticos naturales, tales como alcohol isoamílico y 2-feniletanol, los cuales pueden ser sintetizados a partir de aminoácidos en procesos de bioconversión por medio de levaduras (Hazelwood et al., 2008).

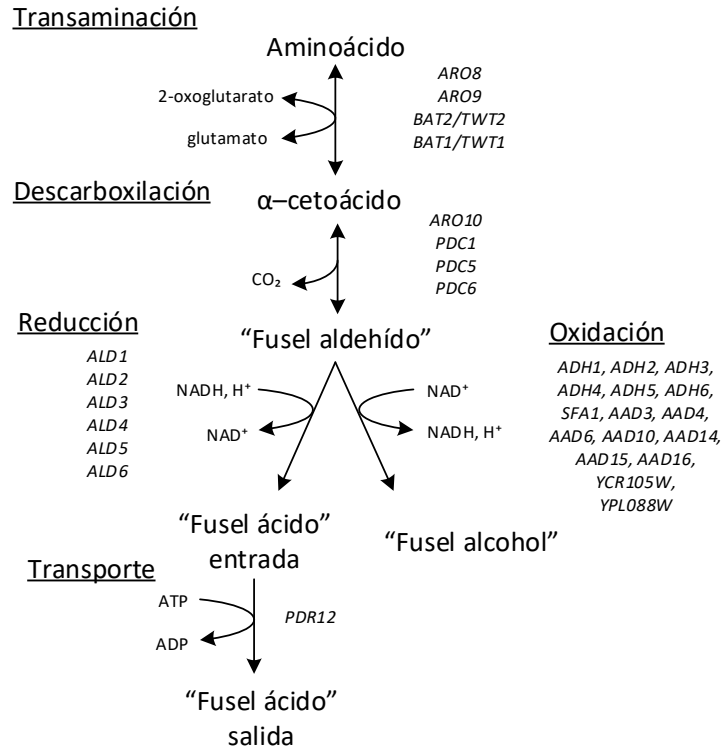


Figura 2

Ruta de Ehrlich. El catabolismo de aminoácidos ramificados, aromáticos y que contienen un grupo sulfuro, llevan a la formación de ácidos y alcoholes superiores. Los genes de *S. cerevisiae* que codifican las enzimas de síntesis se indican en cada paso (adaptado de (Hazelwood et al., 2008)).

Diversos factores, como el contenido de nutrientes, y la temperatura, pueden afectar muchos aspectos del metabolismo de las levaduras, incluyendo la síntesis de compuestos volátiles que contribuyen significativamente en las características organolépticas de las bebidas alcohólicas (Álvarez-Ainza et al., 2009; Rollero et al., 2015). Diversos estudios han evaluado el efecto del contenido de nitrógeno amoniacal en la producción de aromas provenientes de la fermentación de levaduras, tales como alcoholes superiores, sus acetatos y ésteres. Rollero et al. (2015) encontraron un efecto del contenido alto y bajo de nitrógeno disponible con el metabolismo de *S. cerevisiae* en la producción de ácido succínico y glutamato a partir de α-cetoglutarato.

Entre los compuestos que se forman están las grandes familias de alcoholes superiores, carbonilos como los aldehídos, los ésteres, los ácidos orgánicos, las grasas y los compuestos con azufre. Es importante comentar que los géneros de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* involucradas en la fermentación, tienen un metabolismo semejante y generan los mismos compuestos, pero la capacidad de sintetizar cada uno de éstos está más desarrollada en algunos géneros y especies que en otros. Los alcoholes superiores son aquellos con más de dos átomos de carbono, y excluyen entonces al metanol y el etanol.

Los ésteres, los cuales son producidos durante el proceso de fermentación en las levaduras, contribuyen de manera significativa en el sabor y aroma de las bebidas alcohólicas. Las levaduras pueden metabolizar los aminoácidos a alcoholes aromáticos siguiendo la ruta de Erhlich, una secuencia de reacciones que comprende principalmente una transaminación, seguida de una descarboxilación al aldehído correspondiente y finalmente reduciendo al alcohol superior. Estos alcoholes pueden ser aún más derivatizados a ésteres de acetato por medio de una enzima alcohol acetiltransferasa (Etschmann et al., 2008) producidos intracelularmente, como un resultado de la condensación entre los ésteres de acil-coenzima A y los alcoholes superiores (Lyness et al., 1997; Verstrepen et al., 2003). Se ha reportado que el metabolismo de los ésteres en las células de las levaduras puede ser un proceso de desintoxicación, ya que los ácidos grasos con una elongación de cadena de C₈-C₁₄ son tóxicos para las levaduras, especialmente si son insaturados. La esterificación de estos compuestos puede actuar como un mecanismo de defensa (Hundová & Fencl, 1977; Saerens et al., 2010). Sin embargo, esta enzima es extremadamente inestable una vez purificada, y consecuentemente, se han presentado dificultades en su estudio, lo cual ha repercutido en que los factores que influyen en el mecanismo de acción de esta enzima en el metabolismo de las levaduras, y por ende, la síntesis de los ésteres, no esté completamente esclarecido (Lyness et al., 1997; Saerens et al., 2010).

Como se mencionó anteriormente, existe una ruta adicional por la cual es posible llevar a cabo la síntesis de estos compuestos aromáticos involucrando el fosfoenolpiruvato que proviene de la glucólisis y la eritrosa-4-fosfato proveniente de la ruta de las pentosas fosfato. Lo anterior permite a los microorganismos sintetizar fenilalanina por medio de la vía del Shikimato, y subsecuentemente, este aminoácido se convierte en 2-PE por una gran cantidad de microorganismos a través de la vía de Erhlich, tal como se puede observar en la Figura 3. La vía de Erhlich y del Shikimato esta conectadas por el fenilpiruvato para formar una vía a través de este compuesto, con lo cual es posible sintetizarse el 2-PE *de novo* a partir de la glucosa.

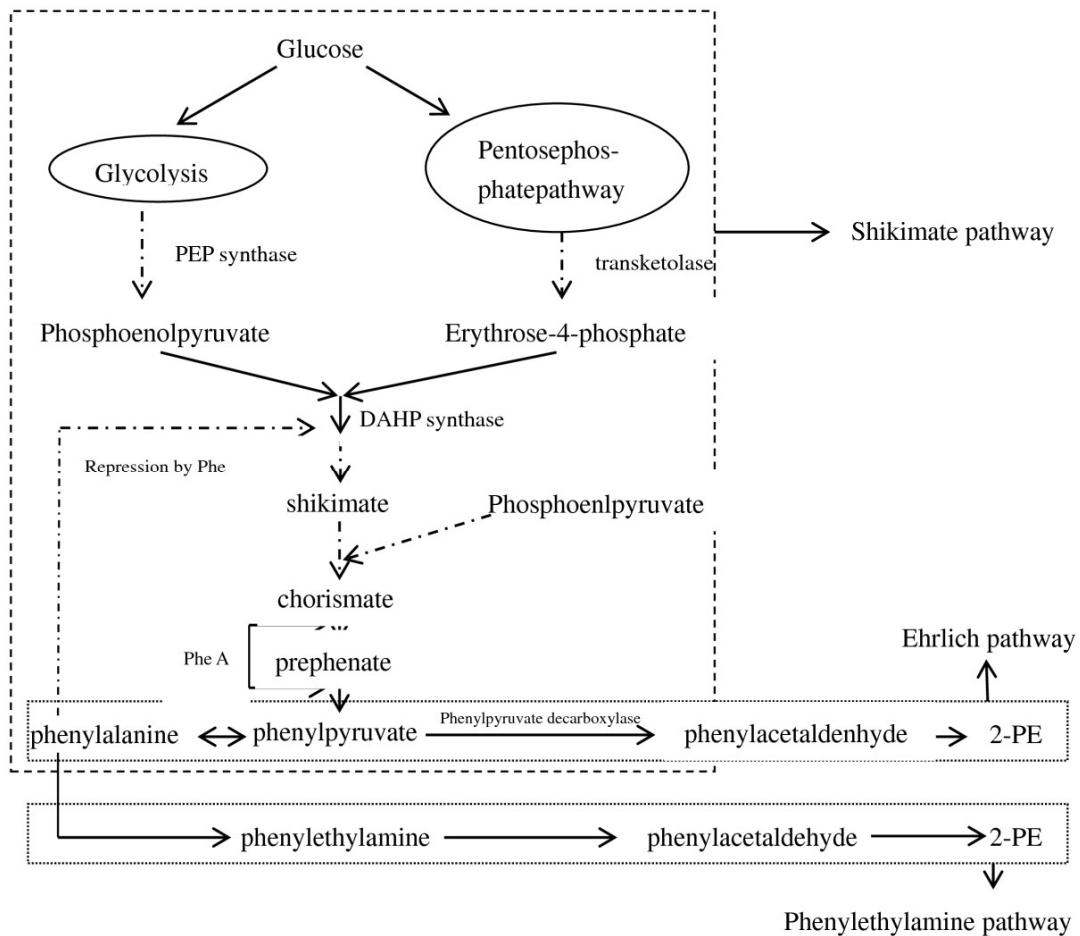


Figura 3

Ruta del Fenilpiruvato para la síntesis de 2-PE. El 2-PE puede ser biosintetizado de la fenilalanina a través de la ruta del fenilpiruvato y la ruta de Erhlich. La vía del Shikimato y la ruta de Erhlich conforman esta ruta, la cual puede sintetizar el 2-PE *de novo* a partir de glucosa. Tomado de Haibo et al. (2014).

1.4 Levaduras *no-Saccharomyces*

El metabolismo de las levaduras se ha explotado ampliamente en diversos procesos biotecnológicos alrededor de todo el mundo. Los de mayor importancia involucran los procesos de fermentación de productos de panificación y bebidas alcohólicas. Algunas otras áreas incluyen la producción de bioetanol como combustible, la excreción de proteínas y enzimas, nutracéuticos y fármacos, ácidos grasos, así como también agentes de biocontrol (Fredlund, 2004; Guzmán-Trampe et al., 2017; McKenna et al., 2014; Sandoval-Nuñez et al., 2018; Vichitphan & Vichitphan, 2013; Yu et al., 2016). El metabolismo de estos microorganismos puede causar también una modificación sensorial en alimentos y bebidas, dando lugar a características tanto deseables como indeseables, debido a la producción de algunos compuestos aromáticos, gases o alcoholes superiores (Fredlund, 2004; Zhang et al., 2014).

El desempeño de una cepa es un factor de importancia en los procesos biotecnológicos de bioconversión. El escaneo o la ingeniería de cepas adecuadas contribuyen de gran manera al éxito de la bioconversión para la producción de sustancias químicas orgánicas.

Algunos de estos microorganismos, tales como la levadura *P. anomala*; conocida también como *Hansenula anomala*, y más recientemente renombrada como *Wickerhamomyces anomalus* (Kurtzman, 2011; Sabel et al., 2014), pertenece al grupo de levaduras *no-Saccharomyces*, los cuales presentan una amplia diversidad metabólica y fisiológica, con capacidad de crecimiento en condiciones de bajo pH, alta presión osmótica, y una baja presión de oxígeno (Cao et al., 2015; Djelal et al., 2006; Fredlund, 2004; Passoth et al., 2006; Zhang et al., 2014). Como se mencionó anteriormente, dichas condiciones son similares a las encontradas en vinazas de los residuos del proceso de fermentación y destilación del tequila.

W. anomalus es una de las levaduras a las cuales, se les ha otorgado el estado de catalogada presuntamente como segura (*QPS status* por sus siglas en inglés). Es por ello que su significancia

biotecnológica se ha expandido, abarcando desde la producción de proteínas y agente de biocontrol en alimentos, hasta la producción de alcoholes superiores como biocombustibles (Zhang et al., 2014).

1.5 Modelado metabólico de levaduras no-convencionales

La producción de metabolitos a través de procesos fermentativos ha permanecido en constante cambio durante las últimas décadas, y cuando la rama de la Biología comenzó a cambiar paradigmas desde un punto de vista reduccionista hacia una corriente holística debido a la disponibilidad de una gran cantidad de información relacionada con genomas completos de diferentes microorganismos (Kauffman et al., 2003), un enfoque basado en la reconstrucción y análisis de nueva información a través de herramientas matemáticas (Badsha et al., 2014; Cavallieri et al., 2016; Chen et al., 2017; Förster et al., 2003; Yilmaz & Walhout, 2017), tales como la simulación de funciones celulares completas y específicas, inició una perspectiva completamente nueva en el estudio de la biología de sistemas. Los modelos metabólicos son herramientas útiles en el estudio de procesos microbianos para predecir flujos óptimos durante el crecimiento y la síntesis de metabolitos, y en el caso específico de este estudio, para buscar mejorar la producción biotecnológica de 2-PE y 2-PEA, mostrando la distribución de flujos en la obtención de estos compuestos, y que permite una predicción de las distribuciones de flujos en un estado estable (Badsha et al., 2014).

1.5.1 Principios del modelado basado en restricciones

La suposición del “estado estable” mencionado anteriormente es una hipótesis fundamental que permite encontrar el número de distribuciones de flujo relevantes en una red metabólica de un número infinito de soluciones a limitarse a un espacio N . La idea principal de la modelización metabólica es la de incluir límites fisicoquímicos y biológicos bien definidos que permitan acotar el espacio de los posibles vectores de flujo.

El crecimiento celular de un cultivo en lote puede describirse por el siguiente conjunto de ecuaciones:

$$\frac{1}{c} \frac{dx}{dt} = \mathbf{S}_x \quad (1)$$

$$\frac{d\mathbf{m}}{dt} = \mathbf{S}_m \mathbf{r} - \mu \mathbf{m} \quad (2)$$

$$\frac{1}{c} \frac{dc}{dt} = \mu \quad (3)$$

Donde \mathbf{x} es el vector de los componentes extracelulares n_x , \mathbf{m} es el vector de componentes intracelulares n_m , μ es la velocidad de crecimiento de la biomasa, c es el peso de la biomasa definido por unidad de volumen del cultivo, y \mathbf{r} es el vector de los flujos n_r .

De acuerdo con el trabajo de von Kamp et al. (2017), los modelos basados en estequiometría y restricciones (SCBM por sus siglas en inglés) requieren de la construcción de una matriz \mathbf{S} con una forma $m \times q$ (tomando las columnas q como las reacciones y las filas m los metabolitos involucrados con sus coeficientes estequiométricos), que representa las reacciones bioquímicas involucradas en el sistema que se desea estudiar. Para llevar a cabo la construcción de una red de modelado metabólico es necesario tomar en cuenta un conjunto de consideraciones que se muestran a continuación.

La condición de un estado estable, es decir, la ausencia de una razón de cambio en la velocidad de las reacciones celulares, es una de las principales características de estas herramientas, ya que se establecen diversos escenarios en los que es posible evaluar el comportamiento de los flujos celulares que componen una red metabólica bajo diferentes condiciones específicas. Lo anterior se muestra en la ecuación (4).

$$\mathbf{S}_m \mathbf{r} = \mathbf{0} \quad (4)$$

Donde \mathbf{r} expresa el valor neto de las velocidades de reacción. La ecuación (4) se deriva de la expresión (2), donde se asume que los metabolitos intracelulares permanecen en el estado estable, mientras que los extracelulares son dinámicos. Además, debido a la irreversibilidad de un gran conjunto de

reacciones bioquímicas, esta característica se integra como un subconjunto de flujos (*Irr*) que queda representado por la expresión (5), condicionando los flujos, otorgándole un sentido direccional al vector.

$$r_i \geq 0 \forall i \in Irr \quad (5)$$

Dicho lo anterior, el conjunto de vectores que es capaz de satisfacer matemáticamente las expresiones (4) y (5), se puede representar de manera geométrica por medio de lo que se conoce como un cono poligonal convexo, o un “cono de flujos”, el cual se describe como el límite cónico de un número finito de vectores (Greer, 1984). Este cono se analiza principalmente con la metodología del Análisis de Modos Elementales, el cual se describe más a detalle en la sección 1.5.3. Otra consideración importante es la del conocimiento de capacidades mínimas /máximas de los flujos de algunas reacciones (consumo máximo de sustrato, por ejemplo) como se establece en la expresión (6).

$$\alpha_i \leq r_i \leq \beta_i \quad (6)$$

Por último, en ocasiones incluso es posible contar con mediciones de resultados experimentales, dando lugar la siguiente expresión

$$r_k = m_k \quad (7)$$

La combinación de las condiciones (4) y (5) con (6) y/o (7) modifica la geometría del espacio de solución del sistema de un cono poligonal a ser un poliedro tridimensional. Así pues, los SCBM se basan en el uso de las condiciones expresadas en (4)-(7), y para resolverse se emplean técnicas de álgebra lineal, geometría computacional y programación lineal para el análisis del espacio de flujos y las propiedades de los flujos de vectores que son factibles para encontrar la solución del sistema.

1.5.2 Herramientas y bases de datos para la reconstrucción de redes metabólicas

La construcción de un modelo basado en una red metabólica se logra partir de una extensa revisión de literatura para definir las ecuaciones que representan las reacciones involucradas en el sistema

deseado. En las últimas dos décadas, una gran cantidad de trabajos han publicado información valiosa que certifica la utilización de estas herramientas (Klamt et al., 2014). Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la mayor disponibilidad de información a escala de genoma de una gran cantidad de microorganismos, así como el desarrollo de las herramientas computacionales para su automatización y estandarización de la reconstrucción de estas redes, permite que bases de datos en línea, tales como KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) compilen redes de reacciones metabólicas a nivel de genoma, así como datos que incluyen información de genoma, química y de redes. Una de las ventajas que presenta esta base de datos es la disponibilidad de una compilación de mapas de referencia construidos manualmente, lo que establece un buen punto de partida en la construcción de una red metabólica deseada (Klamt et al., 2014).

Muchos de los recursos descritos anteriormente están enfocados en la reconstrucción de redes metabólicas. Sin embargo, aun cuando esta información puede ser suficiente para estudios que estén relacionados con el metabolismo central, algunas rutas específicas, cuyas funciones o relevancia no están completamente claras, así como las reacciones involucradas en la formación de biomasa para microorganismos específicos requieren de suposiciones concretas para el sistema, o llevar a cabo experimentos de trazado de carbono (los cuales son una tarea difícil y costosa de realizar). Por lo tanto, diversos estudios que han utilizado microorganismos poco comunes han trasladado estas ecuaciones provenientes de otros microorganismos modelo, como *S. cerevisiae* o *E. coli*. Aun cuando se han observado diferencias en los resultados de esta variable, se acepta su validez para los resultados. (Kaushal et al., 2018; Rafieenia and Chaganti, 2015; Robles-Rodriguez et al., 2017; Song and Ramkrishna, 2009).

1.5.3 Análisis de balance de flujos

El análisis de Balance de Flujos (FBA por sus siglas en inglés) es una de las herramientas utilizadas para el diseño y optimización de procesos biológicos, y requiere de una función objetivo evaluada en el modelo en el que está enfocado el estudio (Cavallieri et al., 2016; Chen et al., 2017).

El FBA busca identificar balances de flujos particulares, se cumplan las condiciones establecidas en las ecuaciones (1-4). Es decir, que se mantenga el sistema en estado estable, que sea factible con base en su reversibilidad y capacidad, y determine una función objetivo; y en caso de ser necesario, tomar en cuenta la presencia de datos de flujo obtenidos a través de mediciones.

Una de las funciones objetivo más comunes en la optimización de flujo cuando se utiliza el FBA es la de maximizar la producción de biomasa celular a partir de una cantidad determinada de sustrato, (ya que de otro modo existiría una indeterminación del sistema), para obtener las distribuciones de flujos que describen el “rendimiento óptimo” de la biomasa (Klamt et al., 2014).

Es por ello que, biotecnológicamente hablando, la posibilidad de obtener los máximos rendimientos de un producto a partir de un sustrato con una cantidad predeterminada, ofrece una oportunidad valiosa en el desarrollo de bioprocesos.

1.5.4 Modos elementales de flujo

Los modos elementales de flujo, también conocidos simplemente como modos elementales (EMs por sus siglas en inglés) se definen como un vector de flujo en estado estable, que cumple con las condiciones establecidas en las ecuaciones (1) y (2). Es importante hacer notar, que estas dos condiciones corresponden con los principios básicos que definen a los SCBM, construyendo el “cono de flujos” mencionado en la sección 1.5.1. Adicionalmente a estas dos condiciones, se maneja el concepto de la irreductibilidad, y que, dependiendo del autor, se maneja como elementalidad, minimalidad o la no-descomposición de un conjunto de reacciones (Klamt et al., 2014; Maarleveld et al., 2013; von Kamp et al., 2017). Bajo este contexto, la irreductibilidad se refiere cuando el estado estable de la ecuación 1 no puede ser cumplida si se elimina cualquier reacción dentro del conjunto de EM (cuyo flujo sea diferente de 0).

Este concepto formaliza la noción de los modos elementales como la cantidad mínima de reacciones (independientes) que son necesarias para cumplir con la condición del estado estable, además,

determina que para llevar a cabo un análisis de los modos elementales solo es necesario la lista del conjunto de reacciones, más allá de flujos concretos, ya que estos pueden ser establecidos arbitrariamente por el modelador.

Así pues, los EMs pueden utilizarse para identificar rutas mínimas (o subredes) dentro del metabolismo de microorganismos que conducen a la producción de un metabolito biotecnológicamente relevante o la producción de biomasa, a partir de un sustrato definido.

Dado todo lo mencionado anteriormente, la importancia de estas metodologías radica en los alcances y objetivos que son capaces de realizar, y como ejemplo se encuentra que se ha utilizado previamente en diferentes procesos biotecnológicos, tales como la producción de metano (Comer et al., 2017), acumulación de lípidos y producción de ácido cítrico (Robles-Rodriguez et al., 2017), producción de ácido clavulánico (Cavallieri et al., 2016), o algunos alcoholes (Kaushal et al., 2018; Song and Ramkrishna, 2009); además, estas herramientas han permitido la optimización de cultivos a través de la identificación de flujos metabólicos o reacciones de control de velocidad (Robles-Rodriguez et al., 2017; Yilmaz and Walhout, 2017).

1.6 Diseños experimentales en bioprocesos

De manera general, los diseños experimentales se utilizan en las investigaciones de carácter cuantitativo, y pueden considerarse como el conjunto mínimo de experimentos propuestos por el investigador para obtener resultados relevantes acorde a los objetivos planteados de su investigación. Las variables que se van a controlar (factores constantes), las variables que se van a evaluar (factores y niveles, que se les conoce como tratamientos) (Montoya-Marquez et al., 2011), así como los instrumentos de medición para recopilar los resultados de las variables de respuesta.

Es posible establecer diferentes tipos de diseños, dependiendo de cómo es que se organicen o agrupen las unidades experimentales. En el caso específico de este trabajo, se optó por un implementar un diseño de superficie Box-Behnken.

En su trabajo, Box and Behnken (1960) desarrollaron una familia de diseños eficientes para factores con dos o tres niveles que permiten, además, un ajuste con modelos cuadráticos. Se trata de un diseño creativo basado en la construcción de bloques incompletos balanceados (Huertas-García et al., 2014). Este tipo de diseño tiene como finalidad refinar los modelos después de haber determinado los factores importantes utilizando diseños de cribado o diseños factoriales, especialmente si se sospecha que existe una curvatura en la superficie de respuesta. La diferencia entre una ecuación de superficie de respuesta y la ecuación de un diseño factorial es la adición de los términos elevados al cuadrado (o cuadráticos) que permiten modelar esta curvatura en la respuesta, lo que hace la hace útil para entender o mapear una región de una superficie de respuesta; ya que las ecuaciones obtenidas a partir de estas modelan cómo los cambios en las variables afectan una respuesta de interés; encontrar los niveles de las variables que optimizan una respuesta, y seleccionar las condiciones operativas para cumplir con las especificaciones deseadas (Minitab, 2019). En la literatura existe una gran cantidad de trabajos en los que se utiliza este tipo de diseño (del Ángel Sánchez et al., 2015; Ma et al., 2018; Pérez et al., 2013; Rollero et al., 2015; Seluy & Isla, 2014), ya que tienen la característica de necesitar menos puntos de diseño que otros tipos similares y, por lo tanto, resulta menos costoso ejecutarlos aun con el mismo número de factores, dando lugar a resultar más eficientes en términos del número de corridas requeridos. Además, tienen la propiedad de que son rotables (o casi rotables) (es decir, que ofrecen una varianza de predicción constante entre los puntos centrales del diseño y los niveles extremos) lo cual permite una estimación de los coeficientes de primer y segundo orden más eficiente.

CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN

La industria del Tequila en México genera una gran cantidad de residuos –llamados vinazas- durante su elaboración en el proceso de destilación. Actualmente, la mayor parte de las vinazas que se producen son desechadas sin un tratamiento, lo cual provoca un severo impacto ambiental.

La solución a esta problemática no radica solamente en la restricción o sanción al desarrollo industrial, sino en la implementación de un tratamiento adecuado para evitar o remediar la contaminación desde su origen, ya que los tratamientos físicos y químicos no han logrado el éxito deseado hasta ahora. El alto contenido de materia orgánica de estos efluentes hace que los tratamientos biológicos sean de interés para el tratamiento y aprovechamiento de su composición, ya que pueden ser utilizadas como materia prima en la obtención de compuestos aromáticos de alto valor agregado.

La producción microbiana de sustancias químicas de valor comercial mediante bioprocesos permite la utilización de materias primas de una gran diversidad de fuentes para su aprovechamiento de una manera sustentable, tal como los residuos del proceso de fermentación y destilación en las industrias tequileras, y actualmente, el enfoque de la producción de estos compuestos aromáticos fenólicos a partir de vinazas tequileras es muy reducido.

Para llevar a cabo este objetivo, es necesario hacer uso de las herramientas tecnológicas y biológicas disponibles; con las cuales es posible analizar y profundizar tanto en los mecanismos de síntesis de estas sustancias, como en la regulación de su producción, con la finalidad de optimizar el proceso de obtención de las mismas. Además, el uso de microorganismos no convencionales como las levaduras no *Saccharomyces*, ofrecen nuevas alternativas para el desarrollo de estos bioprocesos, ya que muchos de estos microorganismos están caracterizados por tener una amplia diversidad metabólica y fisiológica, con una capacidad de crecimiento en condiciones de alta exigencia biológica.

CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS

- La concentración de aminoácidos aromáticos, la relación C/N, así como la presencia de inhibidores, tienen un efecto significativo en el rendimiento de la ruta de síntesis de 2-feniletanol y 2-fenietilacetato por levaduras *no-Saccharomyces* a partir de vinazas tequileras como sustrato.

CAPÍTULO 4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Incrementar la producción de 2-feniletanol y su éster a partir de vinazas tequileras como sustrato empleando levaduras no-*Saccharomyces*, mediante el efecto de la relación C/N y presencia de inhibidores, empleando herramientas como el modelado metabólico y diseños experimentales.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Caracterizar fisicoquímicamente las vinazas tequileras y evaluar los sustratos disponibles para el metabolismo de levaduras no-*Saccharomyces*

-Evaluar los factores involucrados en la síntesis de los compuestos aromáticos fenólicos del metabolismo de levaduras no-*Saccharomyces* en medios definidos y vinazas como medio de cultivo, para determinar las variables de mayor importancia en la síntesis de estos compuestos en este sustrato.

-Utilizar herramientas de modelado metabólico que permitan evaluar la factibilidad de escenarios metabólicos para la producción de compuestos aromáticos.

-Aplicar un diseño experimental Box-Behnken variando la fuente de carbono y su concentración, además de la cantidad de compuestos inhibidores, para encontrar las condiciones que incrementen la producción de 2-feniletanol y su éster a partir de vinazas tequileras.

CAPÍTULO 5. METODOLOGÍA

La metodología utilizada para alcanzar los objetivos planteados, se esquematiza en el siguiente diagrama de flujo de la Figura 4:

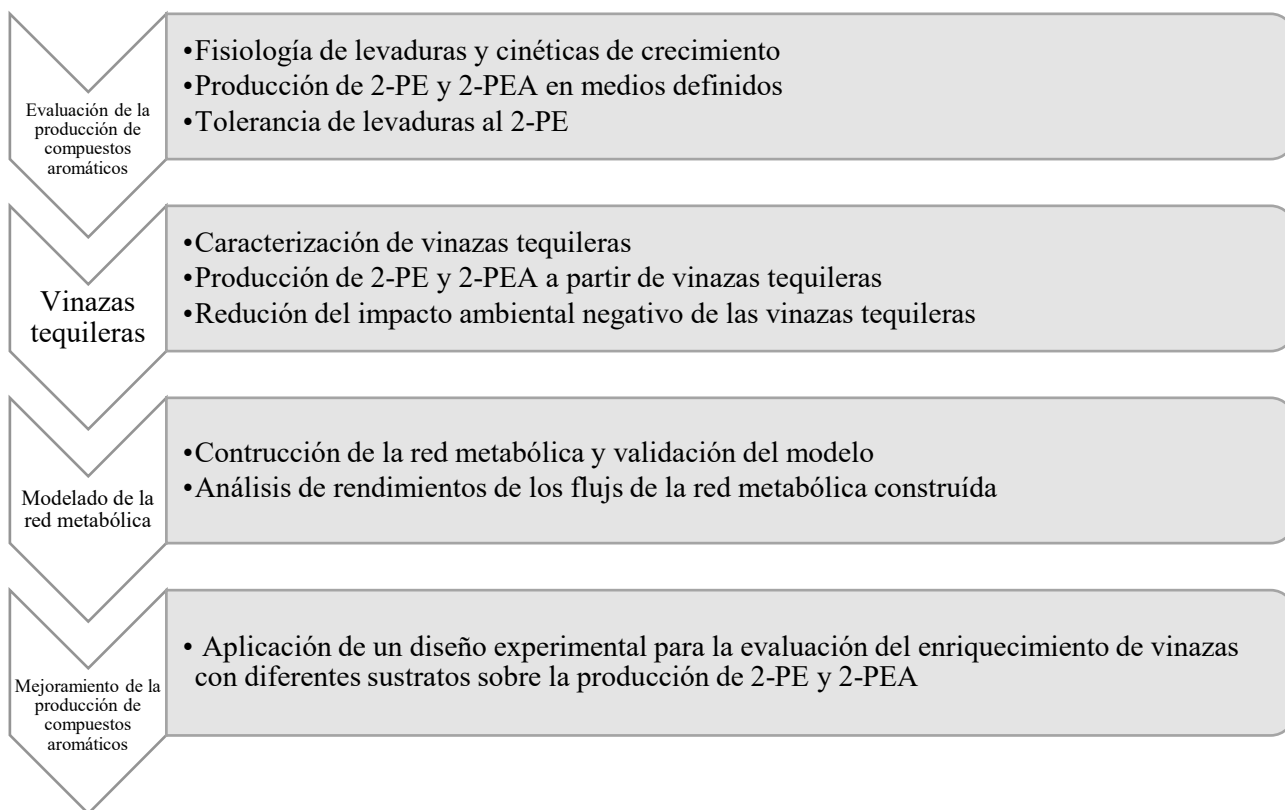


Figura 4

Diagrama de flujo de la metodología general

5.1 Microorganismos

Las levaduras estudiadas pertenecen a dos diferentes colecciones de cultivos; *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis* aisladas de la fermentación de café, las cuales pertenecen a la colección de cultivos del Departamento de Microbiología Agrícola de la Universidad Federal de Lavras, en Brasil; mientras que las levaduras *Candida utilis* y *Wickerhamomyces anomalus* se aislaron de

fermentaciones del proceso de elaboración de mezcal y pertenecen a la colección de cultivos del departamento de Biotecnología Industrial del CIATEJ, México. Dichas cepas de levaduras fueron seleccionadas debido a que fueron aisladas de fermentaciones con una fuerte presencia de compuestos inhibidores, los cuales también están presentes en vinazas tequileras. En la Tabla 2 se muestran los códigos utilizados a lo largo del trabajo.

Tabla 2 Lista de levaduras no-*Saccharomyces* estudiadas

Microorganismo	Código	Fuente
<i>W. anomalus</i>	DB	Fermentación de mezcal
<i>C. utilis</i>	CUT	Fermentación de mezcal
<i>C. parapsilopsis</i>	448	Fermentación de café
<i>C. glabrata</i>	119	Fermentación de café

5.2 Evaluación del crecimiento de levadura en medio químicamente definido

Las cinéticas de crecimiento de las levaduras estudiadas (las cuales se muestran en la Tabla 1 con sus códigos de identificación) se realizaron utilizando un medio de cultivo mínimo de composición definida de acuerdo al trabajo de Tibayrenc et al. (2010) con modificaciones tal y como se muestra en el Apéndice 1.

Las levaduras fueron activadas en medio YPD a 30°C con una agitación de 250 rpm. La inoculación se llevó a cabo en una concentración de 1×10^6 células/mL de medio de cultivo. El crecimiento se evaluó durante 24 horas tomando muestra a las 1, 2, 4, 6, 12, 18 y 24 horas, para evaluar la velocidad de crecimiento por medio de la densidad óptica (DO) a 600 nm, conteo celular con una cámara de Neubauer, consumo de azúcares reductores por el método de DNS (apéndice 2) y la producción de biomasa por medio de peso seco constante a 60°C.

5.3 Evaluación de la capacidad nativa de levaduras no- *Saccharomyces* en la producción de 2-feniletanol y 2-fenietilacetato

Bajo la premisa de que el metabolismo de las levaduras está directamente relacionado con la composición del medio, se evaluó la capacidad nativa de producción de 2-feniletanol y 2-fenietilacetato de cuatro levaduras diferentes. El objetivo principal de esta evaluación es la selección del microorganismo modelo con el cual se llevaría a cabo una posterior optimización del bioproceso. La capacidad de producción de 2-PE y 2-PEA por medio de levaduras fue evaluada en dos diferentes condiciones metabólicas; siendo estas la ruta catabólica de Erlich (ECP) o la ruta *de novo* (DNP). Las levaduras se activaron previamente en medio YPD a 30°C y una agitación de 250 rpm. La concentración del inóculo celular inicial fue de 1×10^6 cells/mL en 100 mL de medio de cultivo, en matraces Erlenmeyer de 250 mL. La evaluación de la condición ECP se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por Yin et al. (2015), utilizando un medio de cultivo específico compuesto de 40 g/L de sacarosa, 0.5 g/L Na_2HPO_4 , 1.8 g/L base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos y 7 g/L L-fenilalanina como fuente de nitrógeno, a un pH de 5.0. La condición DNP se evaluó de acuerdo a Kim et al. (2014), con un medio de cultivo compuesto de 20 g/L de glucosa, 6.7 g/L base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos and 0.77 g/L mezcla de complementos completa sin uracilo. Las fermentaciones se realizaron a 30°C y 250 rpm de agitación durante 96 horas para cada medio. Se tomaron muestras a las 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h para determinar el crecimiento por densidad óptica a una absorbancia de 600 nm, la cuantificación de 2-PE, y 2-PEA se llevaron a cabo por cromatografía de gases, la producción de biomasa se determinó en peso seco constante a 60°C, y el consumo de sustrato por el reactivo de ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959) para azúcares reductores, y el contenido total de azúcares por el método espectrofotométrico de antrona.

El diseño experimental realizado para la evaluación de la síntesis de compuestos aromáticos, fue un diseño de dos factores, siendo estos el tipo de medio de crecimiento y la levadura utilizada en cada fermentación.

Se realizaron 10 experimentos por duplicado para obtener los datos necesarios para el análisis de resultados, siendo las variables de respuesta: la concentración de 2-PE, el consumo de sustrato y la generación de biomasa a lo largo de las fermentaciones.

5.4 Caracterización fisicoquímica de vinazas tequileras

El presente trabajo comenzó con la caracterización fisicoquímica de las vinazas tequileras. La recolección de 10 muestras diferentes se llevó a cabo en 9 empresas elaboradoras de tequila, provenientes de dos regiones del estado de Jalisco. La región “del Valle” corresponde a las localidades de Tequila, Amatitán y El Arenal; mientras que la región de “los Altos sur” incluye las localidades de Arandas, Tepatitlán de Morelos, y San Ignacio Cerro Gordo. La vinaza fresca fue recolectada en bidones plásticos y almacenada en una cámara de congelación a -20°C hasta su posterior utilización. Los análisis realizados a dichas muestras fueron los siguientes: cuantificación de amino ácidos por medio de HPLC (AOAC 982.30-A) (2007) modificado de WATERS ACCQ TAG ultra (Waters Corporation, MA, USA). Así como la cuantificación total de nitrógeno por el método de Kjeldahl. Estos parámetros fueron determinados de acuerdo a los lineamientos de la Asociación Americana de Salud Pública (APHA, 2012), Se utilizaron métodos colorimétricos en la determinación de azúcares totales con el método de Antrona a un absorbancia de 620 nm, mientras que los azúcares reductores fueron cuantificados con el método de Miller (DNS) a 540 nm, además de los sólidos totales por peso seco a 60°C . La cuantificación de los minerales de calcio, cobre, níquel, magnesio, y hierro se llevó a cabo por espectrometría de absorción atómica.

Adicionalmente a los análisis anteriormente mencionados, se realizó la cuantificación de compuestos inhibidores provenientes del cocimiento de los agaves, así como la cuantificación de azúcares y ácidos orgánicos a través de HPLC, utilizando un cromatógrafo de líquidos Agilent Technologies® 1220 Infinity LC con un detector de arreglo de diodos 1220 Infinity DAD LC. Las columnas de separación empleadas fueron las denominadas 18C y 87H para inhibidores y carbohidratos y ácidos orgánicos

respectivamente. Una descripción más detallada de las condiciones de operación del equipo para cada análisis se muestra en el apéndice 3.

5.5 Evaluación de la capacidad nativa de levaduras no- *Saccharomyces* en la producción de 2-feniletanol y 2-fenietilacetato a partir de vinazas tequileras

La evaluación de las vinazas tequileras como un medio de cultivo para la producción de 2-PE y 2-PEA se llevó a cabo de acuerdo a Silva et al. (2011) con modificaciones de (Dos Reis et al., 2018). Se realizó un pretratamiento de remoción de sólidos insolubles por centrifugación (13'000 rpm, 20 minutos, 4°C) previo a la formulación del medio de cultivo con vinazas tequileras. Estas fermentaciones se realizaron de la siguiente manera: En matraces Erlenmeyer de 250 mL se prepararon 100 mL del medio de cultivo el cual se enriqueció con 0.1% extracto de levadura, 0.05% K₂HPO₄, 0.2% glucosa p/v, 0.5% peptona y la vinaza fresca. Previo a la inoculación, estos medios de cultivo fueron esterilizados a 121°C durante 15 min. Los cultivos fueron incubados para cada levadura con 1x10⁶ células/mL de medio a 30°C con una agitación de 150 rpm durante 120 horas, tomando muestra para los análisis cada 24 horas.

Las variables estudiadas en las fermentaciones fueron la especie de levadura, y las diferentes vinazas. Las variables de respuesta para evaluar diferencias significativas fueron el crecimiento por DO (600 nm), la cuantificación del sustrato disponible por el método de DNS y ensayo de antrona, la medición del pH y la cuantificación de los compuestos aromáticos de interés por cromatografía de gases como se mencionó en la sección anterior.

5.5.1 Evaluación en la reducción de la demanda química y bioquímica de oxígeno por levaduras durante la fermentación de vinazas tequileras

La reducción de la demanda química y bioquímica de oxígeno de las vinazas tequileras después del proceso de fermentación con levaduras se realizó como un complemento a los resultados de la producción de compuestos aromáticos. Se seleccionó una vinaza de acuerdo a los resultados

obtenidos a partir de la caracterización, así como la especie de levadura a partir de las fermentaciones de vinazas tequileras.

La demanda bioquímica de oxígeno (BOD_5) se determinó con el equipo respirométrico BODTrak II (Hach company, CO, USA) y la demanda química de oxígeno (COD) se determinó a partir del método de digestión en reactor, utilizando un digestor DRB 200 (Hach company, CO, USA), Ambos parámetros fueron calculados a partir de la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar los componentes orgánicos e inorgánicos de las muestras, respectivamente.

Los análisis se hicieron por triplicado de un solo lote de la vinaza seleccionada, y se inoculó con una concentración de 1×10^6 células/mL. La fermentación se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL a 30°C y 150 rpm de agitación durante 120 h, Antes del análisis, se removió la biomasa por centrifugación a 4000 rpm durante 15 min a 4°C .

5.6 Cromatografía de Gases

La cuantificación de 2-PE y 2-PEA se realizó de acuerdo a la metodología de Arellano et al. (2012), utilizando el sistema GC Agilent 7890B, un muestreador 7890A Headspace, y un detector FID, con una columna HP-INNOWax (60m x $250\mu\text{m}$ x $0.25\mu\text{m}$).

Muestras de 2 mL se colocaron en viales de 20 mL, para después colocarlos en el muestreador de headspace con las siguientes condiciones: temperatura del vial: 90°C , temperatura de loop 110°C , línea de transferencia 115°C , tiempo de equilibrio del vial: 5 min, tiempo de presurización: 2 min, llenado de loop: 0.2 min, tiempo de equilibrio del loop: 0.5 min, tiempo de inyección: 1 min, volumen de inyección: $10\mu\text{L}$. Las condiciones del sistema GC Agilent 7890B fueron las siguientes; condición inicial programada a 45°C por 8 min, con incrementos de 2°C hasta 80°C , seguido de un incremento de 5°C hasta 160°C , y finalmente aumentos de 25°C hasta llegar a los 220°C durante 4 min. El detector y el inyector se establecieron a 250°C , con un modo de inyección splitless. El tiempo de análisis fue de 55 min, incluyendo el tiempo de extracción del espacio de cabeza.

5.7 Modelado de la red metabólica de levaduras no-*Saccharomyces*

Las rutas metabólicas celulares de una red metabólica completa pueden ser descritas por un conjunto de Modos Elementales (EMs). En este trabajo, la red construida está basada en la conversión de carbono y nitrógeno como sustratos a biomasa, 2-PE y 2-PEA como productos del crecimiento de levaduras en condiciones anaeróbicas. El sistema evaluado consiste en 48 reacciones, con 58 metabolitos internos (Figura 2) y 5 elementos principales (glucosa, biomasa, 2-PE, 2-PEA, mantenimiento). La red incluye la ruta de la glucólisis, el metabolismo del Piruvato, la ruta de las pentosas fosfato, el ciclo del Krebs, las rutas de Erhlich y el Shikimato, y el metabolismo del glutamato y la glutamina, así como la formación de biomasa (Robles-Rodriguez et al., 2017; Song & Ramkrishna, 2009; Voige, 2012). En el proceso de transporte solamente fue considerado el citosol y la mitocondria para simplificar este proceso. El cómputo de los modos elementales de la red metabólica se realizó por medio de la herramienta CellNet Analyzer toolbox (von Kamp et al., 2017) utilizando el software MATLAB® (Mathworks Inc., MA, USA). Un conjunto completo que contiene las reacciones y las abreviaciones se muestra en el apéndice 4.

5.8 Pruebas de inhibición del 2-feniletanol sobre el crecimiento de levaduras no-convencionales

Se ha reportado previamente que el 2-PE es un compuesto inhibidor del crecimiento microbiano en procesos fermentativos utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Debido a esto, los rendimientos se ven afectados de manera significativa en concentraciones de este compuesto de 2 g/L a 3 g/L (Chreptowicz et al., 2016; Hua & Xu, 2011; Stark et al., 2003). Para evaluar el grado de esta inhibición en las levaduras estudiadas, se hizo una prueba cualitativa en cajas Petri con medio YPD sólido al cual se le agregaron diferentes concentraciones de 2-PE (0g/L, 0.5 g/L, 1g/L, 3g/L, 5g/L) tal y como se muestra en la Figura 5. Este experimento tuvo una duración de 48 horas a 30°C y fue realizado por triplicado.

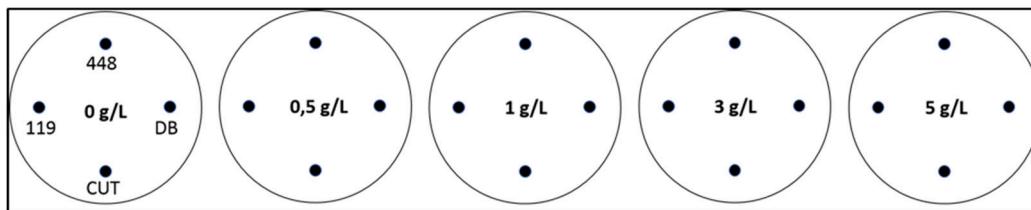


Figura 5

Diseño de la prueba cualitativa de la inhibición del crecimiento por 2-PE.
 119: *C. glabrata*; 448: *C. parapsilosis*; DB: *W. anomalus*; CUT: *C. utilis*

Los resultados de este estudio cualitativo permitirían descartar especies de levaduras, y llevar a cabo un estudio más detallado con fermentaciones en medio líquido. Este consistió en el monitoreo del crecimiento de las levaduras y obtener las cinéticas de inhibición del 2-PE, lo cual permitiría llevar a cabo una evaluación de diferentes modelos matemáticos en el proceso de crecimiento, permitiendo predecir los parámetros cinéticos de la fermentación con aquel que mejor se adecue al fenómeno de estudio.

Estos experimentos se llevaron a cabo en medio de cultivo YPD con diferentes concentraciones iniciales del compuesto inhibidor (2-PE), las cuales se establecieron en 0,5, 1, 3 g/L y un control sin este compuesto en la composición del medio, para comprobar la hipótesis de que la falta de acumulación de 2-PE observada en pruebas preliminares se debe a la transformación al éster 2-PEA.

Las variables de respuesta estudiadas fueron el crecimiento celular por medio del monitoreo de la DO (600 nm), la medición del consumo de glucosa por el método de DNS y la cuantificación en el cambio de la concentración de 2-PE y etanol por medio del método de cromatografía de gases mencionado en una sección previa.

5.9 Planteamiento del diseño experimental y condiciones de cultivo para el incremento de la producción de 2-feniletanol

El jarabe de maíz y las melazas de azúcares son algunas de las fuentes de carbono más económicas y de fácil acceso. Es por ello que bajo la perspectiva de incrementar la producción del 2-PE, se utilizaron en un diseño experimental para evaluar diferentes condiciones de cultivo, comparando con la glucosa como control. Desde un punto de vista económico, estas fuentes de carbono están disponibles para su compra por mayoreo en un rango de precio de aproximadamente 107 dólares y 700 dólares por tonelada para las melazas de la industria azucarera y el jarabe de maíz, respectivamente. Aunado a lo anterior, la inclusión de los compuestos inhibidores en el diseño experimental radica en los resultados obtenidos de la caracterización de las vinazas tequileras, donde se encontró que el hidroximetilfurfural y el ácido acético son los inhibidores que se encuentran mayoritariamente en estos residuos.

Las levaduras fueron activadas en medio YPD a 30°C con una agitación de 250 rpm. La inoculación se llevó a cabo en una concentración de 1×10^6 células/mL de medio de cultivo. El crecimiento en el medio compuesto por las vinazas se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL a 30°C y 150 rpm de agitación durante 72 horas tomando muestra a las 3, 6, 9, 12, 24, 48, y 72 horas, para evaluar la velocidad de crecimiento por medio de la densidad óptica (DO) a 600 nm, consumo de azúcares por HPLC, volátiles por cromatografía de gases y la producción de biomasa por medio de peso seco constante a 60°C. Cada una de las corridas se llevó a cabo por triplicado, dando lugar a 39 experimentos.

El diseño experimental de esta etapa es un diseño Box-Behnken, y en la Tabla 3 se muestran las condiciones y los niveles a evaluar para llevar a cabo la optimización del medio de vinazas tequileras para la producción de los compuestos aromáticos de interés, mientras que la Tabla 4 muestra las diferentes corridas del diseño.

Debido a que se encontró que la cantidad de nitrógeno necesaria para cada uno de los escenarios obtenidos a partir del análisis de Modos Elementales mostrados en la Tabla 8 de la sección de resultados se encuentra ya disponible, la relación C/N se modificó a través de las diferentes concentraciones de la fuente de carbono a evaluar. Aun cuando el modelado metabólico ofrece el punto de partida para el acondicionamiento de las vinazas, el posible efecto que puedan ejercer alguno de estos sustratos sobre algunos de los parámetros importantes en el estudio, como la DQO y DBO, también debe ser tomado en cuenta, ya que uno de los objetivos principales es la de reducir el impacto ambiental que generan estos residuos. Es por ello que no se consideró la adición de altas concentraciones de azúcares.

Tabla 3 Condiciones de las variables con sus diferentes niveles para la producción de compuestos aromáticos a partir de vinazas tequileras.

Factor	Código		
	-1	0	1
Fuente de carbono	Jarabe de maíz	Glucosa	Melazas
Concentración de azúcares	10 g/L	20 g/L	30 g/L
Compuestos inhibidores presentes en las vinazas			
• Ac. Acético	2400 mg/L	3200 mg/L	4000 mg/L
• HMF	72 mg/L	94 mg/L	116 mg/L

Tabla 4 Diseño experimental para incrementar la producción de compuestos aromáticos

Corrida	Fuente de carbono	Concentración de azúcares	Compuestos inhibidores presentes en las vinazas
1	0	-1	1
2	0	1	1
3	0	-1	-1
4	0	1	-1
5	0	0	0
6	-1	-1	0
7	-1	0	1
8	-1	0	-1
9	-1	1	0
10	1	0	1
11	1	0	-1
12	1	-1	0
13	1	1	0

Análisis Estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado de muestras independientes, y los datos están expresados por la media \pm su desviación estándar. Los resultados se analizaron estadísticamente utilizando un ANOVA ($p < 0.05$) y la comparación entre los grupos se llevó a cabo utilizando la prueba de Tukey para observar las diferencias entre las diferentes variables de respuesta a lo largo del documento. Dentro de las herramientas utilizadas para el análisis del diseño Box-Behnken, los resultados fueron analizados considerando: el coeficiente de determinación, el análisis de varianza (ANOVA), el diagrama de Pareto, y los diagramas de superficie de respuesta. Los resultados de estos análisis fueron obtenidos utilizando el software Minitab® 19.1.0 (Minitab Inc., PA, USA)

CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Evaluación de la producción de 2-feniletanol y 2-feniletacetato en condiciones de catabolismo y síntesis De Novo.

La producción de 2-PE y 2-PEA en los medios inductores ECP y DNP se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5 Evaluación de los azúcares consumidos, rendimientos de biomasa, producción de 2-feniletanol (2-PE) y 2-feniletacetato (2-PEA) por levaduras en diferentes medios.

Levadura	DNP				ECP			
	Y x/s (g biomasa/ g glucosa)	Azúcares consumidos (%)	2-PE [mg/L]	2-PEA [mg/L]	Y x/s (g biomasa/ g sacarosa)	Azúcares consumidos (%)	2-PE [mg/L]	2-PEA [mg/L]
<i>C. glabrata</i>	0.23±0.06 ^a _A	99.42±0.05 ^{aA}	ND	35.08±0.54 _{aA}	0.24±0.01 ^a _A	61.29±1.09 ^{aB}	ND	665.33±25.55 ^a _B
<i>C. parapsilosis</i>	0.14±0.05 ^a _A	99.11±0.13 ^{aA}	ND	28.56±4.91 _{bA}	0.15±0.04 ^a _A	95.51±2.58 ^a _B	ND	357.46±19.32 ^a _B
<i>W. anomalous</i>	0.26±0.06 ^b _A	99.51±0.01 ^{aA}	2.69±0.57 ^a _A	36.93±0.11 _{aA}	0.53±0.09 ^b _A	44.62±1.23 ^b _B	ND	689.16±66.63 ^a _B
<i>C. utilis</i>	0.31±0.08 ^b _A	99.63±0.04 ^{aA}	4.47±1.87 ^b _A	29.50±1.97 _{bA}	0.18±0.01 ^a _A	96.47±2.31 ^a _B	242.65±26.9 _{bA}	6.67±0.49 ^{bB}

DNP= Medio de la vía *De novo*, ECP= Medio de la vía catabólica de Erhlich. Los resultados se muestran como un promedio de duplicados con desviación estándar; letras minúsculas muestran comparación entre levaduras y letras mayúsculas muestran comparaciones entre medios. Significancia estadística a una p < 0.05. ND – No detectado.

En esta tabla pueden observarse diferencias significativas en el porcentaje de azúcares consumidos, dependiendo de la especie de levadura y el medio evaluado. Se observó un consumo completo de la glucosa en el medio DNP para cada una de las levaduras, mientras que en el medio ECP, las especies *C. glabrata* y *W. anomalous* no fueron capaces de consumir en su totalidad la sacarosa disponible; sin embargo, los rendimientos de biomasa observados en este medio fueron mayores en comparación con las levaduras *C. parapsilosis* y *C. utilis*. El consumo de glucosa es parecido al de estudios similares

en los cuales la fuente de carbono se termina en su totalidad al cabo de 24 a 28 horas, tanto en bacterias (Haibo et al., 2014), como levaduras (Chreptowicz et al., 2016; Wittmann et al., 2002).

Estudios anteriores en el mismo medio DNP reportaron una producción de biomasa en el rango de 2 a 3 g/L (Kim et al., 2014), el cual es similar a los obtenidos con las levaduras estudiadas. La producción de 2-PE solamente fue observada en el medio ECP por *C. utilis*, mientras que en el medio DNP se observó una disminución significativa del 98%. Para la producción de 2-PEA la mayor concentración fue obtenida por las levaduras *C. glabrata* y *W. anomalus* en el medio ECP tal y como se muestra en la Tabla 5 con 665 y 689 mg/L respectivamente. EL mismo comportamiento se observó con las mismas dos levaduras en el medio ECP, con una disminución en la concentración de casi el 95%.

Existen reportes donde se menciona la importancia de la fuente de nitrógeno en la síntesis de fenilpropanoides. Martin et al. (2016) en su estudio observaron que la adición de sales de amonio (75 mg/L de nitrógeno asimilable por levaduras) al medio de cultivo afectó de manera negativa la producción de estos compuestos aromáticos (con una reducción de 13 a 2 µg/L aproximadamente) con levaduras de la especie *H. vineae*. A pesar de ello, este comportamiento no se observa de manera generalizada. En la mayoría de los estudios en los que se produce 2-PE en procesos fermentativos de levaduras, y se evalúa la producción de estos compuestos aromáticos a partir de glucosa como principal fuente de carbono (sin la adición de fenilalanina), se utiliza sulfato de amonio como fuente de nitrógeno sin encontrar un comportamiento como el descrito anteriormente.

En el trabajo de Yin et al. (2015), lograron obtener una concentración máxima de 800 mg/L de 2-PE con una cepa nativa de *S. cerevisiae* a partir de la ruta catabólica de Erhlich, en un medio basado en la presencia de fenilalanina (7 g/L) y sacarosa (40 g/L) como fuente de carbono. Este resultado difiere de los resultados obtenidos en este trabajo con aproximadamente 12%, ya que se observó una mayor producción y acumulación hacia el éster 2-PEA, probablemente debido a la capacidad inherente de

cada microorganismo a la tolerancia al 2-PE, así como a la actividad de la enzima alcohol acetiltransferasa necesaria para la producción del 2-PEA (Akita et al., 1990).

Por otro lado, Kim et al. (2014) reportaron una concentración 200 mg/L de 2-PE en una cepa nativa de *K. marxianus* a partir de glucosa (20 g/L) y sulfato de amonio (5g/L) como fuente de nitrógeno, con una concentración máxima de 1 g/L en una cepa recombinante. Es por ello que la síntesis de estos compuestos depende de la composición de medio de cultivo y la capacidad inherente de cada microorganismo de utilizar las rutas metabólicas necesarias. Por ejemplo, Jimenez-Martí and del Olmo (2008) observaron que para un mismo microorganismo (*S. cerevisiae*) en condiciones de fermentación alcohólica, el uso de amoníaco incrementó la expresión del gen *ARO8* (el cual es un regulador de la síntesis de aminoácidos aromáticos), mientras que utilizar aminoácidos como fuente de nitrógeno reprimieron la proteína Sfp1p (factor de transcripción de la síntesis ribosomal de proteínas). Por lo tanto, la naturaleza y la concentración de la fuente de nitrógeno es uno de los factores más importantes para inducir diferentes rutas metabólicas con la finalidad de producir diferentes compuestos aromáticos. Las diferencias que fueron observadas en los medios ECP y DNP para cada una de las cuatro levaduras de este estudio (*W. anomalus*, *C. glabrata*, *C. utilis*, and *C. parapsilosis*) nos permite inferir que la utilización catabólica de la fenilalanina es una ruta más efectiva que la producción en la ruta *De novo*, ya que la síntesis de 2-PE y 2-PEA fue mayor en el medio ECP.

Es importante destacar también, que la acumulación de 2-PE causa en las levaduras un proceso de toxicidad intracelular, lo cual ha sido reportado por diversos autores (Adler et al., 2011; Chreptowicz et al., 2016; Stark et al., 2003). Esto podría dar lugar a una transformación del alcohol superior a su forma del éster, afectando los niveles de acumulación el 2-PE en el medio de cultivo. Aun cuando no existe evidencia precisa de la función biológica de estos compuestos, se sugiere que la enzima alcohol acetiltransferasa (Atfp2p) que cataliza esta reacción está relacionada con un proceso de detoxificación (Uber, 2006). Sin embargo, es importante resaltar también que este proceso de detoxificación puede

revertirse con el tiempo. Wittmann et al. (2002) observó con una cepa de *K. marxianus* que la producción de 2-PEA es significativamente menor que la de 2-PE, y determinó que la acumulación del alcohol superior en las etapas tardías de la fermentación se debe en parte a la hidrólisis del 2-PEA.

6.2 Caracterización fisicoquímica de vinazas tequileras

Los resultados de la caracterización de las vinazas se presentan en la Tabla 6. Se identificaron 3 diferentes procesos de cocimiento del agave y dos sistemas de destilación en los procesos de elaboración de tequila de las dos regiones que fueron muestreadas.

Se encontró un bajo nivel de azúcares reductores (1.79-4.5 g/L), el cual fue similar a lo encontrado en estudios previos de caracterización de vinazas (Dos Reis et al., 2018; López et al., 2010; Robles-González et al., 2012; Silva et al., 2011). Se observaron también diferencias en la concentración total de nitrógeno disponible, ya que la vinaza A presentó la concentración menor con 50 mg/L, mientras que las otras muestras estuvieron en el rango de 177 a 482 mg/L. De manera similar, se han reportado vinazas de tequila con un bajo contenido de nitrógeno (20-50 mg/L) (López et al., 2010). Sin embargo, las vinazas de mezcal, han presentado mayores concentraciones de este parámetro oscilando entre los 660 a 5650 mg/L (Robles-González et al., 2012), lo cual es más consistente con los resultados de Dos Reis et al. (2018) (818 mg/L). Por lo tanto, los valores observados en la Tabla 6 podrían estar asociados con diferencias en el proceso de elaboración de tequila, Esto se debe a que la relación C/N con un bajo contenido de nitrógeno puede tener efectos negativos en el metabolismo de microorganismos (Sanclemente Reyes & Valencia Trujillo, 2011), especialmente en los procesos de síntesis de proteínas. Con excepción de la vinaza A, la cual presentó una baja concentración de nitrógeno y una relación C/N alta (154 g/g), se encontró que esta relación en las vinazas tequileras su valor no excede el punto donde pudiera intervenir en el proceso de fermentación (12-67 g/g).

Los valores máximos de DQO y DBO₅ fueron mayores (6.7 g/L y 3.8 g/L respectivamente) que aquellos previamente reportados para vinazas de mezcal (6.0 g/L y 2.2 g/L) (Robles-González et al., 2012); vinazas de la producción de cachaca brasileña (5.9 g/L y 1.9 g/L) reportados por Silva et al.

(2011), y vinazas de tequila (4.2 g/L y 1.8 g/L) (Dos Reis et al., 2018). Esto podría indicar que las vinazas tequileras son desechos líquidos más recalcitrantes que los de otras bebidas similares (como por ejemplo la cachaça), y estos valores dependen en el origen de la vinaza correspondiente. Estos parámetros pueden ser afectados por el origen de la materia prima, la preparación del mosto, el sistema de la fermentación alcohólica, la especie de levadura, y los procesos de destilación y separación. (Ahmed et al., 2013; España-Gamboa et al., 2011; López et al., 2010; Pinal et al., 2009; Prado-Ramírez et al., 2005). Sin embargo, puede ser observado también que en los resultados obtenidos de este parámetro (Tabla 6), no hubo una correlación clara entre el origen de las vinazas y el proceso del cual fueron obtenidas, sin embargo, probablemente dicha correlación pueda encontrarse en el tipo de equipo utilizado durante el proceso de destilación.

Tabla 6 Caracterización fisicoquímica de las diferentes vinazas tequileras

Region	"Del Valle"					Los Altos				
Vinaza	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Parámetro										
Azúcares red. (g/L)	4.25±0. 5	3.62±1.2	3.4±1.0	1.79±0.1	3.31±0.6	3.89±0.1	2.55±1.6	4.34±0.1	2.72±1.4	3.06±0.6
Azúcares totales (g/L)	7.78±2. 9	9.31±4.5	7.17±1.5	5.82±0.2	7.54±1.5	7.19±0.7	7.22±1.6	17.15±6. 7	7.29±0.8	8.68±0.3
Nitrógeno total (mg/L)	50.4±2 0.1	482.4±5 7.2	232.6±11 0.0	226.5±12 4.0	439.6±4 6.3	341.8±4 6.5	388.5±13 8.7	312.4±2 5.0	177.8±12 1.9	315.9±20 5.7
Relación C/N	154.0	19.0	31.0	26.0	17.0	21.0	19.0	55.0	41.0	27.0
Fenilalanina (µg/L)	<0.01*	<0.01*	<0.01*	0.026	<0.01*	0.011	0.026	<0.01*	0.013	0.019
Valina (µg/L)	0.039	<0.01*	0.022	0.041	<0.01*	<0.01*	0.016	<0.01*	<0.01*	<0.01*
Leucina (µg/L)	0.02	<0.01*	<0.01*	0.036	<0.01*	0.011	0.017	0.01	<0.01*	<0.01*
Isoleucina (µg/L)	<0.01*	<0.01*	<0.01*	0.01	<0.01*	<0.01*	<0.01*	<0.01*	<0.01*	<0.01*
DQO (g/L)	68.7±1 5.6	55.7±34. 8	58.8±0.4	53.5±13. 6	50.0±26. 7	50.6±32. 8	59.8±17. 4	66.2±2.0	46.9±17. 2	69.1±2.0
DBO ₅ (g/L)	23.1±0. 8	22.7±2.1	20.6±3.4	18.5±1.3	22.8±2.1	20.7±1.7	28.0±8.6	28.6±12. 9	22.5±6.0	29.8±12. 9
Sólidos totales (mg/L)	33.5±2 3.4	23.7±19. 0	44.3±13. 9	17.3±0.1	26.5±1.4	20.7±10. 7	38.8±6.7	66.7±12. 8	20.7±12. 3	56.4±16. 7

Los resultados se muestran como un promedio con desviación estándar de dos réplicas de las vinazas recolectadas en dos regiones durante dos periodos de producción diferentes. Las muestras que corresponden a la región "Del Valle" (A, B, C, D, E), mientras que las muestras de "Los Altos" (F, G, H, I, J). *0.01 límite de detección mínimo.

Por el contrario, las diferencias en el proceso tuvieron un efecto en los sólidos totales. Las vinazas obtenidas a partir de un proceso de difusor presentan una cantidad significativa menor en comparación con aquellas que se obtuvieron del proceso de extracción de azúcares y cocimiento tradicionales, es por ello que los procesos previos a la destilación también son clave en la composición final de las vinazas tequileras.

La cuantificación de aminoácidos se presenta también en la Tabla 6. En ella se muestra que la cantidad de aminoácidos aromáticos es baja (0.01-0.026 $\mu\text{g/L}$), lo cual es consistente con los resultados obtenidos por Díaz-Montaña et al. (2008), el cual deduce que la baja concentración de alcoholes superiores y otros metabolitos puede relacionarse con la pobre concentración de aminoácidos provenientes del jugo de agave y consecuentemente, en las vinazas tequileras.

Otro parámetro importante fue la evaluación de la presencia de compuestos inhibidores en vinazas. Estos compuestos provienen de la hidrólisis de los fructanos de agave durante el cocimiento en la elaboración del tequila, tales como el hidroximetilfurfural (HMF) o compuestos terpénicos que vienen de la planta de agave, como la vainillina (Villanueva-Rodríguez et al., 2016). Se ha reportado anteriormente que estos compuestos afectan de manera negativa los rendimientos de fermentación (Gschaedler et al., 2015); y aun cuando se supone que estos compuestos no son metabolizados por las levaduras, algunas de ellas son capaces de tolerarlos en altas concentraciones (Sandoval-Nuñez et al., 2018). Los resultados obtenidos en la cuantificación de estos compuestos inhibidores se muestran en la Tabla 7. La vinaza H presenta las concentraciones más altas de estos compuestos con un total de 455 mg/L, mientras que las vinazas B y D presentaron la menor cantidad de estos con 85 mg/L y 99 mg/L respectivamente. A pesar de que no hay información exhaustiva acerca de estos compuestos en la literatura, los resultados de García et al. (1997) en vinazas de la producción de etanol a partir de azúcar de caña muestran una cantidad similar a los inhibidores máximos encontrados reportados como fenoles totales. (469 mg/L).

Tabla 7 Compuestos inhibidores presentes en vinazas tequileras

Vinaza	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Compuesto (mg/L)										
Hidroquinona	4.29±2 .64 ^g	12.66 ±0.08 ^f	4.88±0 .18 ^g	37.42 ±0.04 ^d	42.06± 1.12 ^c	43.60 ±0.01 ^c	49.07± 1.46 ^b	96.43± 0.30 ^a	1.82± 0.05 ^g	22.74± 0.12 ^c
Hidroxiacetilfurfural	127.94 ±3.53 ^c	18.18 ±0.32 ^f	140.25 ±0.51 ^b	22.05 ±0.02 ^f	126.38 ±0.06 ^c	21.79 ±0.03 ^f	115.63 ±0.24 ^d	227.13 ±1.09 ^a	85.91 ±0.37 ^c	137.47 ±0.85 ^b
Furfural	8.17±0 .37 ^b	5.87± 0.11 ^d	4.47±0 .01 ^c	0.18± 0.01 ^h	10.61± 0.05 ^a	7.39± 0.01 ^c	2.71±0 .15 ^f	8.70±0 .12 ^b	2.00± 0.02 ^g	4.95±0 .01 ^c
Ácido 2-Furoico	24.95± 7.05 ^b	20.49 ±1.00 ^b	17.07± 0.07 ^b	2.03± 0.01 ^c	11.49± 0.01 ^b	10.43 ±0.01 ^b	19.89± 0.25 ^b	38.59± 0.37 ^a	9.93± 0.04 ^b	18.75± 0.17 ^b
Ácido hidroxibenzoico	5.09±3 .14 ^b	5.06± 0.11 ^b	7.02±0 .25 ^b	3.10± 0.05 ^c	3.70±0 .18 ^c	5.20± 1.19 ^b	5.32±0 .30 ^b	4.71±0 .07 ^b	9.05± 0.09 ^a	8.87±0 .07 ^b
Hidroxiacetilzaldehído	0.54±0 .76 ^g	0.92± 0.04 ^g	22.17± 0.10 ^d	23.57 ±0.01 ^d	19.40± 0.32 ^e	25.07 ±0.14 ^c	2.60±0 .78 ^f	49.50± 0.19 ^a	22.69 ±0.06 ^d	31.60± 0.23 ^b
Ácido vanilínico	37.78± 1.27 ^a	16.46 ±0.26 ^c	4.25±0 .02 ^d	4.27± 0.04 ^d	3.84±0 .02 ^d	4.21± 0.001 ^d	3.56±0 .19 ^d	2.91±0 .12 ^d	26.81 ±0.19 ^b	37.38± 0.27 ^a
Vainillina	1.57±0 .63 ^d	1.025 ±0.02 ^d	4.23±0 .05 ^c	5.86± 0.01 ^c	7.22±0 .01 ^c	6.21± 0.03 ^c	22.63± 0.74 ^a	24.51± 1.10 ^a	1.84± 0.47 ^d	10.57± 0.20 ^b
Acetovanilona	0.44±0 .62 ^a	1.45± 0.86 ^a	ND	ND	0.68±0 .01 ^a	0.89± 0.01 ^a	0.86±0 .08 ^a	0.81±0 .11 ^a	ND	ND
Acetosirigona	1.51±0 .03 ^a	1.18± 0.04 ^c	1.18±0 .02 ^c	1.19± 0.01 ^c	1.36±0 .01 ^b	1.19± 0.002 ^c	ND	1.41±0 .03 ^a	ND	1.34±0 .06 ^b
Coniferilaldehído	5.26±0 .65 ^a	2.28± 0.01 ^b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Los resultados se muestran como el promedio de duplicados de muestras de vinazas con su desviación estándar. Las comparaciones se hicieron entre las diferentes vinazas para cada compuesto; diferentes letras minúsculas muestran una significancia estadística a una $p < 0.05$. ND – No detectado.

6.3 Fermentaciones de levaduras no-convencionales en vinazas tequileras para la producción de 2-feniletanol y 2-feniletacetato

En la Figura 6 se muestran los resultados de desempeño de las fermentaciones de las levaduras evaluadas con las vinazas tequileras. No se observaron diferencias en el porcentaje de consumo de azúcares entre las diferentes levaduras, en la mayoría de las vinazas, excepto las muestras G y H, donde la levadura *W. anomalus* fue la más afectada (Figura 6a). Los rendimientos de biomasa para las 4 levaduras se muestran en la Figura 6b. Se observó un comportamiento similar al consumo de azúcares, donde en las vinazas G y H, se obtuvieron los menores rendimientos. Estas dos vinazas presentaron la mayor concentración de compuestos inhibidores (particularmente en la vinaza H); sin embargo, *C. parapsilosis* fue capaz de mantener rendimientos de biomasa más altos, lo cual indica que presenta una mejor tolerancia para sobrevivir a este tipo de condiciones de estrés, lo cual ha sido reportado también por Dos Reis et al. (2018), con una producción de biomasa de 5 g/L en fermentaciones tanto en vinazas de cachaca como vinazas tequileras. Por el contrario, *W. anomalus* mostró el menor rendimiento de biomasa en las vinazas G y H. no obstante, esta levadura obtuvo de 4-7 g/L de biomasa en el resto de vinazas evaluadas, lo cual es similar a la cantidad producida (4-8 g/L) en vinazas de cachaca, de acuerdo a lo reportado por Silva et al. (2011).

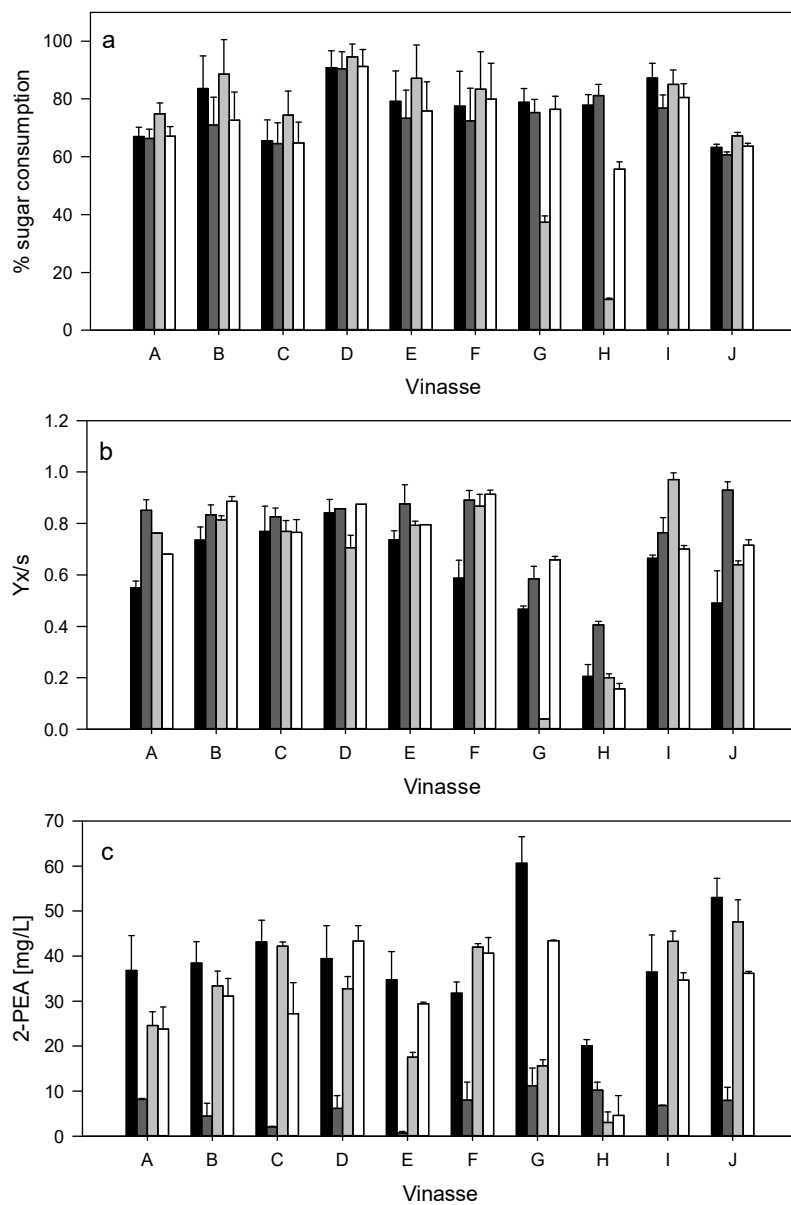


Figura 6

Fermentación en vinazas tequileras de las levaduras *Candida glabrata* (■), *Candida parapsilosis* (■), *Wickerhamomyces anomalus* (■) y *Candida utilis* (□). Porcentaje de azúcares consumidos (a), rendimientos de producción de biomasa (b) y producción de 2-feniletacetato (c).

Las vinazas presentan una concentración inicial de compuestos aromáticos (en un rango de 10 mg/L a 25 mg/L) proveniente de la destilación del mosto fermentado. Esta concentración inicial no fue tomada en cuenta al obtener los valores de los rendimientos finales de 2-PEA (*C. glabrata*: 32-60 mg/L; *W. anomalus*: 3-47 mg/L; *C. utilis*: 4-40 mg/L; *C. parapsilopsis*: 1-11 mg/L). Esto ha sido reportado para otro tipo de bebidas, tales como vino y cerveza. (Garrido, 2011; Pires et al., 2014). La mayor producción de 2-PEA se logró con la levadura *C. glabrata* con una concentración de 60 mg/L, seguida de *W. anomalus* con 47 mg/L, lo cual es similar a los niveles reportados por Dos Reis et al. (2018) (de 19 mg/L a 68 mg/L). *C. parapsilopsis* obtuvo la menor acumulación de 2-PEA, como puede observarse en la Figura 6c. Como fue mencionado anteriormente, el contenido de aminoácidos en las vinazas tequileras no es suficiente para la producción a través de la vía catabólica de Ehrlich. Aun así, la producción de estos metabolitos alcanzó concentraciones similares a las obtenidas en el medio definido a partir de glucosa.

La sobreexpresión del gen *ARO10* en una cepa de *S. cerevisiae* implementada por Shen et al. (2016) reporta concentraciones de 2-PE de menos de 10 mg/L en la cepa control sin modificar, y una concentración máxima de 90 mg/L con una cepa transformada. Otro enfoque fue evaluado por Rollero et al. (2015), probando el efecto combinado de nutrientes en la producción de compuestos aromáticos en un proceso de fermentación de vino, y utilizando la metodología de superficie de respuesta, se observó que en el caso de 2-PEA y el 2-PE, el nitrógeno asimilable tuvo un efecto cuadrático negativo, estableciendo que una concentración de 200 mg/L de fuente de nitrógeno permite una producción de 16 mg/L de 2-PE, la cual es una cantidad menor a la encontrada en la mayoría de las vinazas. Otro ejemplo es el trabajo de Etschmann et al. (2005), quien obtuvo concentraciones de 0.97 g/L para 2-PE y 0.31 g/L para 2-PEA a partir de un medio optimizado de melaza, suplementado con fenilalanina, utilizando una levadura *K. marxianus* previo a la aplicación de estrategias de remoción *in-situ* (ISPR) para obtener concentraciones finales de 2.2 y 1.27 g/L de 2-PE y 2-PEA respectivamente.

Se puede inferir que el 2-PE no se acumula en el medio debido a que probablemente se transforma directamente en 2-PEA; este comportamiento ha sido reportado previamente en fermentaciones con jugo de agave, donde se comparó el desempeño de levaduras no convencionales *K. africana* y *K. apiculata* contra cepas de *S. cerevisiae*, y se obtuvieron cantidades significativamente mayores de 2-PEA que de 2-PE, con un resultado de un rango de 51 a 60 mg/L (Díaz-Montaña et al., 2008).

Se ha reportado también que la síntesis de compuestos aromáticos está asociada al crecimiento (Etschmann et al., 2005), lo cual se observó también en las fermentaciones con las vinazas tequileras. Los valores de estos dos parámetros se redujeron al mismo tiempo que la concentración de compuestos inhibidores incrementó. Por lo tanto, los niveles de 2-PEA se vieron más afectados por la concentración de estos compuestos que por la concentración de nutrientes (relación C/N).

6.3.1 Reducción de la demanda Química y Bioquímica de Oxígeno de vinazas tequileras

Debido a que los mayores niveles de DQO y DBO₅ encontrados en la caracterización (Tabla 6) corresponden a los presentados por la muestra de vinaza J, esta fue seleccionada para llevar a cabo este análisis. Se realizó el proceso de fermentación utilizando las levaduras *C. glabrata* y *W. anomalus*. Se encontró que después de 120 horas de fermentación ambos microorganismos tuvieron un rendimiento similar con una reducción de aproximadamente más del 50% en los niveles de DQO y DBO₅, tal como se muestra en la Figura 7.

Estudios previos han reportado resultados similares en remociones de DQO, tales como el estudio de Seluy and Isla (2014) donde se logró una reducción de aproximadamente el 60% de efluentes de cerveza; el trabajo de Pires et al. (2016) obtuvieron reducciones en el rango de 39%-76% de DQO y 42%-56% para DBO₅, con un inóculo mixto de levaduras y bacterias en vinazas de cachaca (diluidas en 50% v/v); y más recientemente en el trabajo de Dos Reis et al. (2018), con una reducción de más del 80% en estos parámetros con vinazas diluidas al 70% v/v. Debe resaltarse que, en este trabajo, las vinazas tequileras no fueron diluidas, lo cual podría explicar las diferencias observadas en las reducciones de DQO y DBO₅ obtenidas en este trabajo.

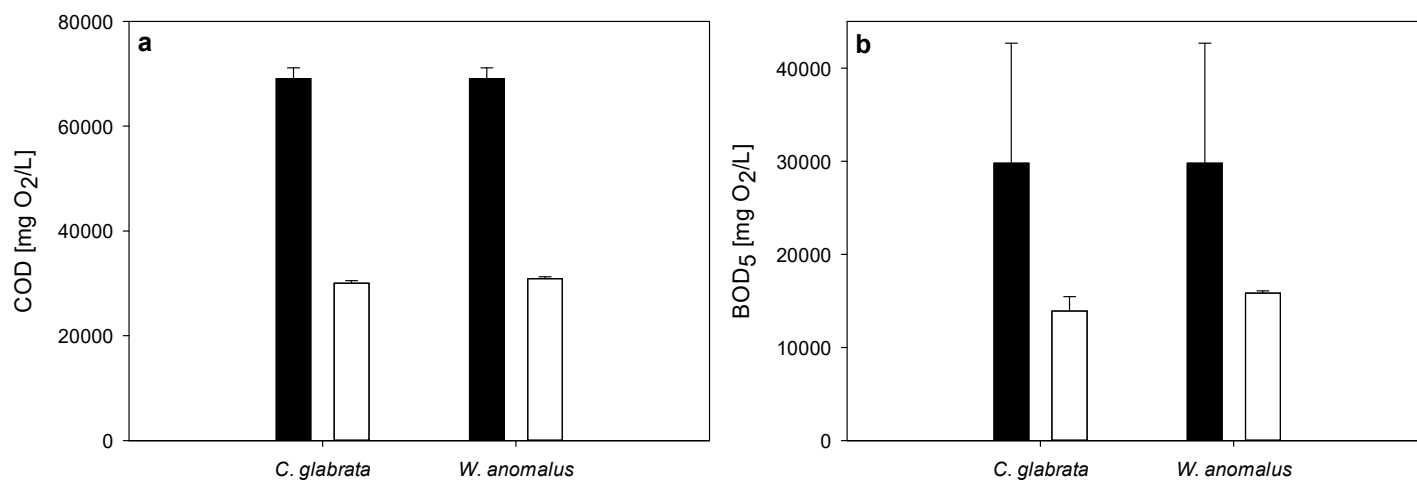


Figura 7

Niveles de DQO (a) y DBO₅ (b) al inicio (■) y después de 120 h de fermentación (□) por las levaduras *Candida glabrata* y *Wickerhamomyces anomalus*.

6.4 Modelado metabólico y análisis de Modos Elementales

Tal como se mencionó en el marco teórico, los modelos metabólicos son una herramienta útil para mejorar bioprocesos. De acuerdo a nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se implementan herramientas de modelado metabólico en la producción de compuestos aromáticos a partir de vinazas tequileras, utilizando levaduras no convencionales.

La Figura 8 muestra la red metabólica propuesta para la producción de 2-PE y 2-PEA. Como ya se mencionó anteriormente, este proceso puede ser llevado a cabo por medio del consumo de glucosa con la vía del Shikimato o el catabolismo de aminoácidos de la vía de Erlich. El metabolismo de la fenilalanina está relacionado con el consumo de nitrógeno, que a su vez se liga por medio del metabolismo del glutamato en la red metabólica construida (Hazelwood et al., 2008).

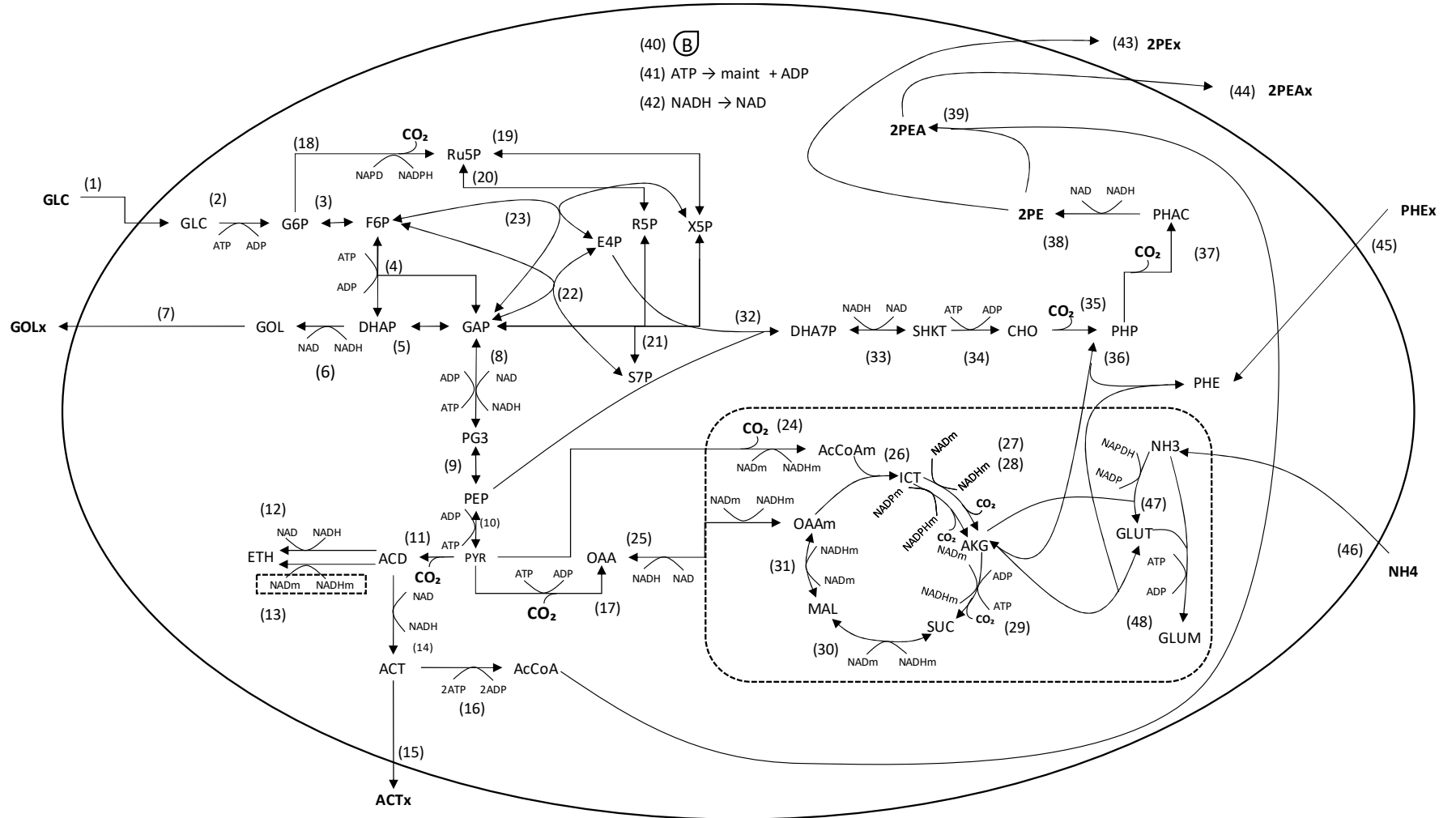


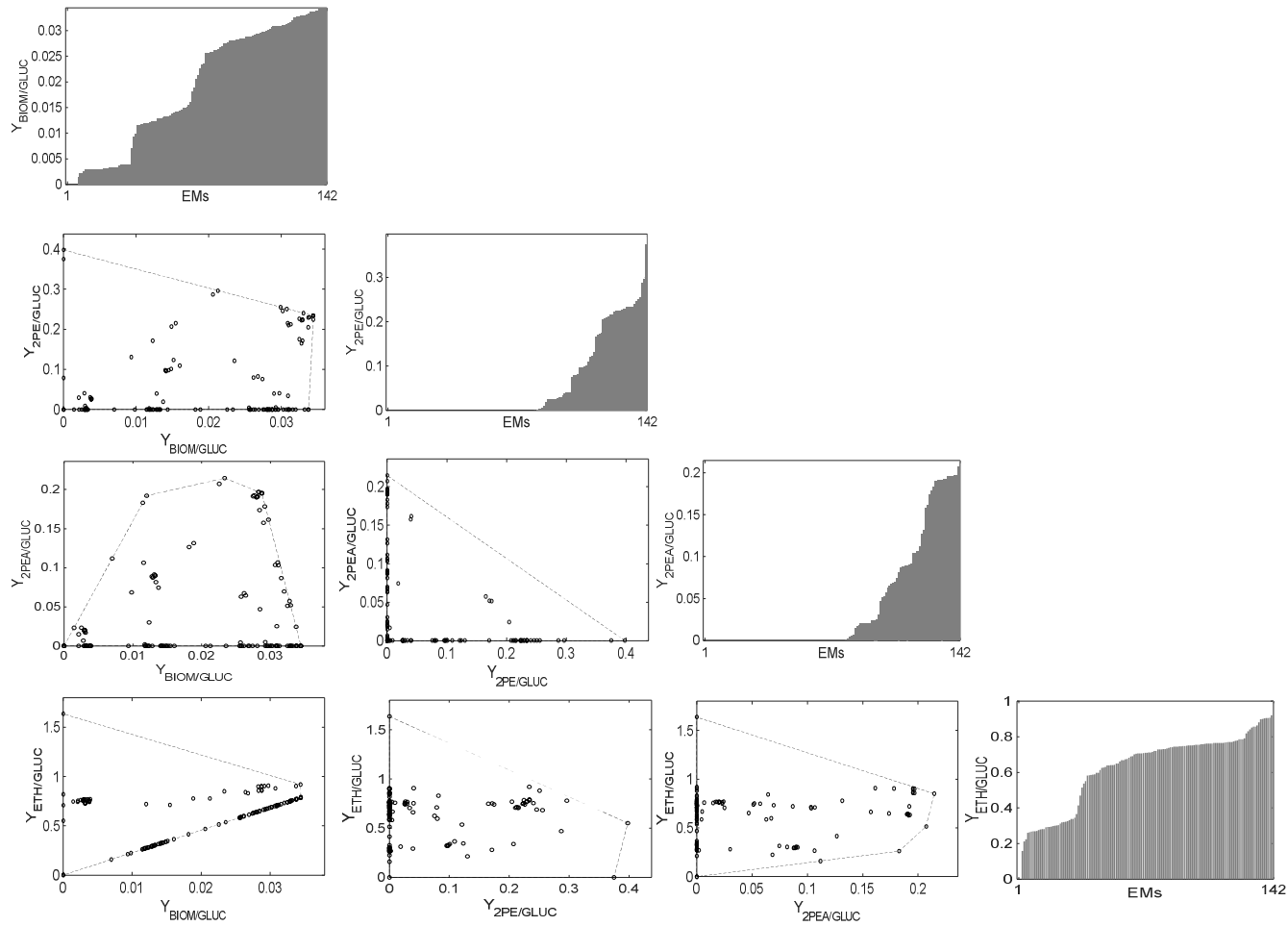
Figura 8

Red metabólica construida de la producción 2-PE y 2-PEA a partir de levaduras no-*Saccharomyces*. (ⓑ) componentes de la biomasa.

1
2
3

El análisis de la red metabólica condujo hacia 142 modos elementales (EMs), los cuales fueron menos que los obtenidos en el trabajo de Robles-Rodriguez et al. (2017) con 1944 modos elementales, así como el estudio de Song and Ramkrishna (2009), con 369 EMs computados. La diferencia entre estudios radica en el número de componentes del sistema, y la naturaleza de las reacciones involucradas en el proceso, así como el número de entradas (tipos de sustrato). Es por ello que cada sistema debe estar delimitado por el juicio y los objetivos de cada modelador.

La Figura 9 muestra la distribución de estos modos elementales para los parámetros de biomasa, 2-PE, 2-PEA y la producción de etanol, donde la diagonal representa los histogramas relacionados con el número de EMs contra los rendimientos de los metabolitos. Existen solamente 6 EMs que no incluyen la producción de biomasa, mientras que 72 y 62 de ellos involucran la producción de 2-PEA y de 2-PE respectivamente. Por lo tanto, la producción de biomasa y etanol están ligadas a la síntesis de 2-PEA y 2-PE.



1

2

Figura 9

3

Distribución de los Modos Elementales de la red metabólica. Se muestran los histogramas de la distribución de los modos elementales (diagonal) gráficas de rendimientos (diagonal baja).

4

La matriz diagonal bajo los histogramas muestra los gráficos de rendimientos teóricos de los componentes del sistema (biomasa, etanol, 2-PE, 2-PEA) en los ejes con respecto a fuente de carbono (glucosa). Estos gráficos de rendimientos muestran la geometría de cada uno de los espacios de solución para los rendimientos predichos de cada uno de los metabolitos de interés. Puede observarse en cada uno de estos espacios correspondientes, que el número de soluciones encontradas para la biomasa y el etanol es mayor en comparación con las encontradas para la producción de 2-PE y 2-PEA.

Esta información nos permite comprender (desde un punto de vista estequiométrico) la importancia de cada conjunto de reacciones en la red metabólica. Por lo tanto, para la síntesis de los compuestos aromáticos de interés, se sugiere la utilización de cepas de levaduras con una baja producción de etanol con la finalidad de incrementar el flujo de carbono hacia estos metabolitos. Es por ello que las levaduras no-convencionales estudiadas en este trabajo son adecuadas para la producción de 2-PE y 2-PEA, ya que no son consideradas como grandes productoras de etanol (Hye Ryun et al., 2013).

El espacio de solución mostrado en la Figura 10 se utilizó para validar los resultados experimentales de los rendimientos (Y_{2PEA}/Y_{GLUC}) obtenidos de los medios ECP y DNP para las levaduras evaluadas. Los datos experimentales de la producción de 2-PEA fueron seleccionados para este propósito debido a que este metabolito fue el que se produjo en mayor concentración (Tabla 8). Puede observarse los resultados se encuentran dentro de los límites de este espacio, lo cual corrobora que el conjunto de ecuaciones de la red metabólica construida representa de manera correcta el metabolismo de estas levaduras no-convencionales y confirma que este es un modelo adecuado para este proceso.

La diferencia observada entre las especies de levaduras con respecto a los rendimientos obtenidos (2-PEA y biomasa) muestran que las mejores productoras de 2-PEA y biomasa fueron las levaduras *W. anomalus* y *C. glabrata*, lo cual se relaciona con el comportamiento observado en la Figura 8. La red metabólica también mostró que es posible un aumento teórico en la producción de 2-PEA, en bajas concentraciones de fenilalanina. Por lo tanto, otros factores que pudieran incidir en la mejora de los

rendimientos de estos metabolitos podrían ser investigados; tales como la relación C/N, el tipo de fuente carbono y nitrógeno, la sensibilidad al 2-PE, entre otros.

El análisis de modos elementales obtenido a partir de esta red metabólica en la ruta del shikimato (biosíntesis *De novo*) y la ruta catabólica de la fenilalanina, permitieron observar que no existe una coexistencia de ambas (datos no mostrados). Esto ha sido establecido en otros estudios (Jimenez-Marti & del Olmo, 2008), donde se estudió la expresión de genes de diferentes condiciones metabólicas. Ellos reportaron que las levaduras son capaces utilizar selectivamente diferentes fuentes de nitrógeno como un mecanismo de regulación, mostrando una reprogramación diferenciada de la expresión genética dependiendo de la fuente de nitrógeno que fuera agregada al medio de cultivo. También encontraron que la adición de amonio resulto en una mayor expresión de genes involucrados en la síntesis de aminoácidos, mientras que la adición de estos como fuente de nitrógeno prepara a la célula directamente para la biosíntesis de proteínas.

De acuerdo a lo anterior, así como a lo observado en la sección de caracterización de vinazas tequileras (Tabla 6), la cantidad presente de aminoácidos aromáticos es baja, lo cual indica que la producción de compuestos aromáticos en vinazas tequileras proviene a partir de la ruta del shikimato.

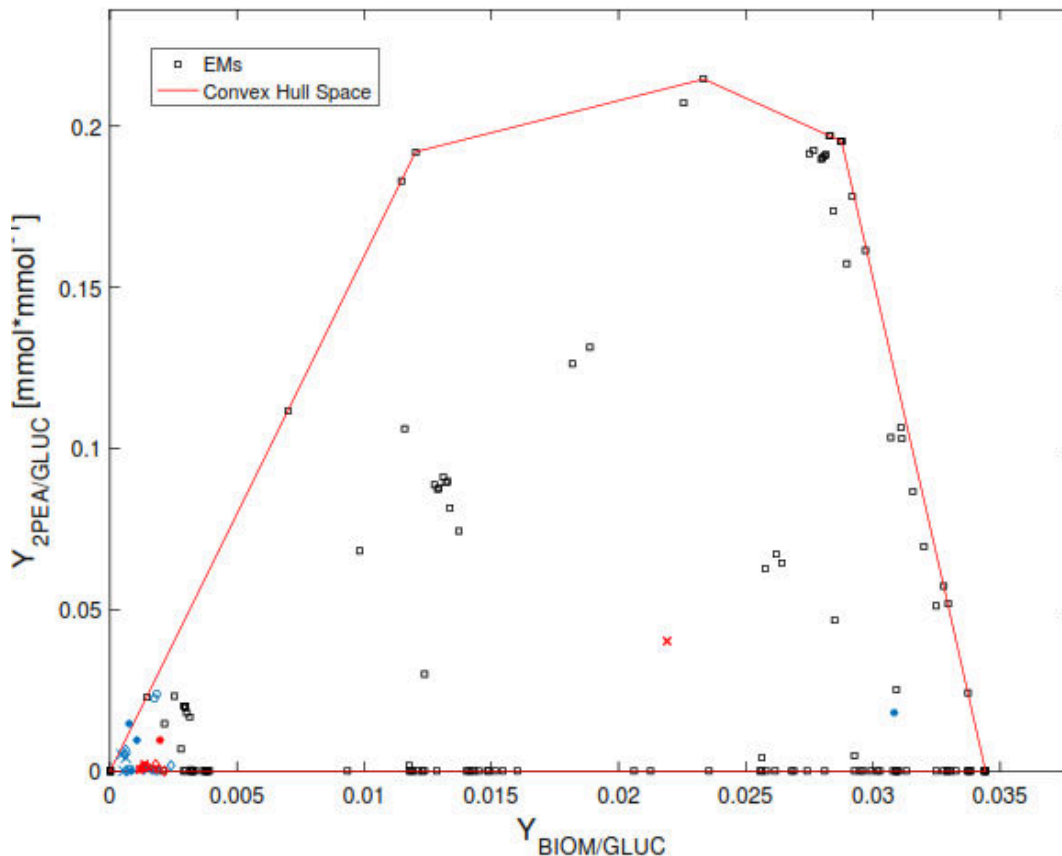


Figura 10

Análisis de rendimientos para la producción de 2-PEA. * *Candida glabrata*; o *Candida parapsilosis*; x *Wickerhamomyces anomalus*; ◇ *Candida utilis*. Las figuras en rojo representan los datos experimentales obtenidos en el medio *De Novo*, mientras que las figuras azules los resultados del medio inductor de catabolismo.

Lo establecido anteriormente se relaciona con el bioproceso de las vinazas tequileras, junto con el análisis de flujos y rendimientos, ya que permitió determinar los flujos del consumo de la fuente de carbono de los 142 EMs computados, y establecer como impactan estos en los rendimientos finales de los metabolitos deseados. Los resultados de estos análisis se muestran en la Tabla 5, donde se encontró que 35 EMs excluyen el uso de la fenilalanina (vía metabólica del shikimato); sin embargo, 23 de ellos no eran biológicamente posibles debido a una interrupción del ciclo del ácido cítrico y una falta de producción de biomasa (aun cuando uno de estos escenarios fue el EMs con la mayor proyección del rendimiento en la producción de 2-PE, tuvo que ser descartado), teniendo como

resultado 12 posibles escenarios biológicamente posibles para los metabolitos de interés mostrados en la siguiente tabla.

Tabla 8 Análisis de modos elementales (EMs) del metabolismo de levaduras no convencionales

EM	$Y_{BIOM/GLUC}$	$Y_{2-PE/GLUC}$	$Y_{2-PEA/GLUC}$	$Y_{N/GLUC}$	$Y_{ETH/GLUC}$
18	0.003	0.0091	0	0.0221	0.7589
20	0.0028	0	0.0069	0.0208	0.7597
26	0.0268	0.0819	0	0.1985	0.8935
27	0.0264	0	0.0646	0.1958	0.84
53	0.0015	0	0.0232	0.0107	0.7464
55	0.012	0	0.192	0.089	0.7204
80	0.0032	0.0005	0	0.0236	0.7291
82	0.0032	0	0.0005	0.0235	0.7296
122	0.0021	0.0295	0	0.0157	0.7448
124	0.0021	0	0.0149	0.0158	0.7532
128	0.0155	0.2155	0	0.1146	0.7123
129	0.0189	0	0.1314	0.1398	0.7779

Los EMs se expresan como rendimientos con respecto al consume de glucosa. Las unidades de los rendimientos están dadas en (mmol/mmol GLUC) a excepción de la biomasa, la cual está expresada como (g BIOM/mmol GLUC)

Los valores de rendimiento máximos para 2-PEA y 2-PE fueron 0.13 y 0.21 mmol/mmol GLUC respectivamente, los cuales deben considerarse como valores de referencia para su producción en las vinazas tequileras. El siguiente paso para incrementar la concentración de estos compuestos de interés sería determinar los niveles de enriquecimiento de las vinazas, tomando en consideración este análisis de rendimientos como guía, considerando como los factores principales de interés la síntesis de los compuestos aromáticos, la producción de biomasa; y probablemente, la producción de etanol.

6.5 Pruebas de inhibición del 2-feniletanol sobre el crecimiento de levaduras no-convencionales

Los cultivos para las pruebas cualitativas de inhibición se muestran en la Figura 11. Se observó la presencia de inhibición en el crecimiento de las 4 levaduras conforme se aumenta la concentración de 2-PE. En la Tabla 9 se presenta a detalle los resultados obtenidos a partir de esta prueba cualitativa.

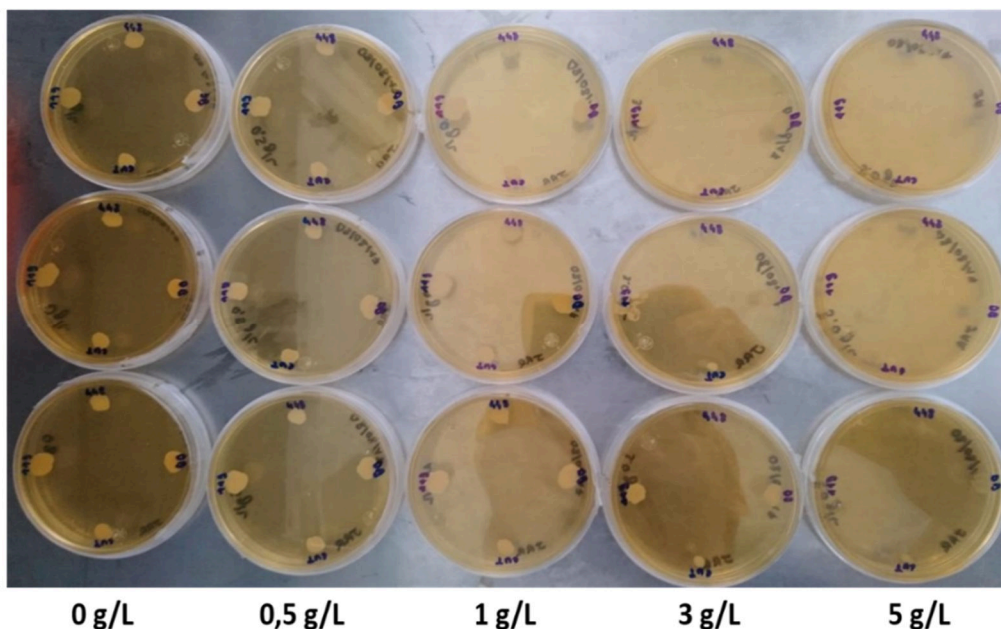


Figura 11

Pruebas de inhibición cualitativas en levaduras no-convencionales

Tabla 9 Inhibición por 2-PE por pruebas cualitativas

	0 g/L	0,5 g/L	1 g/L	3 g/L	5 g/L
<i>C. parapsilosis</i> (448)	***	***	***	*	
<i>C. glabrata</i> (119)	***	***	***	**	*
<i>C. utilis</i> (CUT)	***	***	***	*	
<i>W. anomalus</i> (DB)	***	***	***	**	*

Nota: *** Sin inhibición del crecimiento, **disminución notable del crecimiento, *reducción significativa, ∅ Sin crecimiento

Cada uno de los microorganismos presentó una reducción en el crecimiento a partir de una concentración de 3 g/L de 2-PE en el medio de cultivo. *W. anomalus* y *C. glabrata* fueron las levaduras que presentaron una mayor tolerancia a este compuesto, con una capacidad de crecimiento en el nivel de concentración de 5 g/L, aun cuando la literatura ha reportado una completa ausencia de crecimiento a concentraciones entre 2 a 3 g/L para levaduras de las especies *S. cerevisiae* y *K. marxianus* (Chreptowicz et al., 2016; Rong et al., 2011; Stark et al., 2003). Los resultados de este estudio cualitativo permitieron descartar dos especies de levaduras (*C. parapsilosis* y *C. utilis*) y posteriormente llevar a cabo fermentaciones en medio líquido para evaluar la cinética de inhibición del 2-PE. Los resultados obtenidos en estas fermentaciones demuestran una tolerancia moderada al aumento de la concentración de este alcohol superior, con una concentración de hasta 1 g/L para la levadura *C. glabrata*, mientras que la levadura *W. anomalus* logró continuar con su crecimiento en la concentración máxima de 3 g/L. Sin embargo, se observó una menor velocidad de crecimiento en comparación con las obtenidas a partir de menores concentraciones de 2-PE, tal y como se muestra en la Figura 12, mientras que la Figura 13 muestra el consumo de azúcares del medio, que corrobora lo establecido anteriormente.

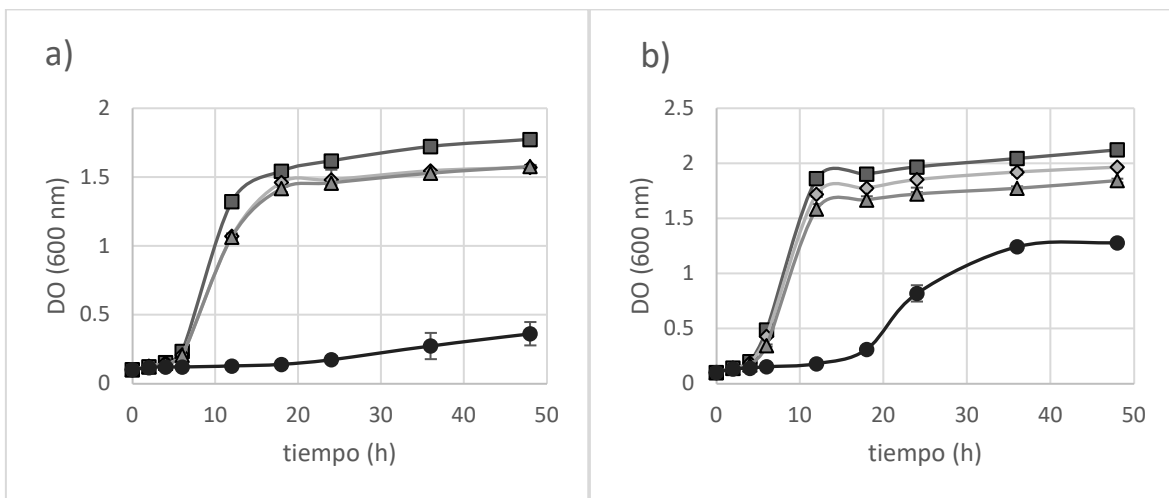


Figura 12

Cinéticas de crecimiento de las levaduras a) *C. glabrata*, b) *W. anomalus*
 ■ 0 g/L; ◆ 0.5 g/L; ▲ 1g/L; ● 3g/L

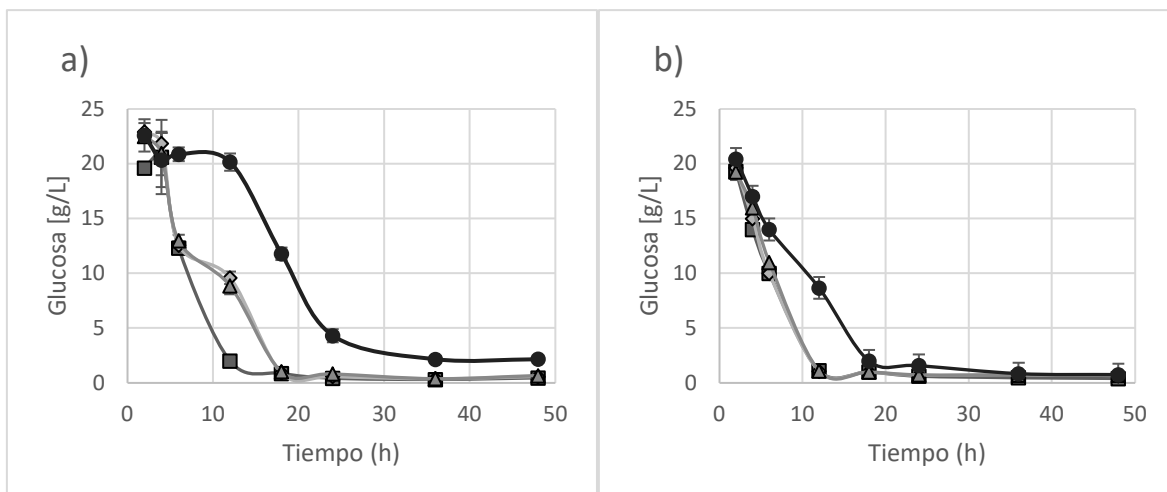


Figura 13

Cinéticas de consumo de azúcares de las levaduras a) *C. glabrata*, b) *W. anomalus*

■ 0 g/L; ◆ 0.5 g/L; ▲ 1g/L; ● 3g/L

Se ha reportado que el acondicionamiento de las levaduras a condiciones de estrés, está relacionado con diversos factores, entre los cuales se menciona la estructura lipídica de la membrana celular, algo íntimamente ligado al mecanismo de inhibición que ha sido reportado para el 2-PE (Stark et al., 2003). Se ha encontrado que algunas especies de levaduras no-convencionales son capaces de adaptarse de mejor manera a este tipo de condiciones en comparación con *S. cerevisiae*, ya que son capaces de tolerar de mejor manera factores externo de estrés oxidativo (Vázquez et al., 2019), dejando establecido que los resultados pueden variar fuertemente dependiendo de la levadura utilizada, comportamiento que puede observarse en los gráficos anteriores.

La velocidad específica para cada levadura se muestra en la Tabla 10, donde se muestra que existe una diferencia significativa del análisis de varianza entre las diferentes concentraciones de 2-PE y entre ambos microorganismos ($p < 0.05$).

Tabla 10 Velocidades específicas de crecimiento de levaduras en diferentes concentraciones iniciales de 2-PE

[2-PE]	μ esp.	
	<i>C. glabrata</i>	<i>W. anomalus</i>
Control [0 g/L]	0.18	0.42
Baja [0.5 g/L]	0.17	0.23
Media [1 g/L]	0.26	0.17
Alta [3 g/L]	0.03	0.1

Esta respuesta al estrés de la levadura *W. anomalus* puede constatare en las imágenes de la Figura 14. Se observa una diferenciación en la forma de crecimiento entre el medio control (Figura 14a) y el medio con la mayor concentración de 2-PE (Figura 14b).

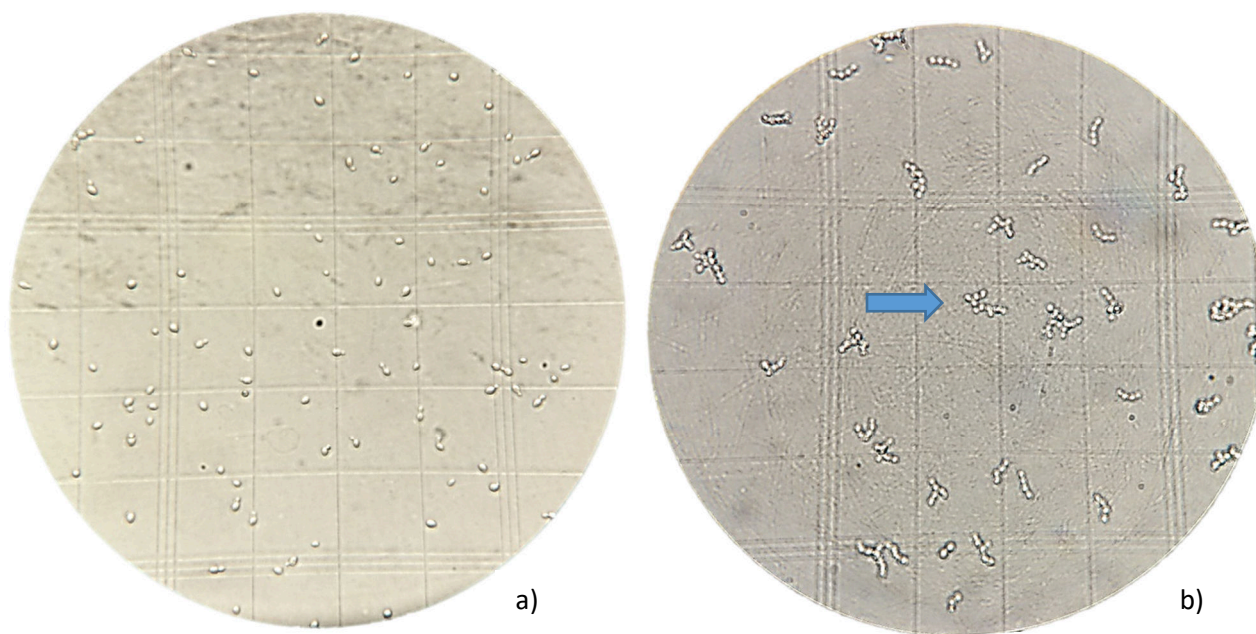


Figura 14

Diferencias en el crecimiento de *W. anomalus* entre a) medio control (dilución 1:50) y b) medio con altas concentraciones de 2-PE (sin diluir)

Estos resultados evidencian el comportamiento de la levadura en respuesta al estrés generado por la presencia de altas concentraciones de 2-PE. Aun cuando esta levadura logró continuar su desarrollo con una velocidad de crecimiento significativamente menor (Figura 12b), este se presentó en forma de aglomeraciones celulares, probablemente como un mecanismo de protección a las membranas de las levaduras para evitar el contacto directo con el medio de cultivo.

En la Tabla 11 se muestran los resultados de la cuantificación de los metabolitos de interés en las fermentaciones de las cinéticas de inhibición de ambas levaduras. No se encontró un cambio significativo en la cantidad de 2-PE inicial. Sin embargo, se observa como las diferentes concentraciones si tienen un efecto significativo sobre el crecimiento de cada una de las levaduras.

La concentración encontrada de 2-PEA fue menor a la esperada; sin embargo, se encuentran tendencias de incremento y disminución de la concentración de este metabolito a lo largo del tiempo de la fermentación en las concentraciones media y baja en ambas levaduras, lo cual podría indicar que este comportamiento es un mecanismo de balance del estrés generado por la presencia del 2-PE, tal y como se establece en el trabajo de Lyness et al. (1997).

Por último, se encontró también una diferencia significativa en la producción de etanol de ambas levaduras. *W. anomalus* logró una menor producción que *C. glabrata*, lo cual puede explicar el resultado de la inhibición observada en esta levadura. Lo anterior es uno de los factores a considerar en la obtención de estos compuestos aromáticos, ya que como se menciona en Wang et al. (2011), existe un efecto sinérgico en la inhibición del crecimiento provocado por la presencia de etanol como del 2-PE. Esto permite establecer que se podrían obtener los mejores resultados con la levadura *W. anomalus*. ya que la producción de etanol no intervendría en el proceso de producción de los compuestos aromáticos en forma de inhibición del crecimiento de la levadura.

Tabla 11 Cuantificación de Etanol, 2-PE y 2-PEA en las cinéticas de inhibición de las levaduras a) *C. glabrata* y b) *W. anomalous*

a)												
<i>C. glabrata</i>												
Tiempo (h)	Control (0 g/L)			Baja (0.5 g/L)			Media (1 g/L)			Alta (3 g/L)		
	Etanol	2-PE	2-PEA	Etanol	2-PE	2-PEA	Etanol	2-PE	2-PEA	Etanol	2-PE	2-PEA
4	0.11± 0.0	0.03± 0.0	ND	0.10± 0.0	0.50± 0.1	0.04± 0.0	0.11± 0.0	1.55± 0.1	0.03± 0.0	0.04± 0.0	3.63± 0.1	0.01± 0.0
12	14.29 ±3.3	0.19± 0.1	ND	9.42± 0.8	0.50± 0.1	0.08± 0.0	6.86± 0.6	1.26± 0.1	0.06± 0.0	0.05± 0.0	3.33± 0.3	0.02± 0.0
24	22.01 ±1.6	0.19± 0.1	ND	21.31 ±3.4	0.47± 0.0	0.07± 0.0	21.78 ±1.6	1.33± 0.0	0.08± 0.0	0.31± 0.1	3.56± 0.2	0.03± 0.0
48	13.30 ±0.9	0.23± 0.1	ND	17.15 ±1.8	0.65± 0.0	0.04± 0.0	20.27 ±0.8	1.46± 0.1	0.05± 0.0	1.98± 0.9	3.51± 0.4	0.05± 0.0

b)												
<i>W. anomalous</i>												
Tiempo (h)	Control (0 g/L)			Baja (0.5 g/L)			Media (1 g/L)			Alta (3 g/L)		
	Etanol	2-PE	2-PEA	Etanol	2-PE	2-PEA	Etanol	2-PE	2-PEA	Etanol	2-PE	2-PEA
4	0.09±0. 0	ND	ND	0.11± 0.0	0.55± 0.0	ND	0.06± 0.0	1.02± 0.2	ND	ND	2.72± 0.2	ND
12	8.32±0. 9	0.13 ±0.1	ND	8.05± 0.8	0.53± 0.0	0.01± 0.0	8.20± 0.5	0.99± 0.0	0.02± 0.0	0.28± 0.0	2.88± 0.4	ND
24	8.06±0. 7	0.14 ±0.1	ND	8.55± 0.4	0.54± 0.1	0.02± 0.0	8.58± 0.1	0.98± 0.0	0.02± 0.0	3.90± 0.9	2.86± 0.5	0.03± 0.0
48	6.66±0. 6	0.14 ±0.1	ND	6.21± 0.2	0.56± 0.0	ND	7.13± 0.8	0.93± 0.0	0.02± 0.0	7.60± 1.1	3.13± 0.2	0.04± 0.0

Los resultados se muestran como un promedio de 3 réplicas con desviación estándar. ND: No detectado.

6.6 Planteamiento del diseño experimental y condiciones de cultivo para el incremento de la producción de 2-feniletanol

Para los resultados correspondientes de esta etapa se establecieron como variables de respuesta, el crecimiento celular, los rendimientos de etanol, y compuestos volátiles de interés, con la intención de maximizar la producción del 2-PE a partir de las vinazas tequileras. Se llevó a cabo un monitoreo del crecimiento a lo largo de la fermentación, donde se pudieron observar diferencias significativas entre las distintas condiciones. Estas diferencias pueden apreciarse en la Figura 15, donde se muestran los resultados con la mayor y menor velocidad de crecimiento de *W. anomalous*.

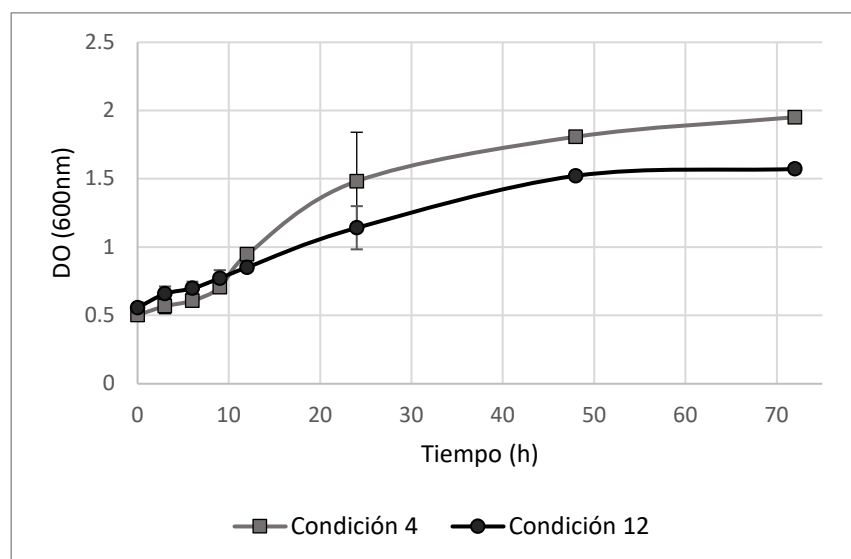


Figura 15

Cinéticas de crecimiento de la levadura *W. anomalous* en vinazas tequileras en diferentes condiciones.

El comportamiento observado en las condiciones de máximo y menor crecimiento están relacionadas con la composición específica de dichas condiciones, ya que la levadura logró alcanzar el mayor crecimiento con glucosa a 30 g/L como fuente de carbono y con la menor concentración de compuestos inhibidores presentes en el medio, mientras que la de menor crecimiento fue con la fuente de carbono de melaza de azúcar de caña a 10g/L y con un aumento en los compuestos inhibidores. Lo anterior podría estar relacionado con el hecho de que la melaza de azúcar de caña a pesar de ser

reportada como una buena fuente de azúcares disponibles (sacarosa 47-50%), minerales (zinc, calcio, manganeso, cobre magnesio, calcio) y nitrógeno disponible (0.5-1%) y por lo tanto una excelente opción en bioprocesos para la obtención de biomasa celular desde un punto de vista económico (Lee & Kyun Kim, 2001), se ha reportado que la presencia de algunos de estos minerales como el calcio en su composición interviene rutas de señalización relacionadas con un aumento en la velocidad del envejecimiento celular (Tsubakiyama et al., 2011).

La Tabla 12 corresponde a la matriz del diseño experimental de segundo orden Box-Behnken, en ella se presenta el número de tratamientos entre las combinaciones de las variables independientes codificadas con las variables de respuesta correspondientes a los resultados experimentales obtenidos para la obtención de etanol, acetato de etilo y 2-PE en cada uno de los ensayos. Al observar los resultados de cada uno de los tratamientos, se puede notar que en todas las condiciones la producción de etanol fue alrededor del 50%, excepto la condición número 4 (la cual pertenece a las condiciones control al hacer uso de glucosa como fuente de carbono), donde se presentó un porcentaje máximo de transformación a etanol del 55%.

Tabla 12 Resultados del diseño experimental para incrementar la producción de compuestos aromáticos

Condición	Fuente de carbono	Concentración de azúcares	Compuestos inhibidores presentes en las vinazas	Etanol [g/L]	2-PE [g/L]	Acetato de etilo [g/L]
1	0	-1	1	5.71±1.7	0.28±0.005	0.90±0.05
2	0	1	1	15.66±0.6	0.28±0.001	1.40±0.47
3	0	-1	-1	5.91±0.7	0.29±0.014	0.64±0.19
4	0	1	-1	16.72±1.1	0.29±0.008	1.15±0.14
5	0	0	0	9.92±1.4	0.33±0.052	1.22±0.06
6	-1	-1	0	5.55±0.9	0.30±0.022	0.78±0.07
7	-1	0	1	9.51±1.1	0.29±0.001	1.33±0.04
8	-1	0	-1	9.94±0.5	0.29±0.013	0.96±0.04
9	-1	1	0	15.26±0.2	0.28±0.011	0.82±0.28
10	1	0	1	7.55±0.7	0.28±0.004	0.72±0.14

11	1	0	-1	7.16±2.2	0.28±0.008	0.55±0.12
12	1	-1	0	4.45±1.0	0.29±0.001	0.57±0.09
13	1	1	0	9.82±0.4	0.28±0.008	0.77±0.05

En la Figura 16 se puede observar la cantidad de biomasa producida al final de las 72 horas de la fermentación.

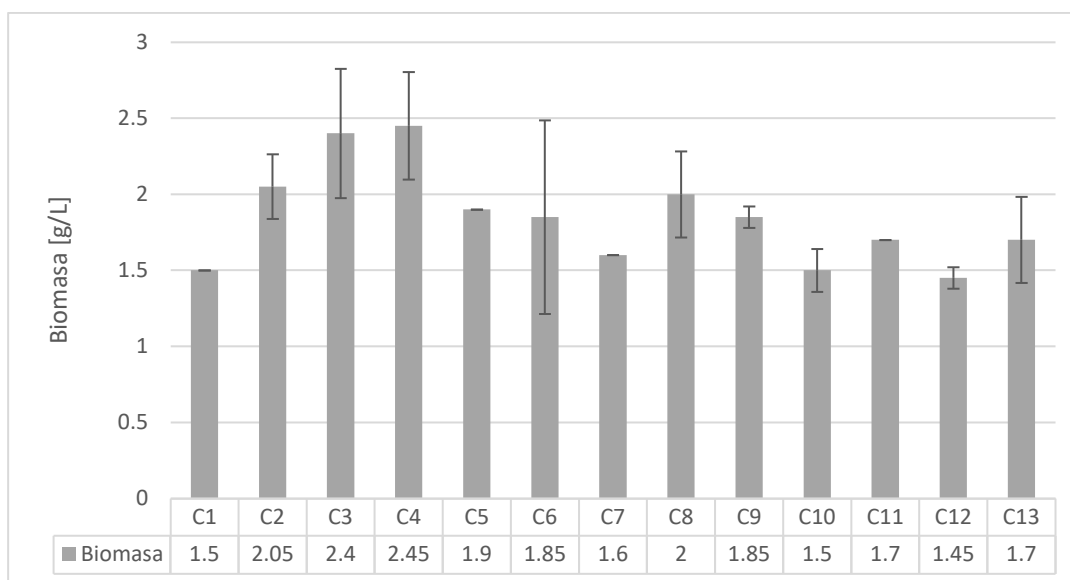


Figura 16

Producción de Biomasa al final de las 72 h de fermentación. Se muestra un promedio de 3 réplicas con desviación estándar.

En este gráfico puede apreciarse un mayor crecimiento en los tratamientos 2, 3, 4, 8 y 9, donde puede encontrarse una relación entre el grado de crecimiento y la producción de los diferentes metabolitos cuantificados, ya que estos tratamientos concuerdan con los resultados presentes en la Tabla 12.

Respecto al alcohol superior 2-PE, se encontró un incremento en la concentración de este metabolito a las 72 horas de fermentación que, en comparación con la concentración máxima encontrada en los experimentos previamente realizados (69 mg/L), presentó un incremento con un máximo de 330 mg/L, el cual representa un aumento del 478%. Lo anterior permite corroborar la eficacia de la

implementación del modelado metabólico obtenidos en la sección 6.4 (Tabla 8), ya que los rangos de los parámetros evaluados fueron obtenidos a partir de dicho análisis.

Existen reportes de trabajos anteriores que los rendimientos de producción de 2-PE se pueden mejorar al hacer cambios en la composición del medio, tal como en el estudio de (Etschmann et al., 2003), donde al cambiar la fuente de carbono de glucosa a sacarosa en un medio basado en melazas de remolacha una levadura *Kluyveromyces marxianus* incrementó su producción de 1 a 3 g/L de 2-PE. Sin embargo, es preciso destacar que la optimización que se plantea en muchos de los trabajos publicados involucra la utilización de cepas modificadas en conjunto con las modificaciones de medios definidos, mientras que en este trabajo se utilizan cepas nativas con medios más complejos como lo son las vinazas tequileras.

Puede observarse también que se encontró la presencia de acetato de etilo en el medio compuesto por vinazas. El acetato de etilo es un éster, cuyo componente alcohólico proviene del etanol, mientras que su componente de ácido carboxílico proviene del ácido acético (Hardinger, 2017), el cual está presente dentro de las condiciones iniciales del diseño experimental como uno de los compuestos inhibidores encontrados en las vinazas tequileras. Tal y como puede observarse en la Tabla 12, las máximas concentraciones encontrada fueron de 1.4 y 1.33 g/L para las condiciones 2 y 7 respectivamente, los cual es consistente con lo mencionado anteriormente, ya que dichas condiciones corresponden a aquellas donde se tenía la mayor presencia de ácido acético.

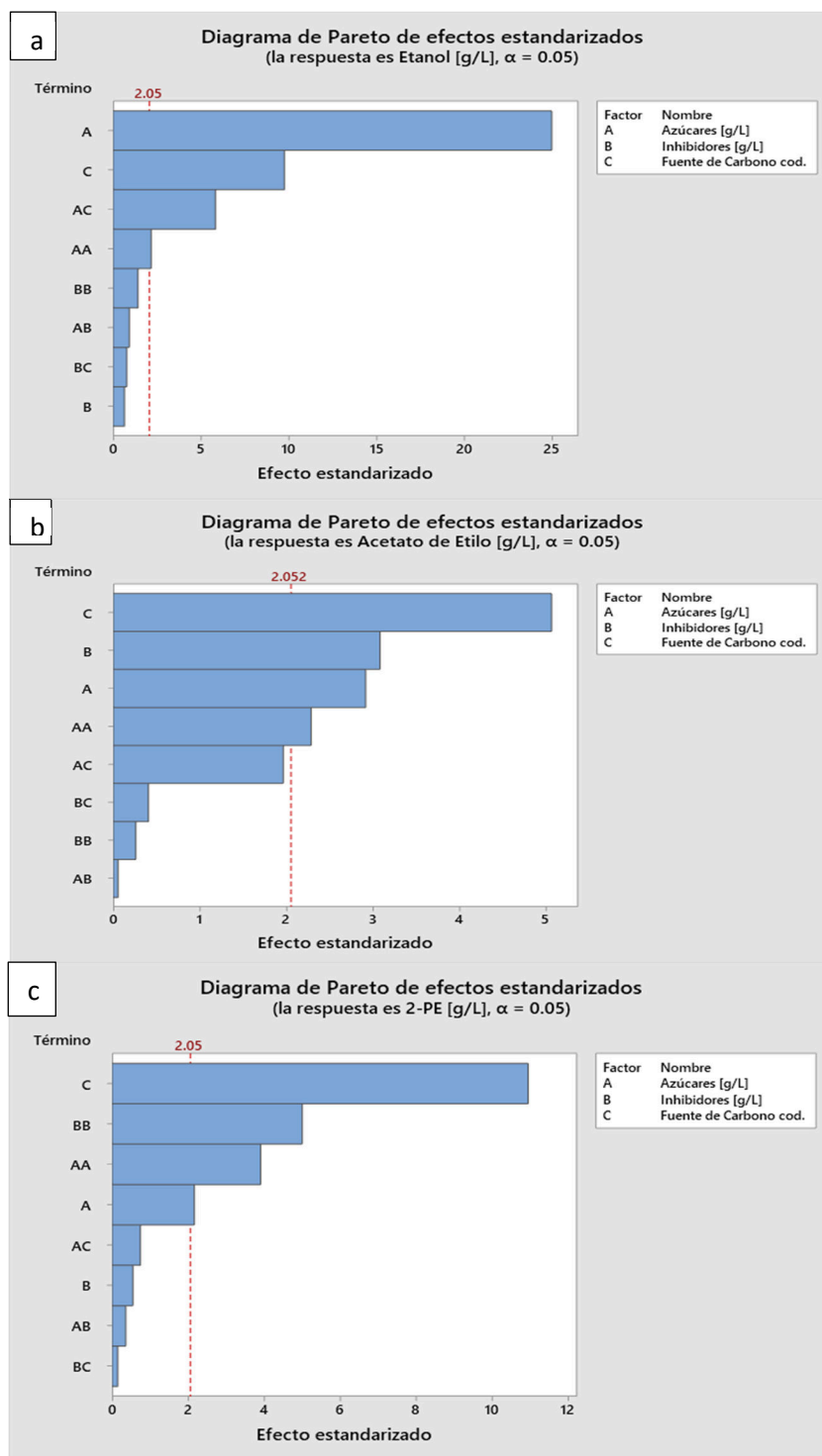


Figura 17

Diagramas de Pareto para el análisis del diseño Box-Benhken; (a) Etanol, (b) Acetato de etilo, (c) 2-PE

Lo anterior también es corroborado por el análisis de la superficie de respuesta del diseño Box-Benhken, y cuyos diagramas de Pareto se muestran en la Figura 17. En el apartado para la respuesta de la producción de acetato de etilo (Figura 17b), cada uno de los factores presenta un efecto estadísticamente significativo sin la presencia de interacciones con significancia. Esto permite el análisis de datos por medio de los gráficos de efectos principales observados en la Figura 18, donde los inhibidores son el factor que más repercute en dicha variable de respuesta.

Para la variable de respuesta del 2-PE el diagrama de Pareto de la Figura 17c muestra un efecto estadísticamente significativo en los factores de la concentración de azúcares y la fuente de carbono.

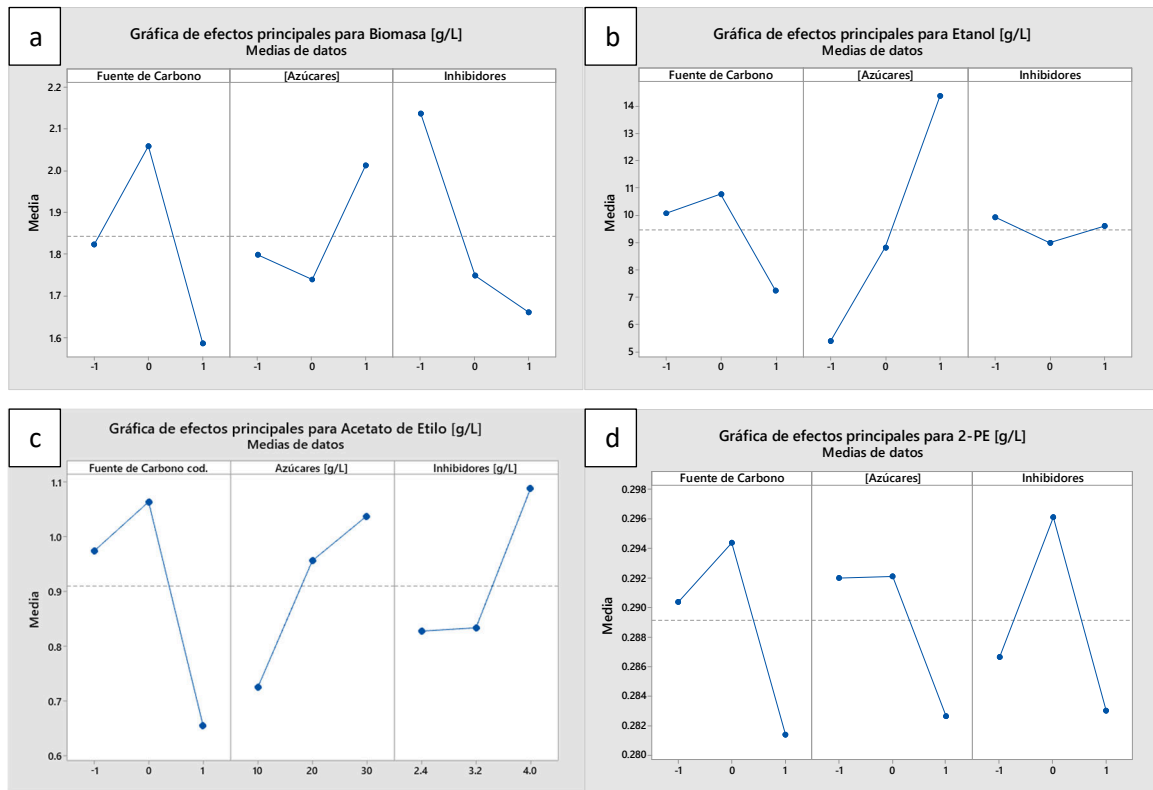


Figura 18

Diagrama de efectos principales para (a) biomasa, (b) etanol, (c) acetato de etilo, (d) 2-PE.

Una forma de identificar la influencia de los factores experimentales es mediante los diagramas de efectos principales obtenidos. En la Figura 18 se muestran los diagramas para las diferentes variables

de respuesta. En ellos se observa que la fuente de carbono afecta significativamente de manera similar en todas las variables de respuesta, obteniendo los valores más bajos cuando se lleva a cabo la adición de melazas de caña de azúcar a las vinazas durante su acondicionamiento. Lo anterior permite descartar esta fuente de carbono para futuros experimentos en el proceso de optimización. En cuanto a la producción de biomasa, en la Figura 18a se observa que el mayor nivel de los compuestos inhibidores presentes en las vinazas, afectó de manera negativa al crecimiento, mientras que, a mayor concentración de azúcares, se presentó un aumento en el crecimiento, tal y como era previsto.

Una de las finalidades de la implementación de este diseño es la de seleccionar las condiciones óptimas de acuerdo a las diversas variables de respuesta, tal y como se observa en la Figura 19. Para la producción de 2-PE, estos diagramas permitieron determinar que las condiciones adecuadas son la de utilizar jarabe de maíz como fuente de carbono, a una concentración de 10 g/L, mientras que se desestima el efecto estadístico de los compuestos inhibidores en la producción de este metabolito.

La producción de acetato de etilo a lo largo de la fermentación se considera un resultado interesante ya que la totalidad de los metabolitos de interés cuantificados son relevantes en el modelo de biorrefinería; el éster acetato de etilo es utilizado del misma manera que el 2-PE en la industria alimenticia debido a su olor afrutado, el bioetanol es uno de los alcoholes más importantes en este modelo y el 2-PE es un producto de alto valor agregado; dándole una gran robustez al proceso con la generación de más de un metabolito de interés, siendo todos estos compuestos producidos a partir de un residuo industrial de la cadena productiva del agave como son las vinazas. Lo anterior se señala también en el trabajo de Yamakawa et al. (2020), donde se menciona que la producción de glicoles, en conjunto con biocombustibles, puede incrementar potencialmente el desempeño y el valor económico de una biorrefinería.

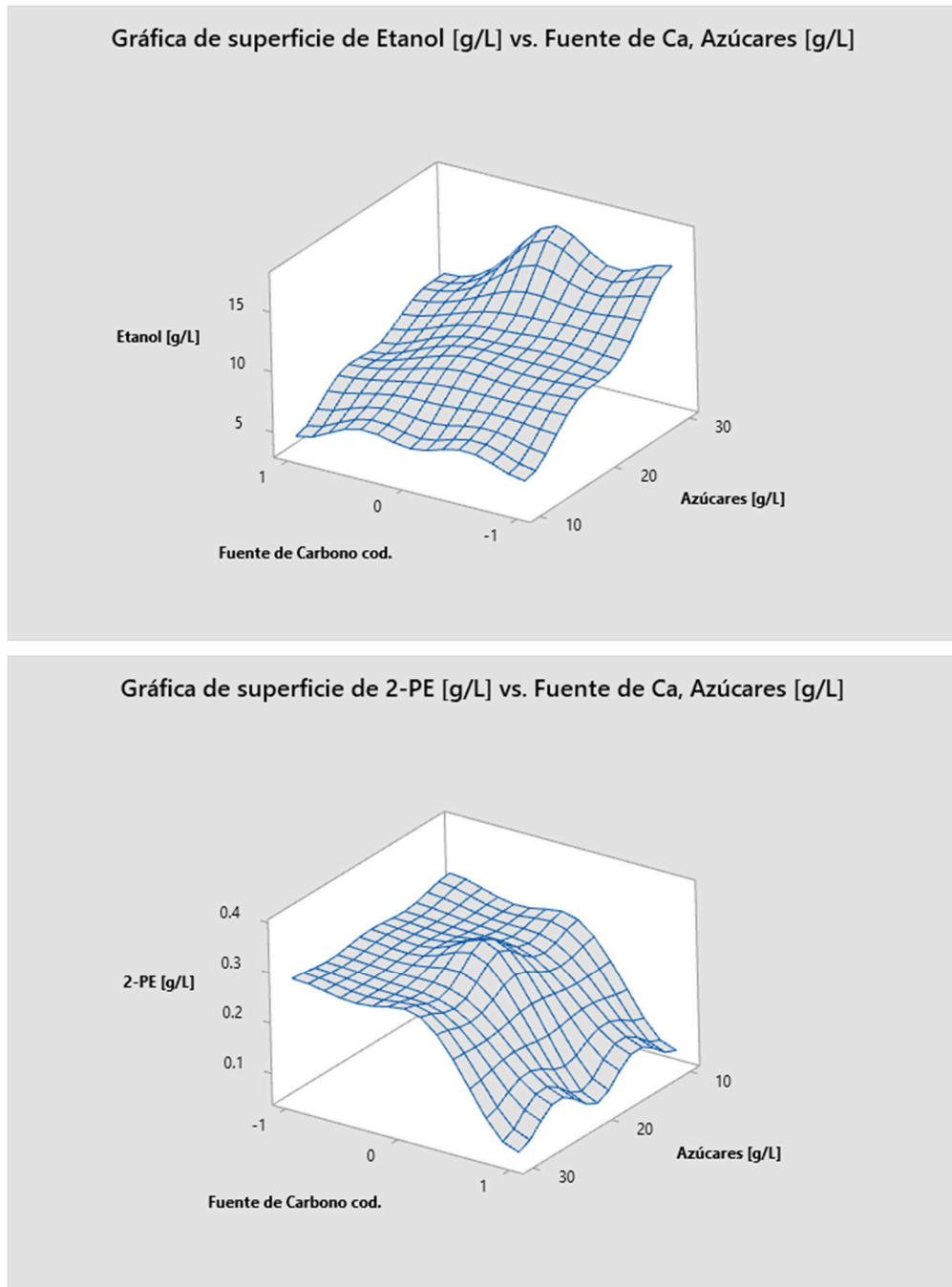


Figura 19

Gráficos de superficie de respuesta para las variables de (a) Producción de etanol, (b) producción de 2-PE.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

La caracterización realizada en las distintas vinazas tequileras permitió establecer que existe una heterogeneidad de gran importancia que depende del origen de estos efluentes. Se encontró que dentro de su composición no contiene los aminoácidos necesarios para obtener una cantidad significativa de aromas a partir de la ruta de Erhlich. Además, la presencia de distintos compuestos considerados como inhibidores del crecimiento es un factor de gran relevancia para la toma de decisiones en el desarrollo del bioproceso que se pretende implementar, ya que estos impactan de manera negativa en el crecimiento y la producción de 2-PE, por lo que estos compuestos deben ser monitoreados previo a la utilización de la vinaza como medio de cultivo, en conjunto con utilizar cepas de levaduras que sean resistentes a ellos.

Concerniente a la selección de la levadura más apropiada para este bioproceso, la evaluación con los medios químicamente definidos y los estudios de las cinéticas de inhibición demostraron que *W. anomalus* es el microorganismo con la mayor capacidad de síntesis y de tolerancia al 2-PE, respectivamente. La particularidad que tiene esta levadura a resistir altas concentraciones de este alcohol superior, es debido a que en comparación con el resto de microorganismos evaluados, tiene una menor capacidad de producción de etanol, evitando el efecto sinérgico que ocurre por la presencia de ambos compuestos, lo cual permite una mayor tolerancia al 2-PE.

Las herramientas del modelado metabólico, como el análisis de modos elementales y de rendimientos ofrecieron un punto de partida válido para el mejoramiento en la producción de estos compuestos aromáticos, ya que derivado de los resultados de estos análisis se establecieron las condiciones para incrementar arriba del 400% la síntesis del 2-PE.

Los resultados obtenidos demuestran que las vinazas tequileras podrían ser un medio de cultivo utilizado en la obtención de metabolitos de interés industrial, tales como el 2-feniletanol y el 2-feniletacetato, a través de la vía metabólica del Shikimato; así como etanol y acetato de etilo, lo cual

concuerta con el concepto de biorrefinería. En conjunto con lo anterior, utilizar vinazas tequileras como medio de cultivo en un proceso de fermentación permitió una reducción de alrededor de más del 50% de la Demanda Química y Bioquímica de Oxígeno, dando como resultado un efluente con una menor carga ambiental.

CAPÍTULO 8. Perspectivas futuras

A partir de los resultados obtenidos a lo largo del trabajo, existen diversos enfoques o perspectivas bajo los cuales se puede profundizar en esta línea de investigación, y de los que se hace mención a continuación.

8.1 Enfoque del análisis de transcriptoma de *W. anomalus*

Debido a las limitaciones presentes a inicios de la década, la secuenciación extensa de genomas de microorganismos estaba destinada principalmente a aplicaciones médicas y organismos modelo, sin embargo, el gran avance tecnológico de los últimos 10 años ha permitido que la secuenciación genética y la bioinformática se posicionen como herramientas esenciales en el estudio y comprensión de la adaptación a nivel de expresión genética y cómo esta afecta a la fisiología y el comportamiento de los microorganismos (Wolf, 2013).

Aun cuando la cantidad de información ha incrementado rápidamente y las principales bases de datos contienen una extensa variedad de genomas de levaduras (Zeng et al., 2016), los análisis transcriptómicos de estas, y los detalles que involucran los procesos de expresión y regulación en levaduras no-*Saccharomyces* siguen siendo escasos, enfocándose principalmente en la levadura *Kluyveromyces marxianus* (Gao et al., 2015). Dado lo anterior, queda de manifiesto la importancia del estudio con este tipo de herramientas en microorganismos no modelo, tales como *W. anomalus*.

Debido a esto, y con la perspectiva de profundizar en la comprensión de los procesos biológicos que se llevan a cabo en la fermentación de levaduras no-*Saccharomyces*, se propone el estudio de la expresión genética en condiciones de crecimiento vinculadas a la producción del metabolito 2-feniletanol (2-PE) a partir de vinazas tequileras como medio de cultivo.

8.1.1 Diseño experimental del análisis de transcriptoma de *W. anomalus*

Tal como se mencionó anteriormente, el objetivo general del estudio es producir 2-feniletanol a partir de vinaza tequilera como medio de cultivo. Experimentación previa a esta etapa del trabajo permitió encontrar las condiciones de incremento en la producción de 2-PE, así como el microorganismo más tolerante a este alcohol superior (Rodríguez-Romero et al., 2020).

La finalidad del análisis de transcriptoma en este bioproceso radicará en la búsqueda de diferencias en los transcritos de RNA a diferentes condiciones de crecimiento de la levadura *W. anomalus*, para tener una mejor comprensión del proceso de la producción del 2-PE a nivel de la expresión genética en este microorganismo, ya que esta levadura es capaz de una mayor tolerancia a este compuesto que otras no-*Saccharomyces*.

El diagrama general del proceso propuesto se presenta en la Figura 20, que se muestra a continuación.

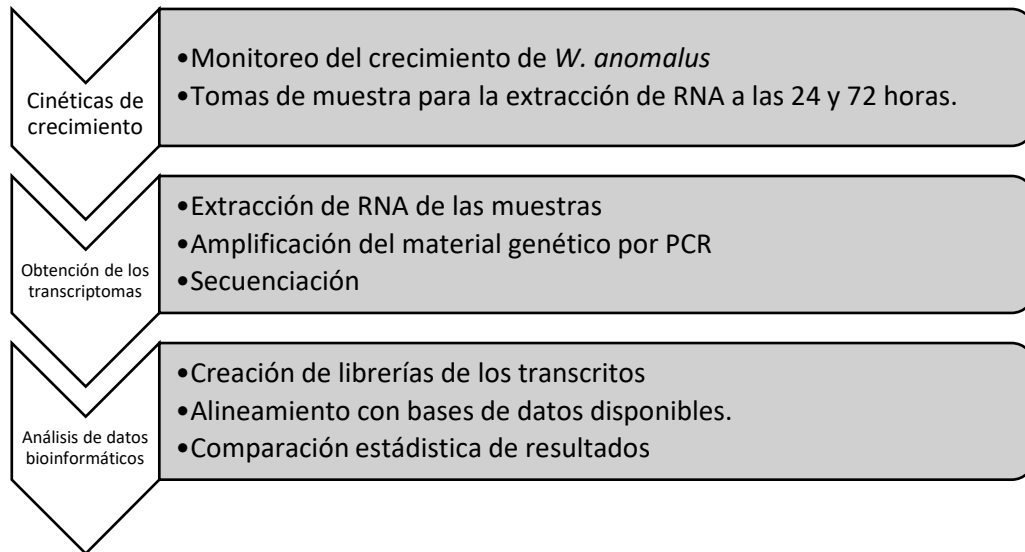


Figura 20

Diagrama general para la obtención de los transcriptomas de *W. anomalus*

Tal como se mencionó en el párrafo anterior, dichas condiciones provienen de los resultados obtenidos previamente, los cuales se muestran en la Tabla 13

Tabla 13 Condiciones de los estados a evaluar para el análisis de transcriptoma

<i>W. anomalus</i>			
Condición			
Parámetro	Basal	Vinaza acondicionada	Vinaza sin acondicionar
• Fuente de carbono	Glucosa	Jarabe de maíz	Glucosa
• Concentración de sustrato	20 g/L	10 g/L	0.2% p/v
• Compuestos inhibidores	NA	Presentes	Presentes
• 2-PE	NA	300 mg/L	50 mg/L

*Los compuestos inhibidores y sus concentraciones son los siguientes: Ac. Acético (2400 mg/L) e Hidroximetilfurfural (72 mg/L)

Las levaduras se activarían en medio YPD a 30°C con una agitación de 250 rpm y una inoculación en una concentración de 1×10^6 células/mL de medio de cultivo. El crecimiento en los distintos medios se realizará en matraces Erlenmeyer de 250 mL a 30°C y 150 rpm de agitación durante 72 horas tomando muestra a las 3, 6, 9, 12, 24, 48, y 72 horas, para monitorear la velocidad de crecimiento por medio de la densidad óptica (DO) a 600 nm, consumo de azúcares por HPLC, volátiles por cromatografía de gases y la producción de biomasa por medio de peso seco constante a 60°C. Cada una de las corridas se realizará por triplicado.

La condición basal que se pudiera tomar como control es el crecimiento de los microorganismos en un medio YPD estándar, cuya composición es la siguiente: 20 g/L peptona, 10 g/L de extracto de levadura y 20 g/L de glucosa como fuente de carbono. En cuanto a la producción de 2-PE, el control negativo será el de una vinaza sin acondicionar con enriquecimiento mínimo (0.1% extracto de levadura p/v, 0.05% K₂HPO₄ p/v, 0.2% glucosa p/v, 0.5% peptona p/v), ya que se ha observado que bajo estos parámetros la producción de 2-PE oscila en un rango menor a los 50 mg/L, mientras que

en la vinaza acondicionada (0.1% extracto de levadura p/v, 0.1% K₂HPO₄ p/v, 10 g/L glucosa, 0.5% peptona p/v), se logró incrementar la producción del metabolito de interés alrededor de 4.5 veces más, siendo esta condición la que determinaría las diferencias en la expresión genética que se esperan observar.

Respecto al análisis de datos bioinformáticos una vez realizada la secuenciación, se puede optar por no realizar un ensamble *de novo* ya que actualmente se encuentra disponible en la base de datos del NCBI el genoma completo de *W. anomalus*, con lo cual se plantea realizar los alineamientos a partir de dicha información tomando dicha referencia como base de inicio. Se espera que el análisis bioinformático de los datos obtenidos permita hacer inferencias en el comportamiento de la levadura *W. anomalus* dadas las condiciones de crecimiento para la producción de 2-PE, dando lugar a comprender a nivel de expresión genética la influencia que tiene la presencia de este metabolito en el microorganismo.

8.2 Enfoque de la recuperación del producto 2-Feniletanol

Por último, es necesario evaluar la recuperación de los metabolitos de interés. Se contemplan las condiciones de operación junto con los diferentes enfoques para la recuperación de producto.

La primera es la recuperación después del proceso de fermentación por lote propuesto por Chreptowicz et al. (2016) donde se utiliza acetato de etilo (el cual tiene un status de Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS por sus siglas en inglés) (500 mL de acetato de etilo por cada 900 mL de medio de cultivo) junto con K₂CO₃ como agente desecador (25 g/L), obteniendo una cantidad de 2.34 g/L de 2-PE y más del 98% de pureza.

Otro enfoque es la recuperación del producto *In Situ* (ISPR), el cual está reportado como una de las mejores estrategias que puede ser aplicada en los procesos de síntesis y para la recuperación de estos compuestos. Etschmann et al. (2005), obtuvo concentraciones de 0.97 g/L para 2-PE y 0.31 g/L para 2-PEA a partir de un medio optimizado de melazas suplementado con fenilalanina, con una levadura

K. marxianus previo a utilizar una técnica de ISPR con alcohol oleílico, que le permitió obtener concentraciones de 2.2 y 1.27 g /L de 2-PE y 2-PEA respectivamente. Un estudio más reciente de Chreptowicz and Mierzejewska (2018) donde se evaluó el uso de aceite de colza (el cual contiene cantidades considerable de ácido oleico) obteniendo resultados positivos en la separación de 2-PE del medio de cultivo; sin embargo, el uso particular de este extractante no permite una simple separación de los compuestos. En ambos casos se utilizó una relación 1:1 por la técnica de ISPR, lo cual permitió obtener mejoras significativas en la producción de estos compuestos aromáticos.

CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA

- Adler, P., Hugen, T., Wiewiora, M., Kunz, B. 2011. Modeling of an integrated fermentation/membrane extraction process for the production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate. *Enzyme and Microbial Technology*, **48**(3), 285-292.
- Ahmed, O., Sulieman, A.M.E., Elhardallou, S.B. 2013. Physicochemical, chemical and microbiological characteristics of vinasse, A by-product from ethanol industry. *American Journal of Biochemistry*, **3**(3), 80-83.
- Akita, O., Ida, T., Obata, T., Hara, S. 1990. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Producing a Large Quantity of β -Phenethyl Alcohol and β -Phenethyl Acetate. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **69**(2), 125-128.
- Álvarez-Ainza, M., Zamora-Quiñonez, A., Acedo-Félix, E. 2009. Perspectivas para el uso de levaduras nativas durante la elaboración de bacanora. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, **51**(1-2), 58-63.
- Alvarez, X. 2005. *Reducción de alcoholes superiores mediante fermentación con mutantes de Saccharomyces cerevisiae auxotrofo para aminoácidos*. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar.
- Alves, P.R.L., Natal-da-Luz, T., Sousa, J., Cardoso, E. 2015. Ecotoxicological characterization of sugarcane vinasses when applied to tropical soils. *Science of The Total Environment*, **526**, 222-232.
- APHA, A.P.H.A. 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22th Edition ed, pp. 1.134 pp.
- Arellano, M., Gschaedler, A., Alcazar, M. 2012. Major Volatile Compounds Analysis Produced from Mezcal Fermentation Using Gas Chromatography Equipped Headspace (GC-HS). in: *Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications*, (Ed.) D.B. Salih, InTech.
- Asghar, M.N., Khan, S., Mushtaq, S. 2008. Management of treated pulp and paper mill effluent to achieve zero discharge. *Journal of environmental management*, **88**(4), 1285-1299.
- Badsha, M.B., Tsuboi, R., Kurata, H. 2014. Complementary elementary modes for fast and efficient analysis of metabolic networks. *Biochemical Engineering Journal*, **90**, 121-130.
- Box, G.E.P., Behnken, D.W. 1960. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. *Technometrics*, **2**(4), 455-475.
- Cao, W., Ma, Z., Chen, Y.H., Yu, X. 2015. *Pichia anomala*, a new species of yeast-like endosymbionts and its variation in small brown planthopper (*Laodelphax striatellus*). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **119**(6), 669-673.
- Carvajal-Zarrabal, O., Nolasco-Hipólito, C., Barradas-Dermitz, D.M., Hayward-Jones, P.M., Aguilar-Uscanga, M.G., Bujang, K. 2012. Treatment of vinasse from tequila production using polyglutamic acid. *Journal of Environmental Management*, **95**, **Supplement**, S66-S70.
- Cavallieri, A.P., Baptista, A.S., Leite, C.A., Araujo, M.L.G.d.C. 2016. A case study in flux balance analysis: Lysine, a cephamycin C precursor, can also increase clavulanic acid production. *Biochemical Engineering Journal*, **112**, 42-53.
- CIATEJ. 2015. *Ciencia y tecnología del tequila: avances y perspectivas*. 2nd ed. CIATEJ.
- Crispín-Isidro, G., Lobato-Calleros, C., Espinosa-Andrews, H., Alvarez-Ramirez, J., Vernon-Carter, E.J. 2014. Effect of inulin and agave fructans addition on the rheological, microstructural and sensory properties of reduced-fat stirred yogurt. *LWT - Food Science and Technology*(0).

- Chen, P.-W., Theisen, M.K., Liao, J.C. 2017. Metabolic systems modeling for cell factories improvement. *Current Opinion in Biotechnology*, **46**, 114-119.
- Chreptowicz, K., Mierzejewska, J. 2018. Enhanced bioproduction of 2-phenylethanol in a biphasic system with rapeseed oil. *New Biotechnology*, **42**, 56-61.
- Chreptowicz, K., Wielechowska, M., Głowczyk-Zubek, J., Rybak, E., Mierzejewska, J. 2016. Production of natural 2-phenylethanol: From biotransformation to purified product. *Food and Bioproducts Processing*, **100**, 275-281.
- Christofoletti, C.A., Escher, J.P., Correia, J.E., Marinho, J.F.U., Fontanetti, C.S. 2013. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Management*, **33**(12), 2752-2761.
- del Ángel Sánchez, M.T., García-Alamilla, P., Lagunes-Gálvez, L.M., García-Alamilla, R., Cabrera Culebro, E.G. 2015. Aplicación de metodología de superficie de respuesta para la degradación de naranja de metilo con TiO₂ sol-gel sulfatado. *Revista internacional de contaminación ambiental*, **31**, 99-106.
- del Pozo Bayón, M. 2011. Descifrando las claves químicas que explican el aroma del vino. *ACE: Revista de Enología*, **127**.
- Díaz-Montaño, D.M., Délia, M.-L., Estarrón-Espinosa, M., Strehaiano, P. 2008. Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from Agave tequilana Weber juice. *Enzyme and Microbial Technology*, **42**(7), 608-616.
- Djelal, H., Larher, F., Martin, G., Amrane, A. 2006. Effect of the dissolved oxygen on the bioproduction of glycerol and ethanol by *Hansenula anomala* growing under salt stress conditions. *Journal of biotechnology*, **125**(1), 95-103.
- Dos Reis, K.C., Arrizon, J., Amaya-Delgado, L., Gschaedler, A., Schwan, R.F., Silva, C.F. 2018. Volatile compounds flavoring obtained from Brazilian and Mexican spirit wastes by yeasts. *World J Microbiol Biotechnol*, **34**(10), 152.
- España-Gamboa, E., Mijangos-Cortes, J., Barahona-Perez, L., Dominguez-Maldonado, J., Hernández-Zarate, G., Alzate-Gaviria, L. 2011. Vinasses: Characterization and treatments. *Waste Management and Research*, **29**(12), 1235-1250.
- Etschmann, M., Kötter, P., Hauf, J., Bluemke, W., Entian, K.-D., Schrader, J. 2008. Production of the aroma chemicals 3-(methylthio)-1-propanol and 3-(methylthio)-propylacetate with yeasts. *Applied microbiology and biotechnology*, **80**(4), 579-587.
- Etschmann, M.M.W., Sell, D., Schrader, J. 2005. Production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate from L-phenylalanine by coupling whole-cell biocatalysis with organophilic pervaporation. *Biotechnology and Bioengineering*, **92**(5), 624-634.
- Etschmann, M.M.W., Sell, D., Schrader, J. 2003. Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium. *Biotechnology Letters*, **25**(7), 531-536.
- Förster, J., Famili, I., Fu, P., Palsson, B.Ø., Nielsen, J. 2003. Genome-Scale Reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* Metabolic Network. *Genome Research*, **13**(2), 244-253.
- Fredlund, E. 2004. *Central carbon metabolism of the biocontrol yeast Pichia anomala*.
- French, A.D. 1989. Chemical and Physical Properties of Fructans. *Journal of Plant Physiology*, **134**(2), 125-136.
- Gao, J., Yuan, W., Li, Y., Xiang, R., Hou, S., Zhong, S., Bai, F. 2015. Transcriptional analysis of *Kluyveromyces marxianus* for ethanol production from inulin using consolidated bioprocessing technology. *Biotechnol Biofuels*, **8**, 115.
- García, I.G., Venceslada, J.L.B., Peña, P.R.J., Gómez, E.R. 1997. Biodegradation of phenol compounds in vinasse using *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Water Research*, **31**(8), 2005-2011.

- Garrido, F.V. 2011. Levaduras *no-Saccharomyces* para modular el aroma secundario de los vinos: Incremento del acetato de 2-feniletilo mediante cultivos iniciadores mixtos. in: *Departamento de Tecnología de Alimentos*, Vol. PhD, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- Greer, R. 1984. Chapter 2: A Tutorial On Polyhedral Convex Cones. in: *North-Holland Mathematics Studies*, (Ed.) R. Greer, Vol. 96, North-Holland, pp. 15-81.
- Gschaedler, A., Rodríguez-Garay, B., Prado-Ramírez, R., Flores Montaña, J.L. 2015. *Ciencia y tecnología del tequila: avances y perspectivas. 2nd ed.* CIATEJ.
- Guzmán-Trampe, S., Ceapa, C.D., Manzo-Ruiz, M., Sánchez, S. 2017. Synthetic biology era: Improving antibiotic's world. *Biochemical Pharmacology*, **134**, 99-113.
- Haibo, Z., Mingle, C., Xinglin, J., Huibin, Z., Cong, W., Xin, X., Mo, X. 2014. De-novo synthesis of 2-phenylethanol by *Enterobacter* sp. CGMCC 5087. *BMC Biotechnology*, **14**(1), 1-17.
- Hardinger, S.A. 2017. Illustrated Glossary of Organic Chemistry: ethyl acetate (EtOAc), Vol. 2020.
- Hazelwood, L.A., Daran, J.-M., van Maris, A.J., Pronk, J.T., Dickinson, J.R. 2008. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and environmental microbiology*, **74**(8), 2259-2266.
- Hua, D., Xu, P. 2011. Recent advances in biotechnological production of 2-phenylethanol. *Biotechnology Advances*, **29**(6), 654-660.
- Huertas-García, R., Gázquez-Abad, J.C., Martínez-López, F.J., Esteban-Millat, I. 2014. Propuesta metodológica mediante diseños Box-Behnken para mejorar el rendimiento del análisis conjunto en estudios experimentales de mercado. *Revista Española de Investigación de Marketing ESIC*, **18**(1), 57-66.
- Hundová, Z., Fencel, Z. 1977. Toxic effects of fatty acids on yeast cells: dependence of inhibitory effects on fatty acid concentration. *Biotechnology and bioengineering*, **19**(11), 1623-1641.
- Hye Ryun, K., Jae-Ho, K., Dong-Hoon, B., Byung Hak, A. 2013. Microbiological Characteristics of Wild Yeast Strain *Pichia anomala* Y197-13 for Brewing Makgeolli. *Mycobiology*, **41**(3), 139-144.
- Jimenez-Marti, E., del Olmo, M.L. 2008. Addition of ammonia or amino acids to a nitrogen-depleted medium affects gene expression patterns in yeast cells during alcoholic fermentation. *FEMS Yeast Res*, **8**(2), 245-56.
- Kauffman, K.J., Prakash, P., Edwards, J.S. 2003. Advances in flux balance analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, **14**(5), 491-496.
- Kim, T.-Y., Lee, S.-W., Oh, M.-K. 2014. Biosynthesis of 2-phenylethanol from glucose with genetically engineered *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme and Microbial Technology*, **61-62**, 44-47.
- Klamt, S., Hädicke, O., von Kamp, A. 2014. Stoichiometric and Constraint-Based Analysis of Biochemical Reaction Networks. in: *Large-Scale Networks in Engineering and Life Sciences*, (Eds.) P. Benner, R. Findeisen, D. Flockerzi, U. Reichl, K. Sundmacher, Springer International Publishing. Cham, pp. 263-316.
- Kurtzman, C.P. 2011. Phylogeny of the ascomycetous yeasts and the renaming of *Pichia anomala* to *Wickerhamomyces anomalus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **99**(1), 13-23.
- Lee, b.-k., Kyun Kim, J. 2001. *Production of Candida utilis on molasses in different culture types*.
- López-López, A.D.-V., Gustavo León-Becerril, Elizabeth Villegas-García, Edgardo Gallardo-Valdez, Juan. 2010. Tequila vinasses: generation and full scale treatment processes. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, **9**(2), 109-116.
- López, A., Davila, G., León, E., Villegas, E., Gallardo, J. 2010. Tequila vinasses: generation and full scale treatment processes. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, **9**(2), 109-116.

- Lyness, C.A., Steele, G., Stewart, G. 1997. Investigating ester metabolism: characterization of the ATF1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **55**(4), 141-146.
- Ma, S., Yang, X., Wang, C., Guo, M. 2018. Effect of ultrasound treatment on antioxidant activity and structure of β -Lactoglobulin using the Box–Behnken design. *CyTA - Journal of Food*, **16**(1), 596-606.
- Maarleveld, T.R., Khandelwal, R.A., Olivier, B.G., Teusink, B., Bruggeman, F.J. 2013. Basic concepts and principles of stoichiometric modeling of metabolic networks. *Biotechnology Journal*, **8**(9), 997-1008.
- Martin, V., Boido, E., Giorello, F., Mas, A., Dellacassa, E., Carrau, F. 2016. Effect of yeast assimilable nitrogen on the synthesis of phenolic aroma compounds by *Hanseniaspora vineae* strains. *Yeast*, **33**(7), 323-328.
- McKenna, R., Thompson, B., Pugh, S., Nielsen, D.R. 2014. Rational and combinatorial approaches to engineering styrene production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial cell factories*, **13**(1), 1.
- Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, **31**(3), 426-428.
- Minitab. 2019. Soporte de Minitab 18, Minitab.
- Montoya-Marquez, J., Sánchez-Estudillo, L., Torres-Hernández, P. 2011. Diseños experimentales ¿qué son y cómo se utilizan en las ciencias acuáticas? *Ciencia y Mar*, **XV**, 61-70.
- Passoth, V., Fredlund, E., Druvefors, U.Å., Schnürer, J. 2006. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS Yeast Research*, **6**(1), 3-13.
- Pérez, E., González-Hernández, J.C., Chávez-Parga, M.C., Cortés-Penagos, C. 2013. Caracterización fermentativa de levaduras productoras de etanol a partir de jugo de *Agave cupreata* en la elaboración de mezcal. *Revista mexicana de ingeniería química*, **12**, 451-461.
- Pinal, L., Cornejo, E., Arellano, M., Herrera, E., Nuñez, L., Arrizon, J., Gschaedler, A. 2009. Effect of *Agave tequilana* age, cultivation field location and yeast strain on tequila fermentation process. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **36**(5), 655-661.
- Pires, E., Teixeira, J., Brányik, T., Vicente, A. 2014. Yeast: the soul of beer's aroma-a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied Microbiology & Biotechnology*, **98**(5), 1937-1949.
- Pires, J.F., Ferreira, G.M.R., Reis, K.C., Schwan, R.F., Silva, C.F. 2016. Mixed yeasts inocula for simultaneous production of SCP and treatment of vinasse to reduce soil and fresh water pollution. *Journal of Environmental Management*, **182**, 455-463.
- Pollock, C.J., Chatterton, N.J. 1988. 4 - Fructans. in: *The Biochemistry of Plants*, (Ed.) J. Preiss, Academic Press. San Diego, pp. 109-140.
- Prado-Ramírez, R., Gonzáles-Alvarez, V., Pelayo-Ortiz, C., Casillas, N., Estarrón, M., Gómez-Hernández, H. 2005. The role of distillation on the quality of tequila. *International Journal of Food Science & Technology*, **40**(7), 701-708.
- Praznik, W., Löppert, R., Cruz Rubio, J.M., Zangger, K., Huber, A. 2013. Structure of fructo-oligosaccharides from leaves and stem of *Agave tequilana* Weber, var. azul. *Carbohydrate Research*, **381**(0), 64-73.
- Robles-González, V., Galíndez-Mayer, J., Rinderknecht-Seijas, N., Poggi-Varaldo, H. 2012. Treatment of mezcal vinasses: A review. *Journal of Biotechnology*, **157**(4), 524-546.
- Robles-Rodríguez, C.E., Bideaux, C., Guillouet, S.E., Gorret, N., Cescut, J., Uribe-larrea, J.-L., Molina-Jouve, C., Roux, G., Aceves-Lara, C.A. 2017. Dynamic metabolic modeling of lipid accumulation and citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Computers & Chemical Engineering*, **100**, 139-152.

- Rodríguez-Romero, J.d.J., Aceves-Lara, C.A., Silva, C.F., Gschaedler, A., Amaya-Delgado, L., Arrizon, J. 2020. 2-Phenylethanol and 2-phenylethylacetate production by nonconventional yeasts using tequila vinasses as a substrate. *Biotechnology Reports*, **25**, e00420.
- Rollero, S., Bloem, A., Camarasa, C., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Sablayrolles, J.-M., Dequin, S., Mouret, J.-R. 2015. Combined effects of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, **99**(5), 2291-2304.
- Rong, S., Ding, B., Zhang, X., Zheng, X., Wang, Y. 2011. Enhanced Biotransformation of 2-Phenylethanol with Ethanol Oxidation in a Solid-Liquid Two-Phase System by Active Dry Yeast. *Current Microbiology*, **63**(5), 503-509.
- Sabel, A., Martens, S., Petri, A., König, H., Claus, H. 2014. *Wickerhamomyces anomalus* AS1: a new strain with potential to improve wine aroma. *Annals of Microbiology*, **64**(2), 483-491.
- Saerens, S.M.G., Delvaux, F.R., Verstrepen, K.J., Thevelein, J.M. 2010. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotechnology*, **3**(2), 165-177.
- Salgado José, M., Carballo Martínez, E., Max, B., Domínguez José, M. 2010. Characterization of vinasses from five certified brands of origin (CBO) and use as economic nutrient for the xylitol production by *Debaryomyces hansenii*. *Bioresource Technology*, **101**(7), 2379-2388.
- Sancllemente Reyes, Ó.E.G.A., M., Valencia Trujillo, F.L. 2011. *Efecto del uso de melaza y microorganismos eficientes sobre la tasa de descomposición de la hoja de caña (Saccharum officinarum)*.
- Sandoval-Nuñez, D., Arellano-Plaza, M., Gschaedler, A., Arrizon, J., Amaya-Delgado, L. 2018. A comparative study of lignocellulosic ethanol productivities by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Clean Technologies and Environmental Policy*, **20**(7), 1491-1499.
- Seluy, L.G., Isla, M.A. 2014. A Process To Treat High-Strength Brewery Wastewater via Ethanol Recovery and Vinasse Fermentation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **53**(44), 17043-17050.
- Shen, L., Nishimura, Y., Matsuda, F., Ishii, J., Kondo, A. 2016. Overexpressing enzymes of the Ehrlich pathway and deleting genes of the competing pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing 2-phenylethanol production from glucose. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, **122**(1), 34-39.
- Silva, C.F., Arcuri, S.L., Campos, C.R., Vilela, D.M., Alves, J.G.L.F., Schwan, R.F. 2011. Using the residue of spirit production and bio-ethanol for protein production by yeasts. *Waste Management*, **31**(1), 108-114.
- Song, H.-S., Ramkrishna, D. 2009. Reduction of a set of elementary modes using yield analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, **102**(2), 554-568.
- Stark, D., Zala, D., Münch, T., Sonnleitner, B., Marison, I.W., von Stockar, U. 2003. Inhibition aspects of the bioconversion of l-phenylalanine to 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, **32**(2), 212-223.
- Tibayrenc, P., Preziosi-Belloy, L., Roger, J.-M., Ghommidh, C. 2010. Assessing yeast viability from cell size measurements? *Journal of Biotechnology*, **149**(1), 74-80.
- Tsubakiyama, R., Mizunuma, M., Gengyo, A., Yamamoto, J., Kume, K., Miyakawa, T., Hirata, D. 2011. Implication of Ca²⁺ in the Regulation of Replicative Life Span of Budding Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, **286**(33), 28681-28687.
- Uber, G. 2006. Modificación genética de levaduras vínicas industriales para mejorar la producción de un aroma secundario. in: *Departamento de bioquímica y biología molecular*, Vol. PhD, Universidad de Valencia. Valencia, España.

- Vázquez, J., Grillitsch, K., Daum, G., Mas, A., Beltran, G., Torija, M.J. 2019. The role of the membrane lipid composition in the oxidative stress tolerance of different wine yeasts. *Food Microbiology*, **78**, 143-154.
- Verstrepen, K.J., Van Laere, S.D.M., Vanderhaegen, B.M.P., Derdelinckx, G., Dufour, J.-P., Pretorius, I.S., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Delvaux, F.R. 2003. Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters. *Applied and environmental microbiology*, **69**(9), 5228-5237.
- Vichitphan, K., Vichitphan, S. 2013. Enzyme and protein engineering beta-glucosidase from *Pichia anomala* MDD24 exhibiting transglycosylation property. *Current Opinion in Biotechnology*, **24**, Supplement 1, S80.
- Villanueva-Rodríguez, S.J., Rodríguez-Garay, B., Prado-Ramírez, R., Gschaedler, A. 2016. Tequila: Raw Material, Classification, Process, and Quality Parameters. in: *Encyclopedia of Food and Health*, Academic Press. Oxford, pp. 283-289.
- Voige, W.H. 2012. Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology (ed. Michal, Gerhard). *Journal of Chemical Education*, **77**(2), 163.
- von Kamp, A., Thiele, S., Hädicke, O., Klamt, S. 2017. Use of CellNetAnalyzer in biotechnology and metabolic engineering. *Journal of Biotechnology*, **261**, 221-228.
- Wang, H., Dong, Q., Guan, A., Meng, C., Shi, X.a., Guo, Y. 2011. Synergistic inhibition effect of 2-phenylethanol and ethanol on bioproduction of natural 2-phenylethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and process enhancement. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **112**(1), 26-31.
- Wittmann, C., Hans, M., Bluemke, W. 2002. Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*, **19**(15), 1351-1363.
- Wolf, J.B. 2013. Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial. *Mol Ecol Resour*, **13**(4), 559-72.
- Yamakawa, C.K., Kastell, L., Mahler, M.R., Martinez, J.L., Mussatto, S.I. 2020. Exploiting new biorefinery models using non-conventional yeasts and their implications for sustainability. *Bioresource Technology*, **309**, 123374.
- Yavuz, Y. 2007. EC and EF processes for the treatment of alcohol distillery wastewater. *Separation and purification technology*, **53**(1), 135-140.
- Yilmaz, L.S., Walhout, A.J.M. 2017. Metabolic network modeling with model organisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, **36**, 32-39.
- Yin, S., Zhou, H., Xiao, X., Lang, T., Liang, J., Wang, C. 2015. Improving 2-Phenylethanol Production via Ehrlich Pathway Using Genetic Engineered *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Current Microbiology*, **70**(5), 762-767.
- Yu, A.-Q., Pratomo Juwono, N.K., Foo, J.L., Leong, S.S.J., Chang, M.W. 2016. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the overproduction of short branched-chain fatty acids. *Metabolic Engineering*, **34**, 36-43.
- Zeng, W.-Y., Tang, Y.-Q., Gou, M., Xia, Z.-Y., Kida, K. 2016. Transcriptomes of a xylose-utilizing industrial flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain cultured in media containing different sugar sources. *AMB Express*, **6**.
- Zhang, G., Lin, Y., He, P., Li, L., Wang, Q., Ma, Y. 2014. Characterization of the sugar alcohol-producing yeast *Pichia anomala*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, **41**(1), 41-48.

Cronograma de actividades

Actividad	2016	2017						2018						2019					
	Ago-Dic	Ene-Feb	Mar-Abr	May-Jun	Jul-Ago	Sep-Oct	Nov-Dic	Ene-Feb	Mar-Abr	May-Jun	Jul-Ago	Sep-Oct	Nov-Dic	Ene-Feb	Mar-Abr	May-Jun	Jul-Ago	Sep-Oct	Nov-Dic
Revisión Bibliográfica																			
Identificación molecular de cepas brasileñas																			
Evaluación preliminar de producción 2-PE y 2-PEA																			
Muestreo regional de vinazas																			
Caracterización de Vinazas																			
Evaluación de la fisiología de levaduras <i>no-Saccaromyces</i>																			
Fermentaciones para la evaluación de vinazas como medio de cultivo																			
ESTANCIA																			
Propuesta de modelo metabólico simplificado																			
Validación del modelo metabólico simplificado																			
Redacción de publicación																			
Segundo muestreo regional de vinazas																			

Cronograma de actividades

Corroboración de resultados de fermentaciones																			
Cuantificación de compuestos inhibidores																			
Cinéticas de inhibición																			
Gestión y Recolección de vinaza fresca																			
Modelado matemático para cinéticas de inhibición																			
Redacción segunda publicación																			
Fermentaciones de optimización																			

CAPÍTULO 10. APÉNDICES

Apéndice 1 Composición del medio químicamente definido.

Compuesto	Concentración (g/L)
Fuente de carbono	
Glucosa	Variable
Sales	
KH ₂ PO ₄	3.0000
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0000
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	1.4900
Ácido glutámico	1.0000
Oligoelementos	
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.4122
ZnCl ₂	0.0192
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.0006
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.0044
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.0005
CaCl ₂	0.0174
FeCl ₂ · 4H ₂ O	0.0117
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.0004
H ₃ BO ₃	0.0030
Vitaminas	
Ácido aminobenzóico	0.0010
Mio-inositol	0.1250
Ácido nicotínico	0.0050
Ácido pantoténico	0.0050
Piridoxina	0.0050
Tiamina HCl	0.0050
Biotina	0.000024

Apéndice 2 Medición de azúcares reductores con Ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS).

El método DNS determina la presencia de grupos carbónicos libres (C=O) de los azúcares reductores. El procedimiento se basa en una reacción redox, que ocurre en la utilización de ácido 3,5 dinitrosalicílico para provocar la oxidación de los azúcares y al mismo tiempo su propia reducción endotérmica. Un mol de azúcar reacciona con un mol de ácido 3,5 dinitrosalicílico, dando lugar a una reacción estequiométrica que permite conocer la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra.

Después de esto se continua con la determinación, haciendo lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm.

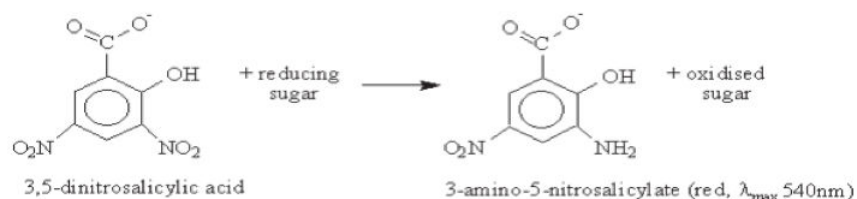


Figura 1 Reacción de oxidación de azúcares reductores, método DNS.

La reacción es colorimétrica, el ácido 3.5 dinitrosalicílico es de color amarillo, mientras que la aparición de ácido 3-amino, 5-nitrosalicílico provoca un viraje a pardo oscuro, cuya intensidad será proporcional a la cantidad de azúcares reductores. Por esta razón, el método no es recomendable para muestras coloreadas, ya que pueden afectar en la lectura que se realice en el espectrofotómetro. La preparación de muestras para la medición de azúcares se realiza de la siguiente manera:

En un microtubo plástico de 1.5 mL, se colocan:

- 100 μL de muestra
- 100 μL de del reactivo DNS

Una vez colocados la muestra y el reactivo, se mezcla vigorosamente.

Se colocan los tubos con la mezcla en un baño maría con agua en ebullición, y se deja reaccionar durante 5-10 minutos.

Una vez transcurrido el tiempo, se procede a enfriar los tubos en hielo para bajar la temperatura y detener la reacción por aproximadamente 5 min, para después aforar el volumen de la mezcla a 1000 μL con agua destilada.

En una micro placa de 96 pocillos, se colocan 200 μL de la mezcla y se lee en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

Apéndice 3 Análisis de muestras por HPLC

Apéndice 3.1 Columna 87H (Carbohidratos y Ácidos Orgánicos)

1. Preparar la fase móvil (ácido sulfúrico 5 mM), filtrar y sonicar por 20 min a temperatura ambiente.
2. Los carbohidratos de interés son: glucosa, xilosa, arabinosa, glicerol y etanol; los cuales se ven en el detector de RID. Para la curva de calibración, preparar una solución madre disuelta en la fase móvil, de la siguiente manera:

Compuesto	Concentración (g/L)	TR (min)
Glucosa	20	10.5
Xilosa	20	11.3
Arabinosa	10	
Glicerol	10	15.7
Etanol	20	25.0

3. En cuanto a los ácidos orgánicos: ácido cítrico, succínico, láctico, fórmico, málico, acético y propiónico; los cuales se ven en el detector de DAD a una longitud de 210 nm. Para la curva de calibración, preparar una solución madre disuelta en la fase móvil, de la siguiente manera:

Compuesto	Concentración (g/L)	TR (min)
Cítrico	10	9.4
Succínico	10	13.4
Láctico	10	14.6
Fórmico	10	15.8
Málico	1	16.7
Acético	10	17.6
Propiónico	10	21.4

4. Las curvas de calibración del paso 3 y 4, pueden ser mezcladas, para ahorrar tiempo de corrida. Una vez preparadas las soluciones, realizar diluciones seriadas del 100% hasta el 20% de la solución madre, de 20 en 20%, o hasta una concentración baja deseada, según sea el caso; filtrar todas las soluciones en microdiscos de 0.45 μ .
5. Preparar por separado cada compuesto disuelto (aproximadamente 1 g/L) en la fase móvil y filtrar. Para cada muestra se requiere 1 mL.
6. Buscar en el programa del equipo de HPLC el método de corrida correspondiente a los análisis deseados, y corroborar las condiciones del método: flujo 0.5 mL/min, temperatura de columna 50°C, temperatura del lector RID 50°C y presión 800 \pm 100 psi. Si no se cumplen las condiciones avisar a la persona responsable.

- Si la columna es nueva, pasar primero los compuestos por separado y verificar y anotar los tiempos de retención (TR) de cada uno, posterior a eso, meter los puntos o diluciones de la curva o mezcla, de menor a mayor concentración. Es importante recordar que cada 10 muestras, se debe introducir un blanco para limpiar la columna, el cual se prepara con 1 mL de la fase móvil.

Apéndice 3.2 Columna 18C (Inhibidores)

- Preparar la fase móvil (ácido fórmico al 2.5% y en otro frasco metanol puro), filtrar y sonicar por 20 min a temperatura ambiente.
- Los inhibidores son: hidroquinona, hidroximetilfurfural, furfural, ácido 2-furoico, pirocatecol, ácido 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxibenzaldehido, fenol, acetovainillina, acetosiringona, coniferilaldehido; los cuales se ven en el detector de DAD a una longitud de 210 nm. Para la curva de calibración, preparar una solución madre disuelta en la fase móvil (ácido fórmico al 2.5%), de la siguiente manera:

Compuesto	Concentración (mg/L)	TR (min)
Hidroquinona	100	7.3
Hidroximetilfurfural	100	11.1
Furfural	100	11.9
Ácido 2-furoico	100	13.2
Pirocatecol	100	17.8
Ácido 4-hidroxibenzoico	100	20.7
4-hidroxibenzaldehido	100	22.9
Fenol	100	25.9

Acetovainillina	100	30.4
Acetosiringona	100	33.0
Coniferilaldehido	100	35.3

3. Realizar diluciones seriadas del 100% hasta el 20% de la solución madre, de 20 en 20%, o hasta una concentración baja deseada, según sea el caso; filtrar todas las soluciones en microdiscos de 0.45 μ .
4. Preparar por separado cada compuesto disuelto (aproximadamente 1 g/L) en la fase móvil y filtrar. Para cada muestra se requiere 1 mL.
5. Buscar en el programa del equipo de HPLC el método de corrida Inhibidores (Agilent). Revisar las condiciones del método: flujo 0.8 mL/min, temperatura de columna 30°C, Longitud de onda 262, 275, 295 y 342, y presión 1200 \pm 100 psi. Si no se cumplen las condiciones avisar a la persona responsable.
6. Seguir los pasos del 7 al 11 del apartado de la columna 87H, cuidando que la señal que da la mayoría de los compuestos de interés sea a 275 nm.

Apéndice 4 Abreviaciones y conjunto de reacciones de la red metabólica construida.

<i>Abreviations</i>		<i>NADP</i>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidized (cytosol)
<i>AcCoA</i>	Acetyl Coenzyme A (cytosol)	<i>NADPH</i>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced (cytosol)
<i>AcCoAm</i>	Acetyl Coenzyme A (mitochondria)		
<i>ACD</i>	Acetaldehyde	<i>NADPHm</i>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced (mitochondria)
<i>ACT</i>	Acetate		
<i>ACTx</i>	Acetate (extracellular)		
<i>ADP</i>	Adenosine Bisphosphate	<i>NADPm</i>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidized (mitochondria)
<i>AKG</i>	α -ketoglutarate	<i>NH3</i>	Ammonia
<i>ATP</i>	Adenosine Triphosphate	<i>NH4</i>	Ammonium
<i>BIOM</i>	Catalytic Biomass		
<i>CHO</i>	Chorismate	<i>OAA</i>	Oxaloacetate
<i>CoA</i>	Coenzyme A	<i>OAAm</i>	Oxaloacetate (mitochondria)
<i>CoAm</i>	Coenzyme A (mitochondria)		
<i>CO2</i>	Carbon dioxide	<i>PEP</i>	Phospho-enol pyruvate
<i>DHAP</i>	Dihydroxyacetone phosphate		
<i>DHA7P</i>	3-Deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate	<i>PG3</i>	Glyceraldehyde 3-phosphate
<i>E4P</i>	Erythrose 4 phosphate		
<i>ETH</i>	Ethanol	<i>PHAC</i>	Phenyl acetaldehyde
<i>F6P</i>	Fructose 6-phosphate	<i>PHE</i>	Phenylalanine
<i>G6P</i>	Glucose 6-phosphate	<i>PHEx</i>	Phenylalanine (extracellular)
<i>GAP</i>	Glucose 3-phosphate		
<i>GLC</i>	Glucose	<i>PHP</i>	Phenyl pyruvate
<i>GLCx</i>	Glucose (extracellular)	<i>PYR</i>	Pyruvate
<i>GLUM</i>	Glutamine	<i>R5P</i>	Ribose 5-phosphate
<i>GLUT</i>	Glutamate	<i>Ru5P</i>	Ribulose 5-phosphate
<i>GOL</i>	Glycerol 3-phosphate	<i>S7P</i>	Sedoheptulose 7-phosphate
<i>GOLx</i>	Glycerol 3-phosphate (extracellular)	<i>SHK</i>	Shikimate
<i>ICT</i>	Isocitrate	<i>SUC</i>	Succinate
<i>MAINT</i>	Maintenance	<i>X5P</i>	Xylose 5-phosphate
<i>MAL</i>	Malate	<i>2PE</i>	2-phenylethanol
<i>NAD</i>	Nicotinamide adenine dinucleotide oxidized (cytosol)	<i>2PEA</i>	2-phenylethylacetate

<i>NADH</i>	Nicotinamide adenine dinucleotide reduced (cytosol)	<i>BOD₅</i>	Biochemical Oxygen Demand
<i>NADH_m</i>	Nicotinamide adenine dinucleotide reduced (mitochondria)	<i>COD</i>	Chemical Oxygen Demand
<i>NAD_m</i>	Nicotinamide adenine dinucleotide oxidized (mitochondria)	<i>EMs</i>	Elementary Modes

Glycolysis	
R1	GLCx => GLC
R2	GLC + ATP => G6P + ADP
R3	G6P = F6P
R4	F6P + ATP = DHAP + GAP + ADP
R5	DHAP = GAP
R6	DHAP + NADH = GOL + NAD
R7	GOL = GOLx
R8	GAP + NAD + ADP = PG3 + NADH + ATP
R9	PG3 = PEP
R10	PEP + ADP = PYR + ATP
Pyruvate metabolism	
R11	PYR => ACD + CO ₂
R12	ACD + NADH => ETH + NAD
R13	ACD + NADH _m => ETH + NAD _m
R14	ACD + NADP => ACT + NADPH
R15	ACT => ACTx
R16	ACT + CoA + 2ATP => AcCoA + 2ADP
R17	PYR + ATP + CO ₂ => OAA + ADP
Pentose phosphate pathway	
R18	G6P + 2NADP => Ru5P + CO ₂ + 2NADPH
R19	Ru5P = X5P
R20	Ru5P = R5P
R21	R5P + X5P = S7P + GAP
R22	S7P + GAP = E4P + F6P
R23	E4P + X5P = F6P + GAP
Krebs cycle	
R24	PYR + NAD _m + CoAm => AcCoAm + CO ₂ + NADH _m

R25	$OAA + NADm + NADH = OAAm + NADHm + NAD$
R26	$OAAm + AcCoAm \Rightarrow ICT + CoAm$
R27	$ICT + NADm \Rightarrow AKG + CO_2 + NADHm$
R28	$ICT + NADPm \Rightarrow AKG + CO_2 + NADPHm$
R29	$AKG + ADP + NADm \Rightarrow SUC + ATP + CO_2 + NADHm$
R30	$SUC + 0.5 NADm = MAL + 0.5 NADHm$
R31	$MAL + NADm = OAAm + NADHm$
Shikimate-Ehrlich pathway	
R32	$E4P + PEP \Rightarrow DHA7P$
R33	$DHA7P + NADH = SHKT + NAD$
R34	$SHKT + PEP + ATP = CHO + ADP$
R35	$CHO \Rightarrow PHP + CO_2$
R36	$PHE + AKG = GLUT + PHP$
R37	$PHP \Rightarrow PHAC + CO_2$
R38	$PHAC + NADH \Rightarrow 2_PE + NAD$
R39	$2_PE + AcCoA \Rightarrow 2_PEA + CoA$
Biomass formation	
R40	$1.04 AKG + 0.57 E4P + 0.11 GOL + 2.39 G6P + 1.07 OAA + 0.99 PEP + 0.57 PG3 + 1.15 PYR + 0.74 R5P + 2.36 + AcCoA + 0.31 AcCoAm + 2.68 NAD + 0.53 NADm + 11.55 NADPH + 1.51 NADPHm + 30.48 ATP \Rightarrow 1g BIOM + 2.36 CoA + 0.31 CoAm + 2.68 NADH + 0.53 NADHm + 11.55 NADP + 1.51 NADPm + 30.48 ADP$
Glutamine, glutamate metabolism	
R46	$NH_4 \Rightarrow NH_3$
R47	$NADPH + AKG + NH_3 \Rightarrow NADP + GLUT$
R48	$ATP + GLUT + NH_3 \Rightarrow ADP + GLUM$
Others	
R41	$ATP \Rightarrow ADP + MAINT$
R42	$NADH \Rightarrow NAD$
R43	$2_PE \Rightarrow 2_PEx$
R44	$2_PEA \Rightarrow 2_PEAx$
R45	$PHEx \Rightarrow PHE$