

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**



**“CARACTERIZACIÓN METABÓLICA DE LA TOLERANCIA DE  
LEVADURAS AL ESTRÉS POR COMPUESTOS FENÓLICOS Y  
AZUFRADOS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**

PRESENTA

**PATRICIA VITAL LÓPEZ**

REYNOSA, TAM.

DICIEMBRE, 2016

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**



**“CARACTERIZACIÓN METABÓLICA DE LA TOLERANCIA DE  
LEVADURAS AL ESTRÉS POR COMPUESTOS FENÓLICOS Y  
AZUFRADOS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA**

PRESENTA

**PATRICIA VITAL LÓPEZ**

REYNOSA, TAM.

DICIEMBRE, 2016



## **INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

### **SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

#### **CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

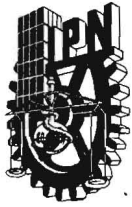
En la Ciudad de Reynosa, Tamaulipas el día 18 del mes de Noviembre del año 2016, la que suscribe **Patricia Vital López** alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica con número de registro B140851, adscrita al Centro de Biotecnología Genómica, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Claudia Patricia Larralde Corona y cede los derechos del trabajo titulado **CARACTERIZACIÓN METABÓLICA DE LA TOLERANCIA DE LEVADURAS AL ESTRÉS POR COMPUESTOS FENÓLICOS Y AZUFRADOS**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de la autora y/o directora del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **plarralde@ipn.mx**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

**Patricia Vital López**

---

Nombre y firma de la alumna



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Reynosa, Tamps. siendo las 12:00 horas del día 5 del mes de Diciembre del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CBG para examinar la tesis titulada:  
Caracterización metabólica de la tolerancia de levaduras al estrés por compuestos fenólicos y azufrados.

Presentada por el alumno:

Vital	López	Patricia							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
		Con registro:	B	1	4	0	8	5	1

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biotecnología Genómica

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

  
Dra. Claudia Patricia Larralde Corona

  
Dr. José Alberto Narváez Zapata

  
Dr. Alberto Mendoza Herrera

  
M. en C. María del Socorro Ramírez González

  
Dr. Miguel Ángel Reyes López

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
Dr. Miguel Ángel Reyes López



## ÍNDICE

<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	<b>I</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>II</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....	<b>IV</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>V</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>VI</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
2.1 <i>Metabolismo básico de las levaduras</i> .....	3
2.1.1 Crecimiento y división celular .....	4
2.1.2 Fermentación alcohólica.....	6
2.2 <i>Producción de bebidas alcohólicas a partir de agaves</i> .....	7
2.2.1 Mezcal .....	7
2.2.2 Tequila.....	8
2.3 <i>Tipos de estrés y su respuesta metabólica</i> .....	9
2.3.1 Tolerancia al estrés por temperatura .....	10
2.3.2 Tolerancia al estrés osmótico .....	11
2.3.3 Tolerancia al estrés por etanol .....	12
2.3.4 Tolerancia al estrés oxidativo .....	13
2.3.4.1 Generación de ROS por compuestos químicos.....	15
2.3.5 Respuestas metabólicas al estrés oxidativo .....	16
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>18</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>19</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
5.1 <i>Objetivo general:</i> .....	19
5.1.1 <i>Objetivos particulares:</i> .....	19
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
6.1 <i>Material biológico</i> .....	20
6.2 <i>Condiciones de crecimiento</i> .....	20
6.3 <i>Medición de la tolerancia al estrés por SO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i> .....	20
6.4 <i>Tolerancia al estrés por compuestos fenólicos durante las fermentaciones</i> .....	21

---

6.5 Cuantificación de la producción de CO <sub>2</sub> .....	22
6.6 Cuantificación de la biomasa .....	22
6.7 Cinética de crecimiento.....	22
6.8 Cuantificación de azúcares reductores .....	22
6.9 Diseño de oligonucleótidos para fragmentos de los genes Superóxido dismutasa (SOD1 y SOD2) y Catalasa (CAT1 y CTA2).....	23
6.10 Extracción del ADN genómico .....	23
6.11 Amplificación por PCR .....	24
6.12 Secuenciación y análisis del gen SOD .....	24
6.13 Cuantificación de peróxido de hidrógeno.....	25
6.14 Cuantificación de proteína .....	25
6.15 Evaluación de la actividad enzimática SOD y CAT .....	26
6.15.1 Preparación de las muestras .....	26
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
7.1 Tolerancia al estrés por SO <sub>2</sub> .....	27
7.2 Tolerancia al estrés por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	30
7.3 Tolerancia al estrés por compuestos fenólicos durante las fermentaciones .....	32
7.4 Extracción y amplificación de ADN .....	39
7.5 Determinación de polimorfismos en el gen Sod1 .....	40
7.6 Caracterización metabólica en cepas seleccionadas.....	41
7.6.2 Cinética de crecimiento .....	41
7.6.3 Cinética de consumo de azúcares.....	43
7.6.4 Cuantificación de la proteína .....	44
7.6.5 Cuantificación de peróxido de hidrógeno.....	44
7.6.6 Determinación de la actividad enzimática.....	45
<b>8. DISCUSION .....</b>	<b>48</b>
8.1 Tolerancia al estrés por SO <sub>2</sub> y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	48
8.2 Tolerancia al estrés por compuestos fenólicos durante las fermentaciones .....	49
8.3 Determinación de polimorfismos en el gen Sod1 .....	49
8.4 Caracterización metabólica en cepas Saccharomyces.....	50
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>53</b>
<b>10. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>54</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>55</b>
<b>APÉNDICES .....</b>	<b>60</b>
APÉNDICE I. Curva estándar para Método Ácido 3,5 Dinitrosalicílico. ....	60
APÉNDICE II. Cuantificación de proteína por el Método de Bradford.....	61

---

<i>APÉNDICE III. Curva de calibración de Peróxido de hidrógeno .....</i>	<i>62</i>
<i>APÉNDICE IV Protocolo Kit Catalasa .....</i>	<i>63</i>
<i>APÉNDICE V. Protocolo kit Sod .....</i>	<i>66</i>
<b>APÉNDICE VI PURIFICACIÓN DE BANDAS DE GEL .....</b>	<b>69</b>

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Principales ingredientes de los medios industriales seleccionados por las levaduras (Tomado de Walker <i>et al.</i> , 2000).....	<b>3</b>
<b>Cuadro 2.</b> Clasificación de las cepas de levadura por su tolerancia a los diferentes valores de concentración de SO <sub>2</sub> .....	<b>29</b>
<b>Cuadro 3.</b> Clasificación de las cepas de levadura por su nivel de tolerancia a los diferentes rangos de concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	<b>32</b>
<b>Cuadro 4.</b> Valores finales (120 h) de producción de CO <sub>2</sub> , azúcares residuales y biomasa (peso seco) obtenidos en el medio M2 (100 g/L azúcares totales, G/F 1:9) para las 7 cepas seleccionadas <i>S. cerevisiae</i> y no- <i>Saccharomyces</i> creciendo con diferentes concentraciones de furfural y de vainillina. ....	<b>38</b>
<b>Cuadro 5.</b> Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> intracelular en muestras de la cinética de fermentación en medio M2 suplementado con 1.5 g/L de vainillina o de furfural, respectivamente.....	<b>45</b>



LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema general de fermentación alcohólica, con énfasis en la formación de los dos subproductos principales, etanol y dióxido de carbono. Imagen tomada de Alberts (2010). ..... 6
- Figura 2.** Representación esquemática de la naturaleza temporal y secuencial de posibles tensiones encontradas por la levadura durante la propagación fábrica de cerveza, fermentación y almacenamiento (Vital-López y Larralde-Corona, 2016). ..... 10
- Figura 3.** Posibles fuentes de ROS y su interacción con la célula. Las fuentes intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) que están involucrados en la apoptosis se encuentran marcados en rojo..... 14
- Figura 4.** Tolerancia cuantificada por medio de la viabilidad de las cepas de *S. cerevisiae* a concentraciones crecientes de dióxido de azufre en el medio. .... 28
- Figura 5.** Tolerancia cuantificada por medio de la viabilidad de las cepas no-*Saccharomyces* a concentraciones crecientes de dióxido de azufre en el medio. .... 28
- Figura 6.** Tolerancia evaluada como viabilidad de las cepas de *S. cerevisiae* a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno en el medio sólido. Las cepas fueron incubadas a 30°C por 24 h y el conteo de colonias se realizó al finalizar este tiempo o hasta que las colonias fueron contables. .... 30
- Figura 7.** Tolerancia evaluada como viabilidad de las cepas no-*Saccharomyces* a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno en el medio sólido. Las cepas fueron incubadas a 30°C por 24 h y el conteo de colonias se realizó al finalizar este tiempo o hasta que las colonias fueron contables..... 31
- Figura 8.** Medición de la tolerancia a vainillina y furfural de las siete cepas seleccionadas (panel A, *S. cerevisiae*; panel B, no-*Saccharomyces*) evaluado mediante seguimiento de la producción de CO<sub>2</sub> durante la fermentación en el medio M2, 100 g L<sup>-1</sup> (G/F 1:9): - - - -Control, -■- 0.5, -▲- 1.0, -◆- 1.5, -●- 2.0 g/L de vainillina; -Δ- 1.0, -◇- 1.5, -○- 3.0 g/L de furfural..... 33
- Figura 9.** Porcentajes de inhibición del crecimiento de las 7 cepas de levaduras seleccionadas causados por las diferentes concentraciones de vainillina (panel A) y furfural (panel B), sobre la producción de CO<sub>2</sub> (barra azul), consumo de azúcares (barra roja) y biomasa final producida (barra verde). ..... 36
- Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa de la extracción de ADN de las levaduras en estudio. En los carriles del 2 al 5 se muestra el ADN de las levaduras de la especie *S. cerevisiae* (2: Fermichamp, 3: Sc3D4, 4: ScMsc3 y 5: Sc3Y8), mientras que en el carril 6 y 7 ADN de las levaduras de la especie *T. delbrueckii* (6: Td1AN9 y 7: Td1AN2). ..... 39

- Figura 11.** Amplificación del gen del gen Sod1. En el primer carril el marcador de peso molecular de 100 pb, del carril 2 al 5 la amplificación del gen Sod1 de las levaduras de la especie *S. cerevisiae* (2: Fermichamp, 3: Sc3D4, 4: ScMsc3 y 5: Sc3Y8) y en el carril 6 la amplificación del gen Sod1 para la levadura de la especie *T. delbrueckii* (Td1AN9) y en el carril 8 el control negativo (agua). ... **39**
- Figura 12.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las cepas *S. cerevisiae* de la colección LBI-CBG evaluadas contra la secuencia de *S. cerevisiae* S288c. .... **40**
- Figura 13.** Cinética de crecimiento durante la fermentación en presencia de 1.5 g/L de vainillina (circulo amarillo) ó de 1.5 g/L de Furfural (triángulo café), y el cultivo testigo (cuadrado blanco) de las tres cepas *Saccharomyces cerevisiae* LBI-CBG y de la cepa comercial Fermichamp. Las líneas continuas señalan el conteo celular total medido en cámara Neubauer (cel/mL) y las líneas punteadas indican el crecimiento por conteo en microgota (UFC/mL) ó viabilidad. .... **42**
- Figura 14.** Consumo de azúcares durante la fermentación en presencia de vainillina y furfural (1.5 g/L) de tres cepas *Saccharomyces* y la cepa comercial Fermichamp. .... **43**
- Figura 15.** Actividad superóxido dismutasa (SOD) en las cepas *Saccharomyces*: Sc3D4, Sc3Y8, ScMsc3 y la cepa comercial Fermichamp creciendo en el medio M2: control (verde), con 1.5 g/L de vainillina (azul), y con 1.5 g/L de furfural (rojo). Las barras de error indican la desviación estándar. .... **46**
- Figura 16.** Actividad catalasa (CAT) en las cuatro cepas *Saccharomyces*: Sc3D4, Sc3Y8, ScMsc3 y la cepa comercial Fermichamp, creciendo en el medio M2: control (verde), con 1.5 g/L de vainillina (azul), y con 1.5 g/L de furfural (rojo). Las barras de error indican la desviación estándar. .... **47**

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grados centígrados
g/L	Gramos por litro
µmoles/ g de FW	Micromoles por gramo de pesos fresco
mM	Milimolar
ppm	Partes por millón
DNS	Ácido 2,3 Dinitrosalicílico
pb	Pares de bases
ADN	Ácido desoxirribonucleico
µL	Microlitro
mL	Mililitro
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
YPD	Extracto de levadura papa dextrosa
Rpm	Revoluciones por minuto
UFC	Unidades formadoras de colonias
CAT	Catalasa
SOD	Superóxido dismutasa
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
SO <sub>2</sub>	Dióxido de azufre
U	Unidad de actividad enzimática

**DEDICATORIA**

*A mis padres.*

## AGRADECIMIENTOS

Detrás de un gran proyecto como el presente trabajo existieron importantes influencias que lo hicieron posible, ya sea directamente y/o a través de su apoyo moral y sentimental, lo cual es grato reconocer y sobre todo agradecer.

A Dios por brindarme vida, fuerza y la sabiduría que necesitaba para concluir este proyecto de Tesis.

A mi Directora de Tesis Dra. C. Patricia Larralde Corona, quien me brindó el apoyo moral y económico para cumplir con los objetivos de este trabajo, por sus sabios consejos en el camino de la Investigación, por ser paciente conmigo y sobre todo por confiar en mis capacidades y habilidades. A mi comité encargado de la revisión de esta Tesis, Dr. José Alberto Narváez Zapata, Dr. Alberto Mendoza Herrera, Dr. Miguel Ángel Reyes López, M. C. Ma. Del Socorro Ramírez González y M.C. Cristian Lizarazo Ortega por sus críticas constructivas, apoyo e ideas que hicieron posible la culminación de este trabajo.

Al Laboratorio de Biotecnología Industrial, especialmente a la M. C. Erika de la Cruz quien me brindó amablemente su apoyo técnico y sobre todo su valiosa amistad durante mi estancia en la Maestría. A mis compañeros de laboratorio y de Generación 2014- 2016 por los momentos vividos dentro y fuera del Centro de Biotecnología, así como las sabias enseñanzas que pudieron haber impactado en mi formación integral a lo largo de la Maestría.

A mi hermana Lulú, mi segunda mamá, quien ha sido mi ejemplo e importante influencia para concluir metas de trabajo, por apoyarme económica y moralmente para poder empezar y concluir este proyecto de vida, a ella mi admiración y respeto.

Agradezco el apoyo económico brindado por CONACyT por la Beca de Estudios Nacional. Además por el apoyo de la SIP por la Beca Tesis y el apoyo complementario de la Beca BEIFI asociado a los proyectos SIP-20151149 y SIP-20161919 del Instituto Politécnico Nacional.

A todos, muchas gracias.

## RESUMEN

Existen más de 700 especies de levaduras, algunas de ellas muy conocidas debido a sus aplicaciones industriales. Estas corresponden al género *Saccharomyces*, que es de amplia utilidad en la producción de pan y bebidas alcohólicas, el alcohol industrial y bioetanol. La composición de los diversos tipos de mosto a utilizar para la producción de estos alcoholes, depende básicamente de la materia prima, la cual puede variar, a su vez, por las condiciones agronómicas de su producción. Algunos de los parámetros que pueden variar e influenciar la fermentación alcohólica son el pH, la temperatura, tipo y concentración de azúcares, nutrición, compuestos tóxicos, estrés osmótico, etc.

En este trabajo se utilizaron dos metodologías para cuantificar la tolerancia de las levaduras al estrés por diversos compuestos como SO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, vainillina y furfural en 24 cepas de la colección del Laboratorio de Biotecnología Industrial. La primera metodología consistió en utilizar la técnica de microgota la cual fue realizada en un medio sólido. La segunda técnica midió el desempeño metabólico a través de la cuantificación de la producción de CO<sub>2</sub> durante la fermentación en presencia de vainillina y furfural. Las cepas mostraron altas tolerancias al estrés, más de 600 ppm con SO<sub>2</sub>, hasta 25 mM con Peróxido de hidrógeno y la capacidad de tolerar concentraciones de hasta 1.5 g/L con vainillina y furfural.

Finalmente, se logró explicar uno de los mecanismos de detoxificación a través de la evaluación de las actividades enzimáticas de Superóxido dismutasa y Catalasa, en donde se observaron cambios de sus niveles de actividad enzimática con respecto al control sin estrés. Se analizó además la secuencia de aminoácidos de la enzima SOD1, en la cual no se encontraron cambios relevantes en la activación y/o función antioxidante de esta enzima.

## ABSTRACT

There are more than 700 yeast species, some of them very well-known due to their industrial applications, mainly correspond to the genus *Saccharomyces*, of great utility in production of bread and alcoholic beverages, as well as industrial alcohol and bio-ethanol. The composition of the various types of must basically depends on the raw material, which varies, in turn, with the agronomic conditions. The pH, temperature, sugar type and concentration, nutrition, toxic compounds, osmotic stress, etc., are some of the parameters that can vary and influence the alcoholic fermentation.

In this work were used two methodologies to quantify the tolerance of yeasts to stress by various compounds such as SO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, vanillin and furfural in 24 strains from the collection of Laboratorio de Biotecnología Industrial. The first methodology consisted in using the technique of microdrop which was performed in a solid medium. The second technique measured metabolic performance through quantification of CO<sub>2</sub> production during fermentation in presence of vanillin and furfural. The strains showed high tolerances to stress, more than 600 ppm with SO<sub>2</sub>, up to 25 mM with hydrogen peroxide and the ability to tolerate concentrations of up to 1.5 g/L with vanillin and furfural.

Finally, it was possible to explain one of the mechanisms of detoxification through the evaluation of the enzymatic activities of superoxide dismutase and catalase, where changes in their levels of activity were clearly observed with respect to control (unstressed) cultures. We also analyzed the amino acid sequence of the enzyme SOD1, in which no relevant changes in the activation and / or antioxidant function were found.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las levaduras son hongos unicelulares, que se reproducen vegetativamente por vía sexual y asexual (gemación o fisión), tales estadíos sexuales no forman cuerpos fructíferos. Las levaduras están presentes en nuestro ambiente natural, las plantas comúnmente son su nicho ecológico y se localizan principalmente en la interfase de los nutrientes solubles como los azúcares. Además, varias levaduras se asocian al tracto digestivo y piel de algunos animales, tales como *Candida pintolopesii* y *Pityrosporum* spp, respectivamente, por esta razón se dice que las levaduras están presentes en el agua, en la atmósfera y en lugares de condiciones extremas (Walker, 2000).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido tradicionalmente utilizada en la producción de pan, en la elaboración de la cerveza, en la industria de elaboración de vino, en la industria farmacéutica y además, han sido ampliamente estudiadas para la producción de etanol combustible (bioetanol) debido al logro de la manipulación genética (Zhao *et al.*, 2014). En estos procesos que involucran la fermentación, las células de levadura están sujetas a una gran cantidad de condiciones adversas incluyendo la limitación de nitrógeno, altas temperaturas, la inhibición del etanol, el potencial osmótico (por ejemplo, de los azúcares del sustrato), pH, la concentración de oxígeno, entre otros inhibidores (compuestos lignocelulósicos y azufrados).

Sin embargo, se ha estudiado que las levaduras industriales perciben y responden rápidamente a estas condiciones de estrés y por esta razón ajustan su actividad metabólica para evitar la pérdida sustancial de viabilidad. De tal manera que, el estudiar y entender los mecanismos de la tolerancia al estrés de la levadura en diversas condiciones ambientales contribuyen al mantenimiento de cepas más robustas para lograr una fermentación alcohólica eficiente. Así que, la capacidad de las levaduras para tolerar diversos tipos de estrés fisicoquímicos es uno de los criterios más importantes para caracterizar y seleccionar cepas que logren una fermentación alcohólica eficiente en sus diferentes tipos de ambiente (Zhao y Bai, 2009), y esta selección puede ser posible debido a que la tolerancia a los diferentes tipos de estrés durante los procesos biológicos varía de cepa a cepa. Es por ello que, cepas de levadura pueden ser particularmente caracterizadas y utilizadas de acuerdo a su perfil metabólico.

En México existen diferentes bebidas alcohólicas obtenidas de diferentes jugos de agave que se cocinan, fermentan y destilan. Las más importantes por su denominación de origen son, bacanora, tequila y mezcal. En el estado de Tamaulipas se produce tequila y mezcal, y del proceso de elaboración de esta última bebida el grupo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología



Industrial (LBI-CBG) logró aislar más de 100 cepas de levaduras, pertenecientes a 10 especies diferentes de levaduras, colectadas en diversas etapas de la fermentación, mismas que se han caracterizado por su capacidad de consumo de azúcares y producción de etanol. De la misma manera se ha observado que en dichas cepas la capacidad de la producción de etanol es muy variable (Arratia, 2010, Oliva-Hernández *et al.*, 2012, De la Torre-González *et al.*, 2016); por lo que la caracterización de la tolerancia al estrés por compuestos fenólicos y azufrados es parte importante del estudio exhaustivo para su selección.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Metabolismo básico de las levaduras

Las levaduras son organismos quimioorganótrofos que obtienen carbono y energía (en forma de ATP) de la degradación de compuestos orgánicos como maltosa, sacarosa, fructosa, xilosa y lactosa, de los cuales se deriva la glucosa que es la más asimilada por las levaduras (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Principales ingredientes de los medios industriales seleccionados por las levaduras (Tomado de Walker *et al.*, 2000).

Compuesto	Melazas	Mostos de Malta	Mosto de vino	Suero de queso
<b>Fuente de Carbono</b>	Sacarosa, fructosa, glucosa y rafinosa.	Maltosa, sacarosa, fructosa, glucosa, maltotriosa	Glucosa, fructosa, sacarosa (trazas)	Lactosa
<b>Fuentes de Nitrógeno</b>	Compuestos nitrogenados como proteínas no asimilables	Compuestos de bajo peso molecular como $\alpha$ - amino nitrógenos, iones amonio y un porcentaje de aminoácidos	Variables niveles de amoniaco que puede ser limitante. Un porcentaje de aminoácidos	Proteínas no asimilables como globulina y albúmina. Bajos niveles de amonio y nitrógeno de urea
<b>Minerales</b>	Suministro de P, K, y S disponible. Altos niveles de $K^+$ que pueden ser inhibitorios	El suministro de P, K, Mg y S disponible.	Suministro de P, K, Mg y S disponible. Altos niveles de sulfito presente	Suministro de P, K, Mg y S disponible
<b>Vitaminas</b>	Pequeños suministros adecuados de vitaminas. La biotina es deficiente en este tipo de mosto	El suministro de vitaminas es adecuado. Altos niveles de azúcares que van como complemento en los mostos, puede ser deficiente en biotina	Generalmente el suministro de vitaminas es suficiente	Grandes rangos de vitaminas presentes
<b>Oligoelementos</b>	Metales presentes, aunque el $Mn^{2+}$ puede ser el limitante	Todo suministro de metales, aunque el $Zn^{2+}$ puede ser el limitante	Suficiente cantidad disponible	Están presentes el Fe, Zn, Mn, Ca, Cu
<b>Otros compuestos</b>	Azúcares no fermentables (2-4%), ácidos orgánicos, pigmentos de ceras, sílice, residuos de pesticidas, compuestos caramelizados, betaina	Maltodextrinas no fermentables, pirazina.	Pentosas no fermentables, ácido málico y tartárico. Ácido decanóico y octanóico puede ser inhibitorio. Puede ser deficiente en esteroides y ácidos grasos insaturados.	Lípidos, NaCl. Ácido láctico y cítrico.

Sin embargo, un 5% de los requerimientos de carbono puede ser incorporados a partir de dióxido de carbono (Walker *et al.*, 2000). Como toda célula, la levadura requiere de elementos y compuestos importantes tales como hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, magnesio, potasio, calcio, cobre, hierro, manganeso, zinc, níquel, molibdeno, entre otros, todos ellos obtenidos de diferentes fuentes, de acuerdo con la presencia de ellos en el medio seleccionado. Todos estos requerimientos nutricionales son captados por la levadura bajo 4 mecanismos descritos por Walker *et al.* (2000), difusión libre, difusión facilitada, difusión por canales y transporte activo de membrana.

Así que, el metabolismo de las levaduras se refiere a la asimilación química de nutrientes y agrupa una serie de reacciones enzimáticas, además de su regulación. Esta secuencia de reacciones catalizadas por enzimas y que oxidativamente convierten a la glucosa en ácido pirúvico en el citoplasma de la célula y es conocido como la glucólisis.

### **2.1.1 Crecimiento y división celular**

La forma más común de reproducción de las levaduras es asexual o por gemación; no obstante, también se puede observar fisión, seguida de la formación de pared celular y crecimiento de micelio por la elongación de la cadena. El crecimiento de las levaduras se asocia casi completamente con el crecimiento de las gemas, las cuales alcanzan el tamaño de la célula madura al tiempo que se separa de la célula madre. En el caso de los ascomicetos existe una forma de reproducción sexual a través de un ciclo que da como alternativa los estados haploide y diploide, y se materializa mediante la producción de esporas. Las levaduras entran a esta fase de reproducción sexual cuando las condiciones nutricionales no son ideales, por ejemplo en el caso de una carencia prolongada de nitrógeno. Debido a las condiciones favorables en el proceso de fermentación para la obtención de bebidas alcohólicas las levaduras se reproducen asexualmente (Gschaedler *et al.*, 2016). El ciclo celular involucra eventos continuos (el crecimiento celular) y eventos periódicos (síntesis de ADN y mitosis), la culminación de ambos eventos es la división celular. Los eventos periódicos pueden ser divididos en cuatro fases: síntesis de ADN (Fase S), el periodo de crecimiento después de la síntesis de ADN (Fase G2), mitosis (Fase M) y (Fase G1) el periodo de crecimiento antes de la fase de síntesis (Walker, 2000).

En cuanto a las fases de crecimiento todas las levaduras presentan un comportamiento similar y se pueden dividir en cuatro:

*Fase lag o de retraso:* Es conocida como fase de adaptación y se refiere a la etapa donde los microorganismos acaban de ser colocados en un medio de cultivo adecuado para el crecimiento. Durante esta primera etapa del cultivo no existe o se presentan escasos cambios en la cantidad celular y este fenómeno puede durar desde una hora hasta varios días. Los microorganismos no se reproducen en un medio nuevo debido a que las células agotan diferentes coenzimas esenciales u otros constituyentes celulares y requiere cierto tiempo nueva síntesis. Este retraso en el crecimiento se puede presentar cuando el inóculo lo forman células viejas que no están metabólicamente activas (pero no muertas) o dañadas por algunos tratamientos por calor o sustancias químicas.

*Fase exponencial o logarítmica:* En esta fase las células comienzan a dividirse y entran en un periodo de crecimiento exponencial. La producción celular alcanza una actividad máxima durante este periodo y su tiempo de generación (lapso requerido para que se duplique el número de células) llega a un mínimo constante, Como el tiempo de duplicación se puede considerar constante, la representación logarítmica del crecimiento durante esta fase exponencial se puede aproximar a una línea recta. Durante la fase exponencial las células comienzan a mostrar sus características visibles: morfología, densidad y color de sus colonias y además, en esta fase las células son metabólicamente más activas.

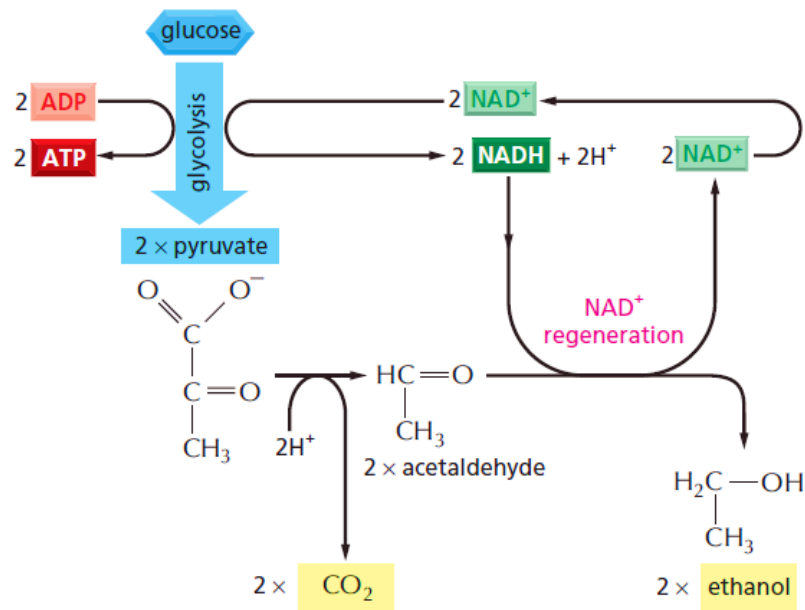
*Fase estacionaria:* Durante el crecimiento exponencial se puede generar una concentración de células asombrosamente alta que dependerá de la cantidad de sustrato presente en el medio y de las condiciones operacionales. Al final la velocidad de crecimiento disminuye, debido a que las células entran en una fase de mantenimiento donde la población se estabiliza y su capacidad metabólica se vuelve más lenta, adicionalmente algunos microorganismos comienzan a morir. Las razones para el cese del crecimiento exponencial no siempre son claras, sin embargo, pueden ser consecuencia de la acumulación de productos de degradación tóxicos para las células y/o se agotan ciertos nutrientes esenciales.

*Fase de muerte:* Cuando el número de células muertas supera drásticamente al de nuevas células formadas se dice que la población entra en fase de muerte o fase de declive logarítmico. Esta etapa continúa hasta que la población ha disminuido a una pequeña fracción de células más resistentes, o hasta que la población muere por completo. Sin embargo, en ocasiones es posible identificar transiciones entre las etapas (Gschaedler *et al.*, 2016).

### 2.1.2 Fermentación alcohólica

La fermentación puede dividirse en tres etapas principales que son el transporte de azúcares al interior de la membrana, la transformación de los azúcares en piruvato y la producción de etanol. Para llevarse a cabo el proceso de fermentación alcohólica es necesario una concentración óptima de fuente de carbono (glucosa), este compuesto dicta la ruta metabólica que seguirán las levaduras. Una vez que la glucosa ingresa a la célula de la levadura se inicia un proceso conocido como glucolisis y este metabolismo es el resultado de una serie de diez reacciones enzimáticas que generan como producto final el piruvato.

En la primera etapa de la fermentación, el piruvato se descarboxila a acetaldehído y  $\text{CO}_2$ , y es esencialmente irreversible, por la piruvato- descarboxilasa, la cual requiere de  $\text{Mg}^+$  y una coenzima, el pirofosfato de tiamina. La descarboxilación del piruvato se produce a través de una serie de intermediarios unidos covalentemente al pirofosfato de tiamina. En la Figura 1 se muestra el proceso fermentativo, en la etapa final de la fermentación alcohólica, el acetaldehído se reduce a etanol, donde el  $\text{NADH} + \text{H}^+$  aportan el potencial de reducción necesario y la reacción es catalizada por el enzima alcohol-deshidrogenasa (Alberts *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Esquema general de fermentación alcohólica, con énfasis en la formación de los dos subproductos principales, etanol y dióxido de carbono. Imagen tomada de Alberts (2010).

Además, durante este proceso de fermentación también son producidos otros compuestos orgánicos como glicerol, succinato, acetato, aldehídos, ácido acético, metanol, alcohol de fusel, entre otros (Arshad *et al.*, 2008).

## 2.2 Producción de bebidas alcohólicas a partir de agaves

### 2.2.1 Mezcal

La producción de bebidas fermentadas o destilados de mezcal se realiza en más de 20 estados y se utilizan por lo menos 28 especies de *Agave*. Así, el producto final puede provenir de una sola especie o de la mezcla de varias de ellas, las bebidas más sobresalientes y populares dentro de la tradición artesanal mexicana son el mezcal, tequila, bacanora, el destilado o licor de agave, sotol y pulque (García Mendoza, 2012).

Particularmente, el mezcal es una bebida alcohólica destilada derivada de la fermentación y cocción de las piñas de diferentes especies de agave (*Agave angustifolia* Haw, *A. esperima jacobii*, *A. weberi*, *A. potatorum* zucc, *A. salmiana*) que se distribuyen en regiones limitadas de México (NOM-070-SCFI 1997). El mezcal se ha producido por medio de un proceso artesanal que es de varios siglos de antigüedad.

El proceso de elaboración de mezcal se puede dividir en seis etapas principales: cosecha y selección de la planta de agave, cocción, molienda, fermentación, destilación y envasado. Las piñas de las diferentes especies de agave contienen reservas de polisacáridos (oligofructanos) que se encuentran en los tallos y en la base de las hojas, estos son hidrolizados durante la etapa de cocción en hornos de piedra, que consisten en un agujero lleno de piedras previamente calentadas que es cubierto con tierra. Algunos de los puntos a destacar en la producción de mezcal son el que, durante la cocción, la temperatura no está bien controlada, además, otras variables dependen de la casa de producción. Los niveles más altos de compuestos caramelizados se encuentran en agave cocido, derivados de la degradación de los oligofructanos, los cuales son sintetizados por el metabolismo ácido de las crasuláceas, y son compuestos principalmente de unidades de fructosa unidas a una molécula de sacarosa, por ejemplo en agave azul y otras especies de agave, existen mezclas complejas de fructanos ramificados, donde los restos de fructosa están conectados por enlaces  $\beta$  (2-1) y  $\beta$  (2-6) Así que, durante la etapa de cocción los oligofructanos se hidrolizan para producir monómeros u oligosacáridos con grados más bajos de polimerización (García *et al.*, 2011).

Al terminar el proceso de hidrólisis de las piñas de agave, los mostos no sólo contienen los azúcares fermentables, también se ha encontrado una variedad de diferentes compuestos por espectrometría de masas (GC-MS) que incluyen alcoholes, aldehídos (furfural), aminoácidos,

furanos, ácidos orgánicos, piranos, compuestos de azufre, terpenos, y furanones. Además, productos volátiles de tratamiento térmico de agave como el alcohol feniletílico,  $\alpha$ -damascenona, linalol y probablemente la vainillina (Benn y Peppard, 1996), que son la fuente de las características organolépticas del tequila. Mientras que los furanos son derivados de la degradación térmica principalmente de pentosas y hexosas, donde el compuesto formado más abundante es el 5- (hidroximetil) furfural (HMF). Adicionalmente, el furfural, 2-furanmetanol, y ácido 2-furancarboxílico, entre otros, y a medida de la proporción en que son liberados, para procesos más industrializados, pueden considerarse como inhibidores tóxicos, otro reto para la producción de etanol durante la fermentación (García *et al.*, 2011; Arellano *et al.*, 2013).

Durante la etapa de fermentación del mezcal, no se utilizan levaduras comerciales y si no que es utilizada la levadura presente en el mosto de agave la cual lleva a cabo la fermentación natural. Estas levaduras son expuestas a condiciones extremas ya que el agave posee entre 200 y 350 g de azúcares reductores/ kg de fibra de agave lo que provoca el estrés osmótico, así que, la levadura debe producir etanol con el fin de disminuir el estrés osmótico; dado que las levaduras nativas de mezcal están bajo un estrés constante durante la fermentación se cree que tienen un sistema desarrollado de adaptación para sobrevivir en esa condición (Arellano *et al.*, 2013).

### 2.2.2 Tequila

El tequila es una bebida alcohólica destilada que se obtiene sólo de la variedad azul de *Agave tequilana*, la cual tiene Denominación de origen (DOT) en el estado de Jalisco y en algunos municipios de Michoacán, Guanajuato, Nayarit y Tamaulipas. Esta bebida se ha convertido en una bebida popular en el mundo entero y se elabora mediante métodos industriales para alcanzar mayor homogeneidad en todos sus aspectos y reducir costos (García Mendoza, 2012).

En el proceso productivo del tequila se realizan operaciones básicas, las cuales son transformaciones químicas, físicas y bioquímicas, entre ellas se mencionan: jima, hidrólisis, extracción, formulación, fermentación, destilación y maduración, todos ellos descritos por Ibarra *et al.* (2010) en su libro Ingeniería del tequila.

En el proceso de producción de tequila, la hidrólisis de la inulina, azúcar presente en el *Agave tequilana* puede realizarse de forma artesanal o industrializada, ya que pueden utilizarse autoclaves u hornos de mampostería (Ibarra *et al.*, 2010) como se describe a continuación:

- *Autoclaves*

La cocción de manera industrializada es realizada en autoclaves de hasta 40 toneladas, en donde por la parte superior es inyectado vapor de agua, la parte inferior dispone de

unas parrillas que permiten el drenado de los jugos y el soporte de las piñas. Las piñas son cargadas a las autoclaves cortadas en mitades para dar uniformidad a la cocción y disminuir el tiempo requerido. El tiempo de cocción en la autoclave es de 14 horas, seguido de 12 horas de reposo, tiempo en el cual continua la cocción y el desdoblamiento de azúcares; la presión de trabajo está entre 0.8 Kgf/cm<sup>2</sup>, la temperatura es de 105 °C. Al disminuir la presión y la temperatura de la cocción, se extraen muestras de estas piñas para analizar en laboratorio, así determinan la eficiencia de la hidrólisis por métodos gravimétricos y otros utilizando HPLC (*High performance liquid chromatography*, cromatografía líquida de alta eficiencia). Otras tequileras, han implementado también la hidrólisis ácida adicionalmente a la hidrólisis térmica (Huitrón *et al.*, 2013)

- *Hornos de mampostería*

Estos hornos son construidos internamente en ladrillo, aquí las piñas del agave son introducidas por medio de bandas transportadoras y se alimenta con vapor a una temperatura de 95 °C y presión de 1 Kgf/cm<sup>2</sup>. El tiempo de su residencia en los hornos es de 24 horas, con un reposo de 24 horas; y el paso de los agaves por este tipo de cocción, brinda organolépticamente al tequila como producto final mejores condiciones organolépticas como el aroma.

De la misma forma, para la obtención de los mostos, que es la operación para separar los azúcares de las fibras de agave, se utilizan molinos de tipo cañero, o de manera artesanal, donde antiguamente se utilizaba una tahona, que es una piedra en forma de rueda que iba exprimiendo las fibras en su desplazamiento, operación que era de poca eficiencia.

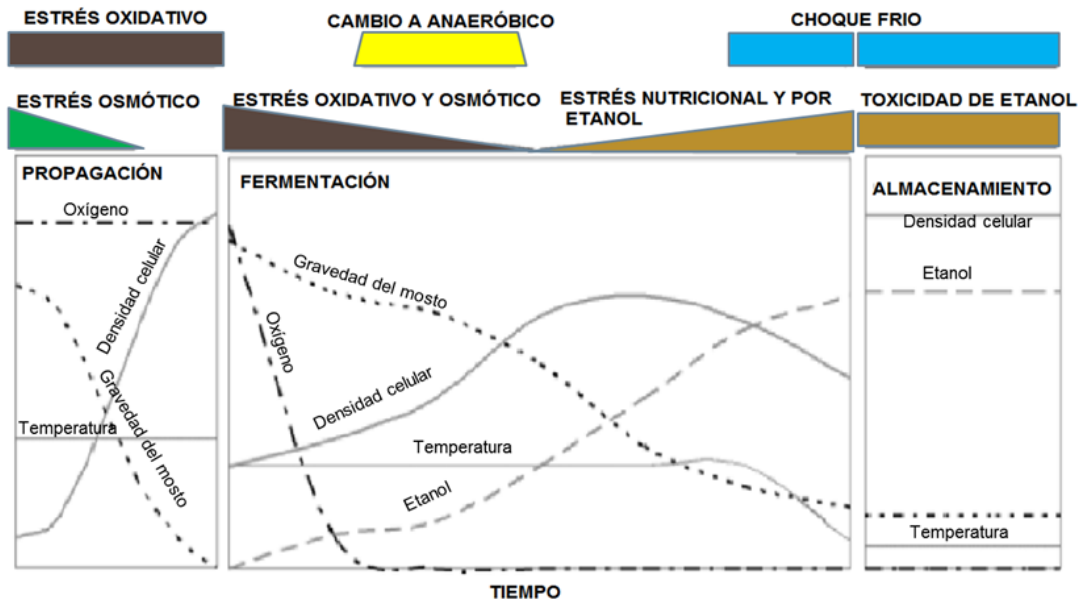
Un punto importante en la etapa de fermentación, a diferencia de la producción de mezcal es que en la producción de tequila la fermentación de los mostos de *Agave tequilana* no se realiza por levaduras naturales. En este caso, se emplea un inóculo de levadura ya sea comercial o cepa propia, esta cepa es adaptada a las condiciones de fermentación que se inicia en una caja Petri con 10 mL de mosto y una vez crecida, se toman las cantidades para ser inoculada en volumen de mayor escala. Las eficiencias en la producción de etanol dependen principalmente de la adaptación de la cepa al mosto. La levadura más utilizada en la producción de tequila es la *Saccharomyces cerevisiae* (Ibarra *et al.*, 2010).

### 2.3 Tipos de estrés y su respuesta metabólica

Durante los procesos de fermentación, las células de levadura se ven sometidas a varios tipos de estrés a medida que las condiciones del medio cambian, la levadura responde rápidamente



synthesizing molecules that allow them to attenuate or repair the damage caused by stress. This study has evidenced that the response at the transcriptional level is important for cellular survival and has led to the description of various signaling pathways and transcription factors involved in this response (Folch *et al.*, 2004), for example in the propagation of yeast and its processing within beer production (Figure 2).



**Figura 2.** Representación esquemática de la naturaleza temporal y secuencial de posibles tensiones encontradas por la levadura durante la propagación fábrica de cerveza, fermentación y almacenamiento (Vital-López y Larralde-Corona, 2016).

Por lo anterior, a continuación, se describen con más detalle las respuestas metabólicas hacia los diferentes tipos de estrés que pueden presentarse durante los procesos de fermentación.

### 2.3.1 Tolerancia al estrés por temperatura

El estrés a altas temperaturas, influye adversamente en la fisiología celular de la levadura y la viabilidad celular, afecta la morfología general de la célula produciendo una gemación atípica y el crecimiento de la pared celular se va haciendo irregular, ocasionando con esto el aumento de tamaño de la célula, afectando la división y crecimiento celular. La temperatura también afecta la estructura de la membrana plasmática en su función, por ejemplo, en la disminución de ácidos grasos insaturados de la membrana, además, también disminuye el pH intracelular, y lleva a cabo

la represión de síntesis de muchas proteínas mitocondriales, el incremento en la frecuencia de mutaciones y los daños por calor al ADN es más grave.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se ha prestado gran atención a la familia de proteínas Hsp100/Clp, de los cuales Hsp104 tiene un papel clave en la tolerancia al calor y otros factores de estrés. Hsp104, junto con Hsp70 y Hsp40, componen un complejo chaperona que facilita la reactivación de proteínas dañadas por el calor y por lo tanto ayuda en el mantenimiento de los procesos esenciales en la célula bajo estrés. Aunque un aumento de estas proteínas puede deberse a otros factores de estrés como a condiciones hipertónicas y a etanol. También se sabe que los daños producidos por calor pueden ser contrarrestados por la síntesis de proteínas y por medios de adaptación (Holubarová *et al.*, 2008). La mayoría de las proteínas de este grupo son proteasas y chaperonas moleculares que están involucradas en impedir la desnaturalización o inducir la renaturalización de proteínas, la degradación de proteínas mal plegadas y la disgregación de agregados proteínicos causados por desnaturalización. Algunas de estas proteínas se encuentran también presentes a temperaturas óptimas y, estudios genéticos indican que son proteínas indispensables para mantener el plegamiento correcto de otras proteínas, ensamblar y desensamblar proteínas en estados oligoméricos y degradar proteínas desnaturalizadas o mal plegadas (Folch *et al.*, 2004).

Estas proteínas que han sido también reveladas en diferentes trabajos de investigación (Garay *et al.*, 2004; Gibson *et al.*, 2007), además del mismo grupo de proteínas como la HSP12 en el trabajo de Carrasco *et al.* (2001). Por otro lado, una manera de contrarrestar el efecto de la temperatura, es la aplicación de microcápsulas en los procesos de fermentación, con el que se ha demostrado mejor tolerancia al estrés por temperatura (Sun *et al.*, 2007).

### 2.3.2 Tolerancia al estrés osmótico

El estrés osmótico se ha definido como una situación donde existe un desequilibrio de osmolaridades intracelulares y extracelulares, suficientes para causar un cambio perjudicial en la fisiología de las levaduras. En los ambientes naturales, las levaduras son sometidos continuamente a los cambios en la osmolaridad externa que puede ser extremadamente perjudicial para el funcionamiento celular (Gibson *et al.*, 2007).

Específicamente, la levadura *S. cerevisiae* cuando se enfrenta a una condición de alta osmolaridad externa, ésta sufre un cambio inmediato en el volumen celular debido a la pérdida de agua del citosol. Esta deshidratación es un proceso rápido (aprox. 1 min) y se compensa parcialmente por un influjo de agua de la vacuola al tiempo que ésta acumula iones tóxicos en

beneficio del citoplasma y los organelos; así que para sobrevivir y continuar con el crecimiento, las células deshidratadas pueden recuperar el turgor siempre y cuando la severidad del estrés sea fisiológicamente aceptable. La proliferación celular se reanuda después de un período de adaptación el cual varía dependiendo de un número de factores como la severidad del estrés, del fondo genético de la cepa, y del estado de crecimiento. En esta fase de aclimatación las células de levadura experimentan una serie de cambios como reestructuración del citoesqueleto de actina, arresto transitorio del ciclo celular, y reprogramación del metabolismo. Al mismo tiempo, se inducen mecanismos involucrados en la resistencia al estrés, como son el aumento en la concentración intracelular de glicerol y la exclusión de iones tóxicos. Además, se induce la expresión de una serie de genes cuyos productos participan en diferentes sistemas y/o procesos como el metabolismo redox, la producción de proteínas protectoras y el reajuste en los niveles de carbohidratos, lípidos y aminoácidos (Folch *et al.*, 2004).

Investigaciones como la de Jiménez *et al.* (2011), con enfoques de transcriptómica y las determinaciones de glicerol intracelular, han dado pistas sobre la adaptación de las cepas de levadura para la producción de vino con alto estrés osmótico, basándose en la adaptación a los medios de crecimiento. Además, el incremento de la concentración intracelular de glicerol se relaciona con una mayor resistencia al estrés osmótico (Garay *et al.*, 2004; Zuzuarregui y del Olmo, 2004).

En la levadura *S. cerevisiae* se sabe que el glicerol y la trehalosa funcionan como osmoprotector (Kaino y Takai, 2008). En un estudio se observó la capacidad de la síntesis de osmolitos como la trehalosa y el transporte de cationes que es controlado por la glucosa (García *et al.*, 1997) y se corroboró que la trehalosa, actúa como protectora de membrana (Hounsa *et al.*, 1998; Tekolo *et al.*, 2010). También se ha observado un efecto de protección por la presencia de catequina e inositol con un 55 y 13% de incremento, respectivamente, en los rendimientos de la fermentación, mostrando ser tolerantes a estos compuestos (Caridi, 2003).

### 2.3.3 Tolerancia al estrés por etanol

El propósito principal de la fermentación en la fabricación de bebidas como cerveza, tequila y vino, por ejemplo, es la síntesis de alcohol a partir de azúcares fermentables y de la producción de compuestos particulares de su sabor, dados por la levadura *Saccharomyces*. Sin embargo, un producto importante de la fermentación es una población adecuadamente viable y vital de levadura para que se puede utilizar en las fermentaciones posteriores. Como la fermentación va progresando, la concentración de etanol aumenta y las células se exponen a niveles cada vez más tóxicos de etanol, afectando la viabilidad de la célula y su crecimiento, en la biosíntesis de macromolécula y en la estructura de la membrana y su función (Gibson *et al.*, 2007).

Existen genes que se clasifican en las categorías funcionales de la "respiración aeróbica" y "funcionales de la mitocondria" que han sido revelados recientemente por estar relacionados con la tolerancia a etanol, por ejemplo solo la delección COQ5, 9, 10 ( Coenzima Q) y COX7, 9, 11 (subunidades de Citocromo C oxidasa) mostraron sensibilidad al etanol, por otra parte, los genes relacionados con la respiración y el transporte de electrones también resultan ser regulados para las últimas etapas de la elaboración del sake, haciendo hincapié en la necesidad del metabolismo energético de la tolerancia al estrés de la levadura (Zhao y Bai, 2009).

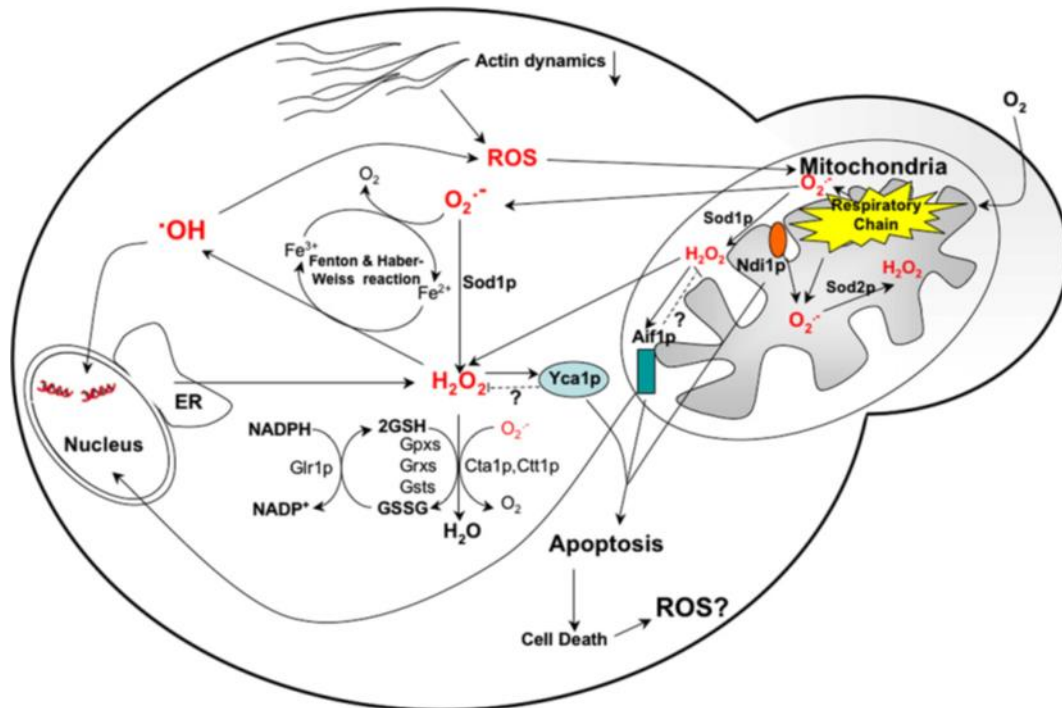
La identificación y caracterización de cepas de levaduras con alta tolerancia al etanol ha causado gran interés, esto, para ser utilizadas en la producción de vinos de calidad. En el trabajo de Antoce *et al.* (2011) se probaron diez diferentes cepas de *Saccharomyces* seleccionadas de viñedos rumanos, en las cuales se observó mediante calorimetría y cálculo de la concentración mínima inhibitoria del etanol un rango variable de resistencia, aun dentro de la colección utilizada industrialmente para la producción de vino. Otras cepas de *S. cerevisiae* han sido modificadas genéticamente para tolerar etanol en medio ácido y a temperaturas elevadas (39 y 41 °C), lo cual sugiere su potencial uso en la producción de bioetanol, debido a la fermentación a altas temperaturas (Benjaphokee *et al.*, 2012). Ya que las levaduras difieren en la capacidad de tolerar etanol, como algunas mencionadas anteriormente, se ha observado que algunas cepas se benefician de la presencia de sales para tener un buen rendimiento alto de etanol. En el trabajo de Ciesarova *et al.*, (1996), se compararon tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, donde se añadieron cantidades de CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub>, los cuales permitían en la adición de ambas sales, una mejor eficiencia en la producción de etanol, cuantificado por la producción de CO<sub>2</sub>.

#### **2.3.4 Tolerancia al estrés oxidativo**

Este tipo de estrés es uno de los principales a los que enfrentan las levaduras, particularmente durante el crecimiento aeróbico, debido a la reacción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) derivado del oxígeno, tales como los aniones de superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>), ya que estos compuestos se pueden generar por la respiración mitocondrial, por incremento de la tensión del oxígeno disuelto del medio de crecimiento o por exposición de radiación iónica.

Los compuestos ROS causan el daño oxidativo a proteínas, lípidos y al ADN (Moradas *et al.*, 1996) y muchas de las fuentes potenciales están relacionadas con la apoptosis (Figura 3). Los radicales hidroxilo reaccionan indiscriminadamente con la mayoría de los metabolitos y macromoléculas, en muchos casos que generan otros radicales en el proceso lo cual es una

reacción en cadena, dañando así una amplia gama de moléculas, incluyendo ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (Perrone *et al.*, 2008).



**Figura 3.** Posibles fuentes de ROS y su interacción con la célula. Las fuentes intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) que están involucrados en la apoptosis se encuentran marcados en rojo.

La cadena respiratoria en la mitocondria produce aniones superóxido que se convierten en  $H_2O_2$  por Sod2p en la matriz de la mitocondria o por Sod1p en el citosol y en el espacio entre la membrana mitocondrial. Ndi1p representa la NADH deshidrogenasa mitocondrial interna que transfiere electrones al complejo III de la cadena respiratoria. El factor inductor de apoptosis (Aif1p) está situado normalmente en la mitocondria y puede tener actividad antioxidante. Como parte del proceso de apoptosis, es Aif1p translocado al núcleo donde se inicia la rotura del ADN. La delección de la metacaspasa Yca1p de la levadura puede conducir a un aumento de daño inducido por ROS. Durante el plegamiento de proteínas, el enlace disulfuro de la proteína en la maquinaria del ER (retículo endoplásmico) produce  $H_2O_2$ . El peróxido de hidrógeno se desintoxica a agua por catalasas (Ctt1p y Cta1p) por enzimas dependientes de glutatión, incluyendo glutatión peroxidasas (GPXS), glutaredoxinas (Grxs) y glutatión transferasas (GST). En los últimos procesos reducida glutatión (GSH) se convierte a glutatión oxidado (GSSG). GSSG se reduce a GSH por la glutatión reductasa (Glr1p) usando NADPH como donante de electrones. Hidroxilo radical ( $\cdot OH$ ) se genera a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss. La dinámica de actina implica cambios en el citoesqueleto de actina, si se convierte a filamentos de actina estabilizados, conduce a una mayor acumulación de ROS (Tomado de Perrone, 2008).

A pesar de su potencial toxico, el oxígeno, durante los procesos de fermentación es importante, ya que es necesario para generar biomasa de levadura, en la síntesis de lípidos, esteroides y

ácidos grasos insaturados y es necesario para mantener la membrana plasmática. Sin embargo, la exposición excesiva de la levadura al oxígeno en el recipiente de fermentación puede resultar en un excesivo crecimiento de la levadura a expensas de la producción de etanol, además la teoría de los radicales libres del envejecimiento propone que los ROS (especies reactivas de oxígeno) se producen en condiciones aerobias y son la principal causa de envejecimiento celular, por tal motivo, se requieren niveles óptimos de oxígeno.

#### 2.3.4.1 Generación de ROS por compuestos químicos

Muchos compuestos químicos requieren activación metabólica para convertirse en reactivos intermedios y ejercer su toxicidad. Estos compuestos químicos se oxidan a reactivos intermedios debido a su estructura química. Los reactivos intermedios podrían ser radicales libres, los cuales tienen un electrón desapareado y pueden ser de carbón, nitrógeno u oxígeno. Una de las reacciones debido a su alta reactividad es la transferencia de electrones a oxígeno molecular, lo cual genera radicales superóxido (Cohen y D'Arcy, 1987), sin embargo, la principal amenaza para la célula es la transformación subsiguiente de  $O_2^{\cdot -}$  y  $H_2O_2$  a oxidantes más fuertes, en particular el radical hidroxilo, que es el radical más oxidante a surgir en sistemas biológicos (Thorpe *et al.*, 2013).

Algunos de los compuestos mencionados son benzoquinonas, paraquat, nitrofurantoína, entre otros y, muchos de ellos han sido implicados en la acción de una gama de estructuras y compuestos farmacológicos. Todos estos compuestos son reducidos por una célula reductasa utilizando equivalentes reductores NAD (P) H para llegar a formar el radical. Así, se establece un ciclo redox en el que cantidades desproporcionadas de NAD (P) H y oxígeno son utilizadas para las cantidades del químico presente. Este ciclo redox de químicos dejan “estrés oxidativo” y subsecuentemente la muerte celular por un mecanismo aun no muy claro (Cohen y D'Arcy, 1987), pero puede deberse a alteraciones en la homeostasis del calcio intracelular entre otros iones metales (Wu *et al.*, 2011).

El origen de la inhibición o retraso en las fermentaciones industriales se debe entre otras situaciones, al uso o la presencia de compuestos de estas estructuras químicas. Por ejemplo, en la elaboración del vino, se emplean compuestos antimicrobianos para lograr el control microbiológico y del mosto mediante la limitación y/o propagación de levaduras y bacterias indeseables, estos son el dióxido de azufre y oxiclورو de cobre (Fiore *et al.*, 2005); compuestos inhibitorios que tienen un impacto en la fermentación si las cepas no son tolerantes a estos compuestos (Vilela *et al.*, 2013).

Por otro lado, la hidrólisis de materiales lignocelulósicos que están presentes también en plantas de *Agave spp* (Huitrón *et al.*, 2008) al generar una amplia variedad de compuestos pueden ejercer una acción que contrarresta la eficiencia de los microorganismos en una fermentación (Palmqvist y Hahn, 2000). Algunos compuestos como ácidos alifáticos, furanos y compuestos fenólicos también están presentes durante la producción de bioetanol combustible (Piotrowski *et al.*, 2014), mismos que pueden ejercer un efecto inhibitor considerable en las fermentaciones de los hidrolizados lignocelulósicos, siendo los compuestos fenólicos de bajo peso molecular más tóxicos. Sin embargo, los mecanismos del efecto de inhibición de compuestos fenólicos como de los compuestos de furfural e HMF (Hidroxi metil furfural) aún no han sido elucidados (Palmqvist y Hahn, 2000). Sin embargo, en experimentos con tratamientos de compuestos furfural en células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha demostrado éstos inducen la acumulación de ROS causando daños celulares a mitocondrias, vacuolas, a la actina y a la cromatina nuclear (Allen *et al.*, 2010). Por su parte, la vainillina tiene un efecto en la activación transcripcional del factor Yap1, factor del estrés oxidativo lo cual indica la acumulación intracelular de ROS durante el tratamiento a las células de levadura (Nguyen *et al.*, 2014). Este compuesto actúa a una concentración baja, afectando componentes y funciones, causando graves daños en el ADN. Para poder elucidar la tolerancia Shen *et al.*, (2014) utilizó un conjunto de levaduras mutantes con deleciones de los genes que codifican las enzimas de biosíntesis de ergosterol, y observaron que el ergosterol es importante para mantener la fluidez y la estabilidad de la membrana para proteger a la célula de los efectos tóxicos de la vainillina.

De la misma manera, los compuestos de furano, furfural y 5-hidroximetilfurfural (HMF) inducen la acumulación de ROS en *S. cerevisiae* reducen la actividad enzimática y biológica, descomponen ADN, e inhiben la síntesis de ARN y de proteínas. Sin embargo, la tolerancia de furfural y HMF de *S. cerevisiae* se asocia principalmente con la capacidad de la cepa para transformar furfural y HMF en alcohol furfúrico menos tóxico y el 2,5-bis-hidroximetilfurano (Horváth *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2014)

### **2.3.5 Respuestas metabólicas al estrés oxidativo**

Se sabe que los radicales libres de oxígeno (ROS), en dosis bajas las células pueden adaptarse para ser más resistentes a una subsecuente exposición letal, en dosis altas las células activan funciones antioxidantes incluyendo un programa de la expresión génica de los factores de transcripción Yap1p y Msn2, y además el retraso de la división celular. En dosis aún mayores de ROS se produce la muerte celular por apoptosis y a dosis extremas las células mueren por

necrosis. El estrés oxidativo en condiciones normales es muy recurrente pero siempre regulado. El oxígeno se encuentra dentro de la célula en su formas más estable como  $(O_2)^2$ , sin embargo, en determinadas condiciones, principalmente por medio de reacciones bioquímicas redox llegan a producirse estas moléculas o radicales libres altamente reactivas (Zorrilla *et al.*, 2004), la más común producida por este mecanismo es el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), relativamente la más abundante y que es liberada de la cadena respiratoria mitocondrial; el peróxido de hidrógeno se produce durante la desintoxicación del anión superóxido catalizado por la superóxido dismutasa, es producido en la levadura durante la oxidación de ácidos grasos en el peroxisoma y de varias reacciones; el  $H_2O_2$  puede cruzar fácilmente la membrana celular, esta molécula no es relativamente muy reactiva, pero tiene efectos nocivos durante su conversión al radical hidroxilo, que si es extremadamente reactiva (Perrone *et al.*, 2008).

La diversidad de especies de ROS que se pueden generar en las células está acompañada por la variedad y complejidad de las respuestas celulares que conducen a la desintoxicación, la reparación del daño o el mantenimiento de homeostasis de iones metálicos. Las células de levadura producen un rango de metabolitos, o bien hidrófilos o lipófilos, con actividad antioxidante, así como muchas enzimas con funciones antioxidantes específicos, tales como el ácido D-eritroascórbico, la flavohemoglobina, el glutatión, las metalotioneínas, poliaminas, el ubiquinol, la trehalosa y ergosterol, además de algunos metabolitos carotenoides; las levaduras poseen enzimas que detoxifican el oxígeno activo, tales como la Cu/Zn superóxido dismutasa, Mn superóxido dismutasa, catalasa A, catalasa T, citocromo C, peroxidasa, glutatión reductasa, tiorredoxina, tiorredoxina peroxidasa y tiorredoxina reductasa (Krems *et al.* 1995; Jamieson, 1998; Gibson *et al.*, 2007; Herrero *et al.*, 2008; Kaino y Takai, 2008).

En varios casos existen dos o más genes que codifican estas funciones, con sus productos situados en compartimientos diferentes y/o regulados de diferentes formas. Se dice que esta lista está lejos de ser completa ya que se requieren al menos 450 genes para mantener la resistencia celular a estos ROS, la resistencia general al ataque de ROS está regulada por una combinación de estos factores, así que la delección de uno o cualquiera no conduce a la inviabilidad y solo en algunos casos provoca un fenotipo ligeramente sensible. Sin embargo, la supresión del gen SOD1 que codifica la citosólica Cu/Zn superóxido dismutasa conduce a una auxotrofia para varios aminoácidos debido a que daña el cluster Fe/S y además la delección súbita de este Sod1 ha probado formar parte de la respuesta adaptativa al estrés hiperosmótico (NaCl 1M, Sorbitol 2.2M), por otra parte la supresión de GSH1 requerido para la síntesis de glutatión da lugar a un acortamiento significativo de la vida útil de las células y aumento de la apoptosis celular (Perrone *et al.*, 2008).



### 3. JUSTIFICACIÓN

En el laboratorio de Biotecnología Industrial se cuenta con una colección de levaduras que fueron aisladas originalmente de mostos de mezcal en la Sierra de San Carlos (Tamaulipas). Estos mostos de mezcal son un sistema de fermentación complejo, primero, por la composición física del sustrato (líquidos y fibras de agave) y segundo, por la composición química del mosto (altas concentraciones de fructosa producto de hidrólisis de inulina, compuestos de Maillard, compuestos lignocelulósicos, furfural, entre otros). Debido al importante origen de aislamiento, las cepas han sido analizadas y caracterizadas con respecto a la producción de etanol, a la tolerancia al estrés osmótico (concentraciones de azúcares) y al estrés por etanol; de este modo las levaduras con características importantes se han ido seleccionando para estudios posteriores y/o usos industriales. Así mismo, se han elucidado algunas respuestas al estrés por temperatura por ejemplo, la floculación.

Sin embargo, estas levaduras no se han caracterizado con respecto al estrés por compuestos fenólicos y azufrados, compuestos clave para su futura aplicación en mostos agro-industriales mediante la caracterización de su crecimiento, producción de metabolitos primarios y secundarios incluyendo enzimas involucradas en la actividad de tolerancia de dichos compuestos inhibitorios en las etapas de fermentación para la producción de bebidas alcohólicas o a partir de mostos de agave y de uva, o de residuos lignocelulósicos para la producción de bioetanol.

## 4. HIPÓTESIS

Las levaduras con tolerancia a compuestos fenólicos y a compuestos azufrados poseen un mejor desempeño metabólico.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general:

Caracterizar la tolerancia al estrés de las levaduras de la colección del LBI-CBG a compuestos fenólicos y a compuestos azufrados.

#### 5.1.1 Objetivos particulares:

1. Cuantificación de la tolerancia a compuestos azufrados de la colección de levaduras.
2. Cuantificación de la tolerancia a compuestos fenólicos de la colección de levaduras.
3. Caracterizar el metabolismo en cepas tolerantes a compuestos azufrados y fenólicos
4. Determinar los polimorfismos de los genes codificantes de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa en cepas tolerantes a compuestos fenólicos y azufrados.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Material biológico

Las cepas utilizadas son representativas de la diversidad de levaduras que se encuentran en la fermentación del mezcal en Tamaulipas (México) y pertenecen a las especies de *S. cerevisiae* (12 aislamientos), *Kluyveromyces marxianus* (3 aislamientos), *Torulaspota delbrueckii* (3 aislamientos), *Pichia* spp. (3 aislamientos de diferentes especies), *Candida parapsilosis*, *Clavispora lusitanae.*, y *Zygosaccharomyces bailii*.

Las 24 cepas de levadura que se utilizaron pertenecen a la colección del LBI-CBG aisladas de mezcal, estas se encontraban conservadas a 60% de glicerol a -70 °C. La cepa comercial de vino *Saccharomyces cerevisiae* Fermichamp (DSM Food Specialties BV, Países Bajos) fue utilizada como control.

### 6.2 Condiciones de crecimiento

A partir de los stocks conservados, las cepas de levadura fueron crecidas en placas de agar YPD que contienen 1% extracto de levadura, 2% de peptona, 2% D-glucosa, más 2% de agar bacteriológico (Difco™ YPD Broth) y se incubaron a 30 °C durante 24 hrs h. Una asada de este pre-cultivo se utilizó como inóculo para el medio YPD líquido, que se incubó durante 20 hrs. (*Saccharomyces*) y de 15-18 hrs (No-*Saccharomyces*) a 30 °C con agitación a 250 rev/min. La densidad óptica (D.O) de los cultivos se determinó a 600 nm y la concentración inicial de inóculo se ajustó a una D. O de 0.5 de absorbancia con solución salina estéril (9 g/L de NaCl) para todos los experimentos de tolerancia en placa.

Para los experimentos de tolerancia en cultivo líquido (fermentación), se utilizaron las condiciones mencionadas anteriormente y se ajustó a una D.O. de 0.05 de absorbancia.

### 6.3 Medición de la tolerancia al estrés por SO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Para la prueba de tolerancia a SO<sub>2</sub> en medio sólido, se preparó una solución Stock de 20 000 ppm con Metabisulfito de Potasio de Sigma Aldrich P2522 (5 g de Metabisulfito de Potasio disueltos en 250 mL de agua miliQ) el cual fue esterilizado por filtración con filtros de 0.45 µm micras de diámetro. A partir del stock, se prepararon diferentes concentraciones de YPD Agar (50g/L YPD, 20g/L agar) con 100 hasta 1300 ppm de SO<sub>2</sub> liberado del Metabisulfito de potasio en el medio sólido y además se prepararon cajas tomadas como control (sin SO<sub>2</sub>). Las cajas de agar fueron selladas con Parafilm M™ hasta su uso.

Mientras que para el acondicionamiento de las cajas agar con Peróxido de hidrógeno (Sigma Aldrich V00194) se preparó una solución stock a una concentración de 1M (8.503 g de Peróxido de Hidrógeno aforado en 250 mL con agua miliQ estéril) el cual fue tomado para preparar un segundo stock, a una concentración de 100 mM con la fórmula  $C_1V_1=V_2C_2$  que se procedió a esterilizar con filtros de 0.45  $\mu$ m. Las concentraciones de Peróxido de Hidrógeno en YPD Agar con fueron desde 0 (caja control) hasta 30 mM.

La medición de la tolerancia al estrés se llevó a cabo recuento de colonias en placa (De la Torre *et al.*, 2016). Se tomó un inóculo inicial de D. O. de 0.5 de absorbancia, posteriormente se realizaron diluciones de 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000, y una gota de un volumen de 10 microlitros para cada dilución fue colocada en las cajas previamente preparadas, las cuales contenían las condiciones estresantes de SO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los experimentos se realizaron por triplicado, con una doble repetición por caja para cada concentración. Las placas fueron selladas nuevamente con Parafilm para evitar la pérdida de los compuestos por volatilización y se llevaron a incubación a 30°C por 24 horas. Sin embargo, el registro de colonias se llevó a cabo hasta que las colonias fueran contables.

Los datos de tolerancia fueron graficados por la disminución en el crecimiento por medio de UFC/mL durante el aumento de las concentraciones del SO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Con la finalidad de seleccionar cepas representativas en alta, media y baja tolerancia a SO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las cepas se clasificaron de acuerdo al número de células viables en cada rango de concentración.

#### **6.4 Tolerancia al estrés por compuestos fenólicos durante las fermentaciones**

Las fermentaciones se realizaron en un medio llamado M2 (Oliva Hernández, 2012), el cual es preparado con Extracto de levadura (1g/L); Fosfato de potasio monobásico, KH<sub>2</sub>PO (5 g/L); Sulfato de magnesio, MgSO<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>7</sub>, (0.4 g/L); Sulfato de amonio, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.4 g/L), Glucosa (10 g/L), Fructosa (90 g/L) disueltos en agua desionizada que fue esterilizado previamente para su inoculación. Se utilizaron además los compuestos vainillina (Sigma Aldrich V1104) y furfural (Sigma Aldrich 185914) para determinar la tolerancia en cada fermentación, concentraciones desde 0.5, 1, 1.5 y 2 g/L con vainillina y 1, 1.5, 3 g/L en el caso de furfural.

Las fermentaciones se llevaron a cabo en tubos “minibioreactores” con un volumen de 20 mL del medio M2, los tubos se incubaron a 30 °C con agitación a 300 rpm y cada experimento se realizó

por triplicado. La fermentación se monitoreó cada 24 horas y además para cada punto de monitoreo se cuantificó el azúcar residual, así como la biomasa producida.

### **6.5 Cuantificación de la producción de CO<sub>2</sub>**

La fermentación fue monitoreada por el seguimiento de la producción de CO<sub>2</sub> por litro que se obtuvo por la diferencia del peso inicial del medio M2 y el peso obtenido a través del tiempo. Se consideró la pérdida de peso debida a la evaporación por el orificio en la tapa de ventilación que es de 0.0034 g/h.

### **6.6 Cuantificación de la biomasa**

La biomasa fue cuantificada como peso seco centrifugando 2 mL de cada muestra en un tubo Eppendorf que fue previamente pesado; el sobrenadante fue colectado para el análisis de DNS (Wood *et al.*, 2012), y los tubos que contenían el precipitado se colocaron dentro de una estufa de secado a una temperatura de 50°C y se mantuvieron durante toda la noche para obtener un producto precipitado seco, después se colocaron en un desecador de vidrio de sílica gel durante al menos 30 minutos y después se pesaron.

La producción de biomasa fue calculada como la diferencia de los pesos del tubo dividido entre el volumen de la muestra que fue centrifugada. Se tomaron dos muestras de cada uno de los tres tubos para minimizar el error.

### **6.7 Cinética de crecimiento**

La cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas fue monitoreada por el conteo celular total en Cámara Neubauer y fue comparada con la viabilidad en a lo largo de la fermentación, y ésta fue realizada por el método de microgota en placa, los resultados fueron graficados como se muestra en la figura 13.

### **6.8 Cuantificación de azúcares reductores**

A partir del sobrenadante de cada una de las muestras, se analizaron los azúcares reductores obtenidos al final de cada fermentación, la cuantificación de estos azúcares fueron llevados a cabo bajo el método del ácido 2-dinitrosalícilico, DNS (Wood *et al.*, 2012). Para el uso de éste

método analítico indirecto se construyó una curva de calibración mostrada en el APÉNDICE I, los datos de regresión lineal fueron utilizados para interpolar los datos obtenidos de las muestras.

### **6.9 Diseño de oligonucleótidos para fragmentos de los genes Superóxido dismutasa (SOD1 y SOD2) y Catalasa (CAT1 y CTA2)**

Se realizó la búsqueda de la secuencia de aminoácidos para las proteínas SOD y CTA de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* S288C en la base de datos de la plataforma del NCBI disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Una vez obtenida las secuencias de aminoácidos se realizó la búsqueda de al menos 15 secuencias homólogas en especies de hongos que tuvieran el porcentaje más alto de identidad y después se obtuvieron las secuencias de nucleótidos.

En base al alineamiento múltiple realizado en el Software BioEdit bajo el método progresivo Clustal W, se observaron las regiones conservadas que presentaron las 15 secuencias, sin embargo, el diseño de oligonucleótidos se realizó con degeneraciones utilizando las secuencias alineadas de *Saccharomyces cerevisiae* S288C y *Torulaspota delbrueckii* CBS 1146.

Los oligonucleótidos se diseñaron para cubrir aproximadamente 500 pb de cada gen cubriendo las regiones de interés para analizar posteriormente en la secuenciación.

### **6.10 Extracción del ADN genómico**

La extracción del ADN Genómico para las cepas *Saccharomyces cerevisiae* (ScFermichamp, Sc3D4, ScMsc3, Sc3Y8) y *Torulaspota delbrueckii* (Td1AN9 y Td1AN2) se realizó mediante el protocolo de Fenol-Cloroformo (Raeder y Broda, 1985) con pequeñas modificaciones: de un volumen de 4 mL de medio de crecimiento fue centrifugado a 14 000 rpm durante 10 minutos para obtener la biomasa celular. La biomasa se mantuvo en congelación a -70 °C. Se agregó a temperatura ambiente 0.5 mL de buffer de extracción TA (200 mM Tris HCl, pH 8.25, 250 mM NaCl, 25 Mm EDTA, 0.5 % SDS) y se procedió a homogeneizar con 0.5 g de perlas de vidrio dando vortex durante 20 segundos y fue incubado 10 minutos a temperatura ambiente. A lo anterior se añadieron 0.5 mL de Fenol- Cloroformo 25/25 frío y se mezcló en vortex a velocidad máxima durante 5 minutos y posteriormente se centrifugó a 13 000 rpm por 30 minutos. La fase acuosa se colocó en un tubo nuevo, y se adicionaron 0.4 mL de cloroformo frío el cual se homogeneizó en vortex a máxima velocidad por 1 minuto y posteriormente se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante de esta mezcla fue transferido en un tubo nuevo en donde se le adicionó 1.5 µL de RNA asa (10mg/mL) y se incubó por 30 minutos a 37 °C. Se adicionaron 0.5 mL de Isopropanol frío (4 °C), se mezcló por inversión ligera y se incubó a -20 °C durante 15 minutos, pasando este tiempo se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 minutos. El

sobrenadante se desechó para se añadió a la pastilla 0.5 mL de Etanol frío (70%), me mezcló por inversión ligera y se centrifugó a 13 000 rpm por 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar en papel absorbente por 30 minutos. Una vez seca, la pastilla se re-suspendió con 50 µL de agua miliQ estéril a -20 °C.

Se comprobó la integridad del ADN extraído mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa 1% a 80 volts durante 45 minutos en una cámara de electroforesis horizontal utilizando una fuente de poder en solución TAE 1X. La visualización del ADN genómico se llevó a cabo en un equipo transiluminador con luz UV adaptado a un fotodocumentador Kodak y finalmente la concentración y pureza del ADN se obtuvo mediante la cuantificación de las muestras en el espectrofotómetro NANODROP 2000 (Wilmington, Delaware USA, 2009). Las muestras de ADN genómico se ajustaron a una concentración Stock de 100 ng/µl para su utilización en la amplificación de los genes.

### 6.11 Amplificación por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se empleó para la amplificación del fragmento de gen que codifica para la enzima Superóxido dismutasa. El ADN de las cepas ScFermichamp, Sc3D4, ScMsc3 y Sc3Y8 fue utilizado como templado y se emplearon los oligonucleótidos SOD1 y CTA1 diseñados y los propuestos por Raimondi *et al.* (2008), DegSod1F y DegSod1R. Las condiciones fueron: 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2µM de cada primer, Buffer 1X, 0.08µ de dNTPs, 0.04 U Taq ADN polimerasa, para un volumen final de 25µL con agua mQ estéril en el siguiente programa: 1 ciclo de 5 minutos a 94 °C; 35 ciclos de 95 °C/ 1 minuto, 55 °C 1minuto, 72 °C 1 minuto, y finalmente un paso de extensión final 1 minuto a 72 °C. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Multigene™ Mini.

Para la amplificación de fragmentos en los cuales los oligonucleótidos diseñados mostraron baja especificidad, se utilizó el protocolo de purificación de bandas de gel (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System).de Promega, dicho protocolo se menciona el APÉNDICE VI.

### 6.12 Secuenciación y análisis del gen SOD

Los fragmentos amplificados por PCR una vez que ya habían sido purificados se procedió a su secuenciación utilizando el secuenciador automático de capilar ABI Prism (Applied Biosystem Modelo 3130) con los siguientes oligonucleótidos: DegSOD1-F (5' AGCTTATGGTTMATGCAGTYGCAGTK) Forward y DegSOD1-R (5'

AGCTTTTAGTTRGAKAKACCAATRACA) para el reverse. Los productos de PCR purificados fueron nuevamente amplificados utilizando la siguiente reacción: 4 µl de Buffer big dye v 3.1 (5X), 1 µl de iniciador, 4 µl de Big dye v 3.1 *ready mix*, 2 µl del producto de PCR, 9 µl de agua esteril milliQ para un volumen final de 20 µl. Las condiciones de PCR fueron: 1 ciclo de 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C/ 1 minuto, 55 °C 1minuto, 72 °C 1 minuto, y finalmente un paso de extensión final 1 minuto a 72 °C para los 26S y 60 °C durante 4 min. La reacción de secuenciación fue purificada con el protocolo del kit de purificación X-Terminator y posteriormente fueron secuenciadas en el Área de Servicios del CBG. Las reacciones de secuenciación se realizaron por triplicados para cada Iniciador.

Una vez obtenidas las secuencias, se obtuvieron las secuencias consenso de cada muestra en el Software Clone Manager Professional Suite Versión 8.0 y posteriormente se realizó un alineamiento global para para la comparación de secuencias (polimorfismos).

### 6.13 Cuantificación de peróxido de hidrógeno

La cuantificación de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) fue determinado de acuerdo a la metodología de Martins *et al.*, (2014), para cada punto de la fermentación bajo estrés y midiendo su respectivo control. El contenido de peróxido de hidrógeno se llevó a cabo pesando 70 mg de peso fresco (0.07 g FW) de células de levadura, el cual se llevó a homogeneizar con 2mL de ácido tricloroacético (0.1% w/v), esta mezcla se centrifugó a 9000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, una cantidad de 0.25 mL de sobrenadante se mezcló con 0.25 mL de Buffer de fosfatos (10 mM, pH=7) y se añadió 0.50 mL de KI (1M). Después de la homogenización, la absorbancia de esta mezcla fue medida a 390 nm (UV/VIS espectrofotometer, Modelo Optizen Pop). El peróxido de hidrógeno fu cuantificado utilizando una curva de calibración con concentraciones conocidas de peróxido de hidrógeno que iban desde 0.01–0.46 Mm ( $y = 0.7214x + 0.0012$   $R^2 = 0.9998$ ), ver el APÉNDICE III. Los resultados se expresaron en µmol/g de FW (peso fresco).

### 6.14 Cuantificación de proteína

El método de Bradford se utilizó para la cuantificación de proteínas en el extracto enzimático extracelular y en los concentrados de proteína SOD y CAT. El método Bradford se fundamenta en la fijación del colorante Azul de Coomasie (Fast Blue B) a las proteínas, dando lugar a un cambio en el color que puede ser medido en un espectrofotómetro. Para el uso de esta metodología fue necesario construir una curva de calibración de concentración conocida con BSA (Suero de Albúmina Bovina) misma que se muestra en el APENDICE II.



La muestra de extracto enzimático crudo se obtuvo a partir de un volumen de 4 mL de medio de cultivo el cual llevado a centrifugación 7500 rpm utilizando un rotor JA-30-50, una temperatura de 4 °C durante 15 minutos.

### **6.15 Evaluación de la actividad enzimática SOD y CAT**

La actividad enzimática de las enzimas Sod y Cat fue evaluada siguiendo el protocolo de los Kits para pruebas enzimáticas Catalase Assay Kit Cat. 707002 y Superóxido Dismutase Assay Kit Cat. 706002 (Cayman Chemical Company), los cuales se muestran en el APÉNDICE IV y V.

Para la evaluación de las actividades enzimáticas de ambas enzimas, una unidad de enzima superóxido dismutasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para exhibir el 50% de la dismutación del radical superóxido. Para el uso de este kit, la actividad SOD se normaliza utilizando el ensayo acoplado al citocromo c y a la xantina oxidasa. Por otra parte, una unidad de actividad catalasa se define como la cantidad de enzima que causará la formación de 1,0 mol de formaldehído por minuto a 25°C.

#### **6.15.1 Preparación de las muestras**

Para la realización de la prueba de actividad enzimática, se colectaron células recién cosechadas por centrifugación a partir de un volumen de 4 mL, 1000- 2000 g (3206 a 4534 rpm) durante 10 min a 4 °C. Para la realización del ensayo de la actividad catalasa, el pellet celular se homogeneizó en 2 mL de Buffer frío (50Mm de fosfato de potasio, pH 7, 1 mM d EDTA), se añadieron perlas de vidrio de 0.1 mm de diámetro a esta mezcla y se llevó a vortex durante 3 minutos. El resultado de esta mezcla fue llevado a centrifugación a 10 000 g (10, 139 rpm) durante 15 minutos, 4 °C. Finalmente el sobrenadante se almacenó a -80 °C para posteriormente realizar el ensayo enzimático.

Para la realización del ensayo de la actividad Superóxido dismutasa el pellet celular se homogeneizó en 2 mL de Buffer frío HEPES 20 mM, ph 7.2 (1 mM de EGTA, 210 mM de manitol y 70 mM de sacarosa) y se añadieron perlas de vidrio de 0.1 mm de diámetro a esta mezcla y se llevó a vortex durante 3 minutos. Esta mezcla se llevó a centrifugar a 1,500 g (3 927 rpm) por 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante de esta mezcla se almacenó en congelación a -80 °C. Antes de la realización del ensayo, la enzima Sod1 se separó por centrifugación a 10, 000 g (10 139 rpm) durante 15 minutos a 4° C. El sobrenadante contenía la enzima citosólica (Sod1).

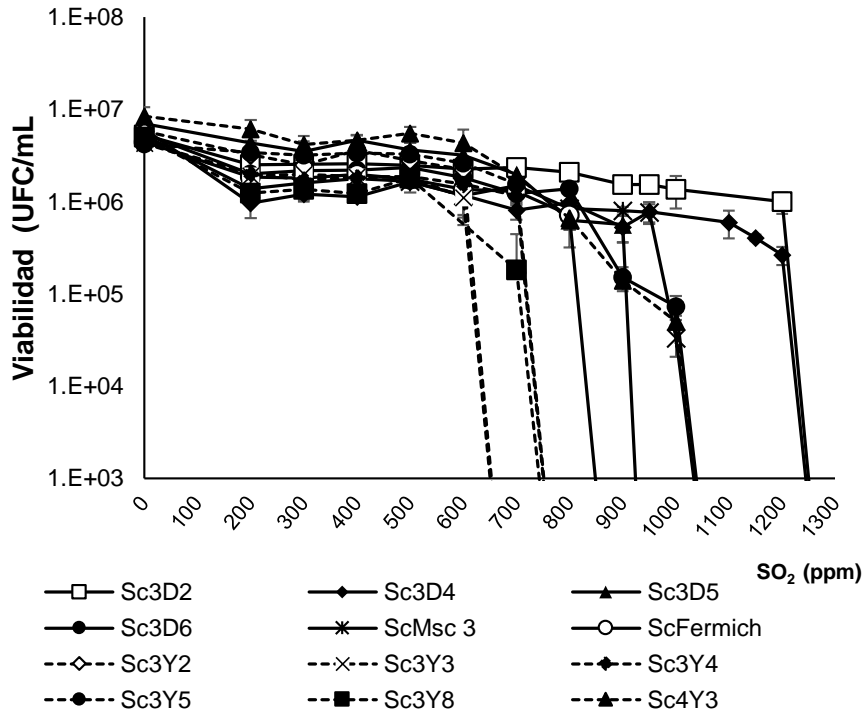
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Tolerancia al estrés por SO<sub>2</sub>

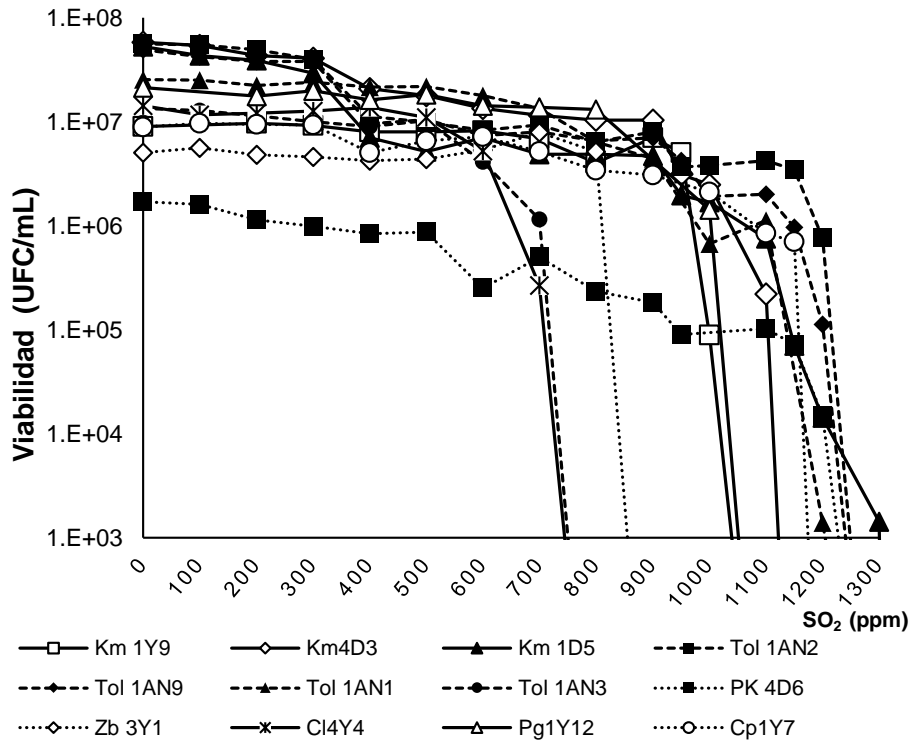
Durante el crecimiento, las cepas de la colección del LBI (*Saccharomyces* y *no - Saccharomyces*) y bajo las condiciones de estrés por el compuesto azufrado se pudo observar que, las cepas expuestas a concentraciones mayores a 600 ppm crecieron hasta las 48 horas, en comparación al crecimiento en concentraciones menores las cuales crecieron a las 24 horas después de su incubación. En las Figuras 4 y 5 se observa que a medida que las cepas de levaduras eran crecidas a concentraciones mayores de SO<sub>2</sub>, la viabilidad de las células disminuía desde  $1 \times 10^8$  hasta  $1 \times 10^5$  UFC/mL.

Para la tolerancia a SO<sub>2</sub>, las 25 cepas utilizadas en los experimentos de tolerancia mostraron ser capaces de crecer a todas las concentraciones reportadas por Fioré *et al.*, (2005), que van de 0, 100, 200 y 300 ppm de SO<sub>2</sub>, en donde las levaduras aisladas de la producción de mezcal y tequila fueron tolerantes hasta 300 ppm, comparadas con otras cepas comerciales que toleraron como máximo 200 ppm de SO<sub>2</sub>.

Las cepas de levadura *Saccharomyces* presentaron tolerancias máximas de 600 y 1000 ppm lo cual se observa en la Figura 4. Mientras que las tolerancias máximas para las cepas *no-Saccharomyces* fueron de hasta 700- 1200 ppm, como se observa en las Figura 5. Así mismo, cinco cepas mostraron ser tolerantes hasta 1200 ppm de SO<sub>2</sub> (*Saccharomyces*: Sc3D2, Sc3D4, ScMsc1 y *no-Saccharomyces*: Km1D5, Td1AN1).



**Figura 4.** Tolerancia cuantificada por medio de la viabilidad de las cepas de *S. cerevisiae* a concentraciones crecientes de dióxido de azufre en el medio.



**Figura 5.** Tolerancia cuantificada por medio de la viabilidad de las cepas no-*Saccharomyces* a concentraciones crecientes de dióxido de azufre en el medio.

Las cepas de levadura fueron clasificadas como de tolerancia alta, media y baja tal como se observa a continuación en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Clasificación de las cepas de levadura por su tolerancia a los diferentes valores de concentración de SO<sub>2</sub>.

Valor límite de referencia (ppm SO <sub>2</sub> )	Tolerancia	Cepas	
		<i>Saccharomyces</i>	No- <i>Saccharomyces</i>
≥1000	Alta	Sc3D2, Sc3D4, Msc1	Km4D3, Km1D5, Td1AN2, Td1AN9, Td1AN1, Pg1Y12, Cp1Y7
≤800	Media	Sc3D3, Sc3D5, ScMsc3, ScMsc6, Fermichamp, Sc4Y3	Km1Y9, Zb3Y1, Pk4D6
≤600	Baja	Sc3Y2, Sc3Y3, Sc3Y4, Sc3Y8	Pm1AN3

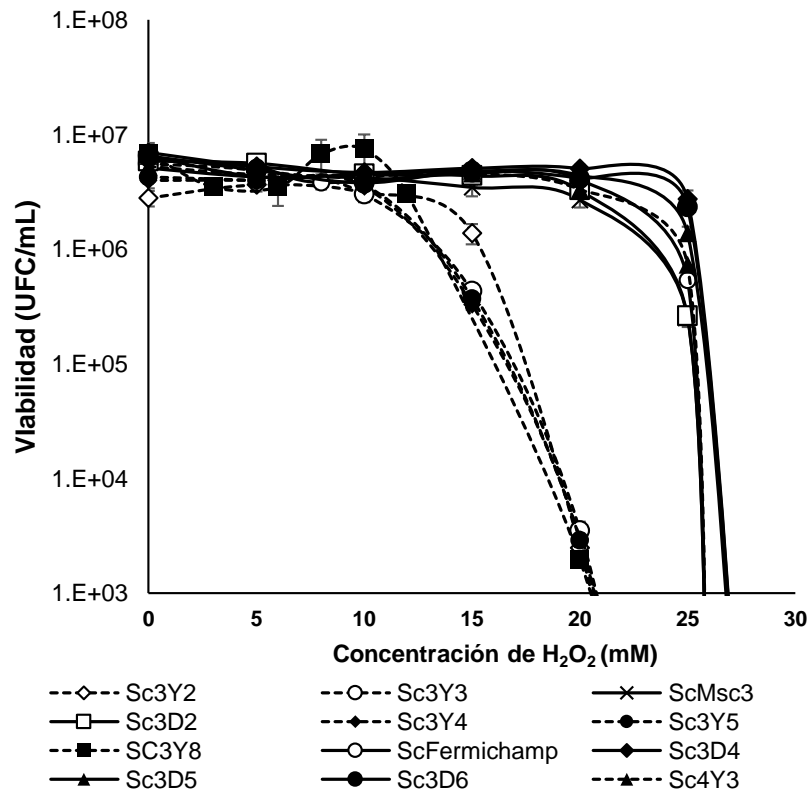
Como puede observarse, las cepas formaron tres grupos de acuerdo a su nivel de tolerancia de SO<sub>2</sub>. En el nivel de tolerancia mínimo, es decir, las cepas que toleran durante su crecimiento hasta una concentración de 600 ppm de SO<sub>2</sub> son las *Saccharomyces* (Sc3Y2, Sc3Y3, Sc3Y4, Sc3Y8) y dentro de las no-*Saccharomyces* sólo se agrupó la cepa Pm1AN3. Mientras que el grupo formado por las cepas *Saccharomyces*: Sc3D3, Sc3D5, ScMsc3, ScMsc6, la cepa control ScFermichamp, Sc4Y3 y No-*Saccharomyces*: Km1Y9, Zb3Y1, Pk4D6 fueron tolerantes para crecer bajo el tratamiento con SO<sub>2</sub> con un límite máximo de 800 ppm y formaron el grupo de tolerancia media. Finalmente, un tercer grupo formado por las cepas *Saccharomyces* (Sc3D4, Sc3D2, Msc1) y No-*Saccharomyces* (Km4D3, Km1D5, Td1AN2, Td1AN9, Td1AN1, Pg1Y12, Cp1Y7) fueron tolerantes hasta 1000 ppm de SO<sub>2</sub> durante su crecimiento, y este grupo es considerado de tolerancia alta.

Tal como se muestra en la Figura 4, las cepas *Saccharomyces* mostraron comportamientos de tolerancia a SO<sub>2</sub> a varios rangos de concentración, en comparación a las cepas no-*Saccharomyces* (Figura 5). Por otro lado, las diferencias de capacidad de tolerancia entre géneros y especies de levadura fueron mucho más comunes, por ejemplo, la cepa Pm1AN3 de baja tolerancia que sólo fue tolerantes hasta 600 ppm, comparada con la cepa Pg1Y12 del mismo género (que fue tolerante hasta 1000 ppm de SO<sub>2</sub>, sin embargo, las tres cepas de *Torulasporea*

*delbrueckii* mostraron uniformidad de agrupamiento respecto a su capacidad de tolerar hasta 1000 ppm de SO<sub>2</sub>, a diferencia de las cepas *Saccharomyces*.

## 7.2 Tolerancia al estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Para la tolerancia a peróxido de hidrógeno, los datos fueron graficados por la disminución en el crecimiento por medio de UFC/mL durante el aumento de la concentración del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, los cuales se muestran de forma general en dos gráficas *Saccharomyces* (Figura 6) y No-*Saccharomyces* (Figura 7).

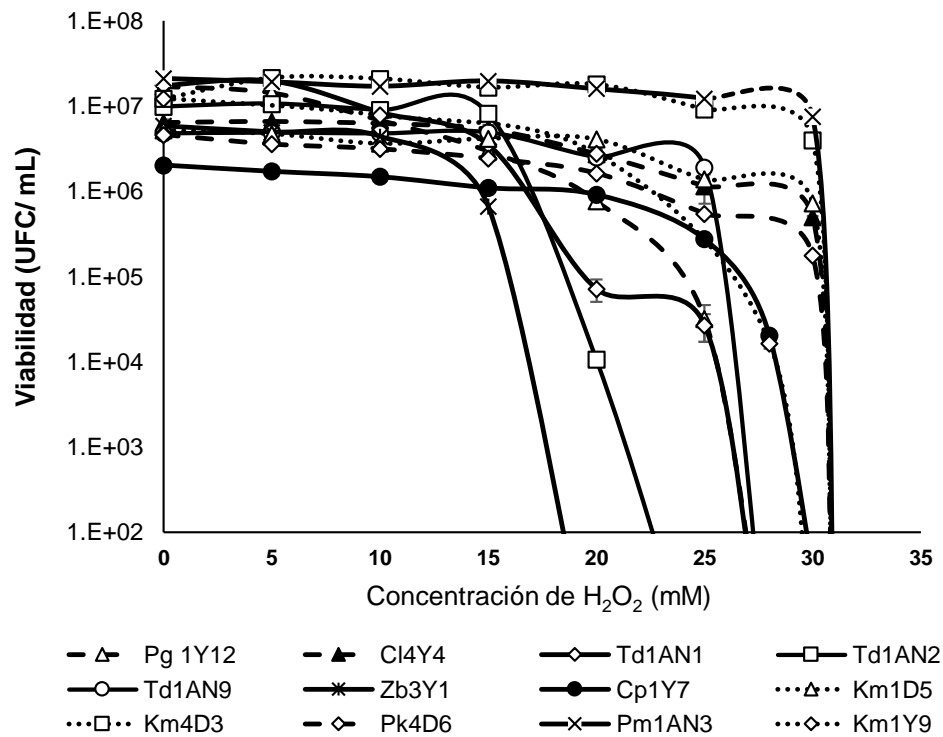


**Figura 6.** Tolerancia evaluada como viabilidad de las cepas de *S. cerevisiae* a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno en el medio sólido. Las cepas fueron incubadas a 30°C por 24 h y el conteo de colonias se realizó al finalizar este tiempo o hasta que las colonias fueron contables.

El comportamiento de las cepas *Saccharomyces*, siguió una notable formación de dos grupos de tolerancia bajo el crecimiento con peróxido de hidrógeno, el primero, cepas con tolerancia hasta una concentración de 20 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el segundo grupo, cepas con capacidad de tolerar concentraciones mayores a 25 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Para todas las cepas el 100 % de viabilidad era el obtenido en la caja control, es decir cuando el peróxido no estaba presente durante el crecimiento, y que corresponde al primer punto graficado. Así, el efecto del oxidante fue dependiente de la dosis ya que la viabilidad disminuyó a medida que se aumentaba la concentración, además también depende de la robusticidad de la cepa a tolerar las concentraciones mayores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por ejemplo, las levaduras Sc3Y3, Sc3Y5 y Sc3Y4 fueron tolerantes hasta 15 mM y tuvieron viabilidades menores al 10%, excepto la Sc3Y2, que mostró una viabilidad del 50%.

Por otro lado, las levaduras del grupo de tolerancia de 20 mM comprendían viabilidades desde un 44 a 75%, sin embargo a medida que la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue mayor a 20 Mm, las viabilidades reducían hasta un 4% y 40% en algunos casos.



**Figura 7.** Tolerancia evaluada como viabilidad de las cepas no-*Saccharomyces* a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno en el medio sólido. Las cepas fueron incubadas a 30°C por 24 h y el conteo de colonias se realizó al finalizar este tiempo o hasta que las colonias fueron contables.

Mientras que el comportamiento de las cepas *no-Saccharomyces* siguieron otro perfil, en donde las cepas fueron tolerantes a distintos rangos de concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 7), sin embargo, para incluir en los grupos de tolerancia a las cepas *Saccharomyces* y *no-Saccharomyces*, se tomaron criterios de clasificación como puede observarse en la Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Clasificación de las cepas de levadura por su nivel de tolerancia a los diferentes rangos de concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

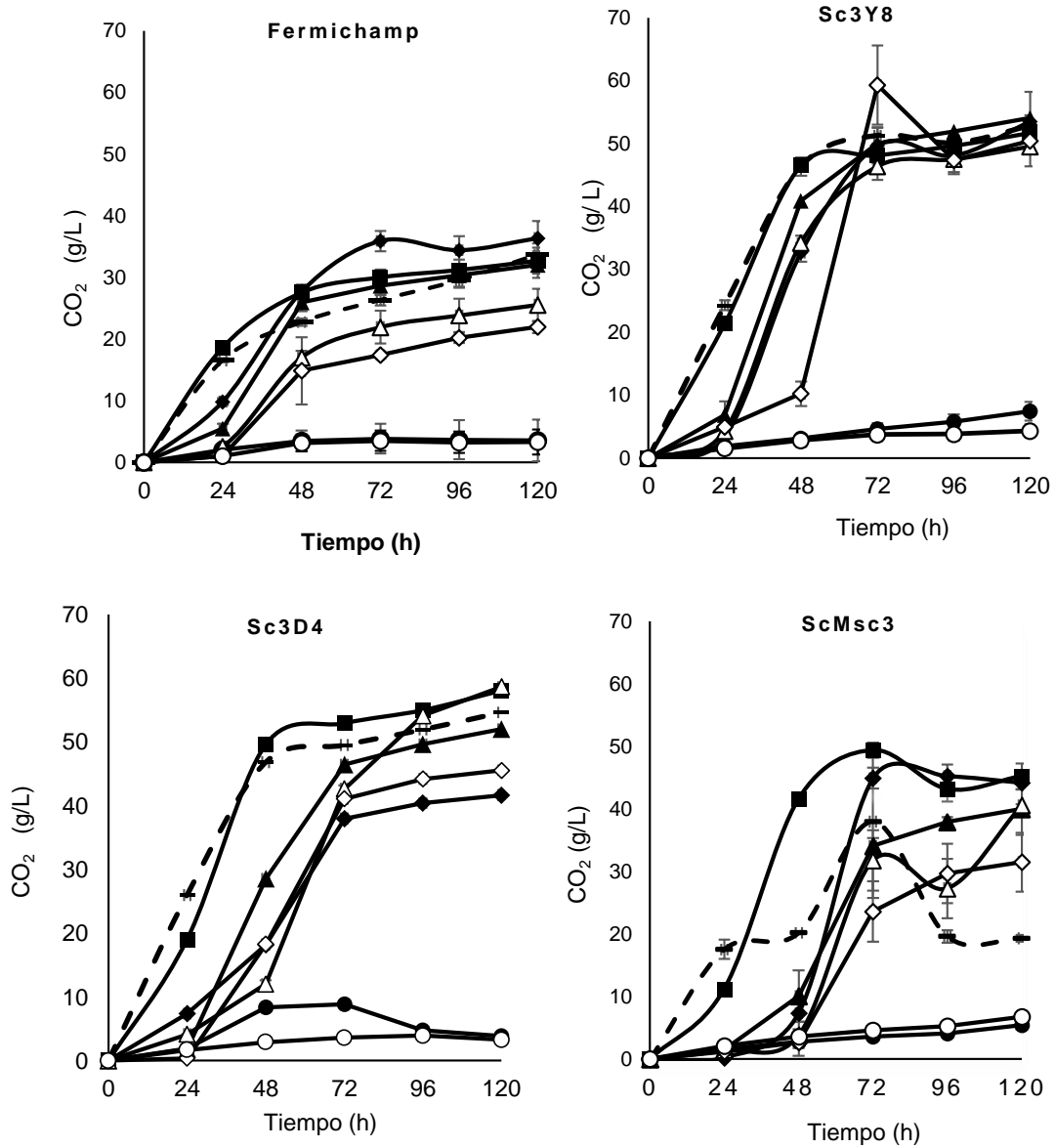
Valor límite de referencia de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)	Tolerancia	Cepas	
		<i>Saccharomyces</i>	<i>No-Saccharomyces</i>
≥25	Alta	ScMsc3, Sc4Y3, Sc3D2, Sc3D4 Sc3D5, Fermichamp	Td1AN9, Km4D3, Km1D5, Pm1AN3, Pg1Y12, Cp1Y7, Pk4D6
≤20	Media	Sc3D6, Sc3Y8	Km1Y9
≤15	Baja	Sc3Y2, Sc3Y3 Sc3Y4, Sc3Y5,	Td1AN1, Td1AN2, Zb3Y1

Al final de los experimentos de estrés por compuestos azufrados y a peróxido, se seleccionaron 7 cepas, las de máxima tolerancia (Sc3D4, Fermichamp, Sc3Y8, ScMsc3 y Td1AN9) y las de tolerancia baja (Pm1AN3 y Td1AN2). Para la selección de estas cepas se tomaron criterios como productividad de etanol de acuerdo a los trabajos previamente realizados en el LBI.

### 7.3 Tolerancia al estrés por compuestos fenólicos durante las fermentaciones

La tolerancia de las levaduras a diferentes concentraciones de vainillina y furfural, fue medida de acuerdo a la producción de CO<sub>2</sub> por litro, (Figura 8), posteriormente se calculó el porcentaje de inhibición en la producción de CO<sub>2</sub>, en el consumo y en la producción de biomasa (Figura 9), en donde el 100% es el máximo porcentaje de inhibición, el 0% significa que las cepas no tuvieron grados de inhibición para los tres parámetros evaluados y por debajo del 0% significó el favorecimiento de los parámetros evaluados.

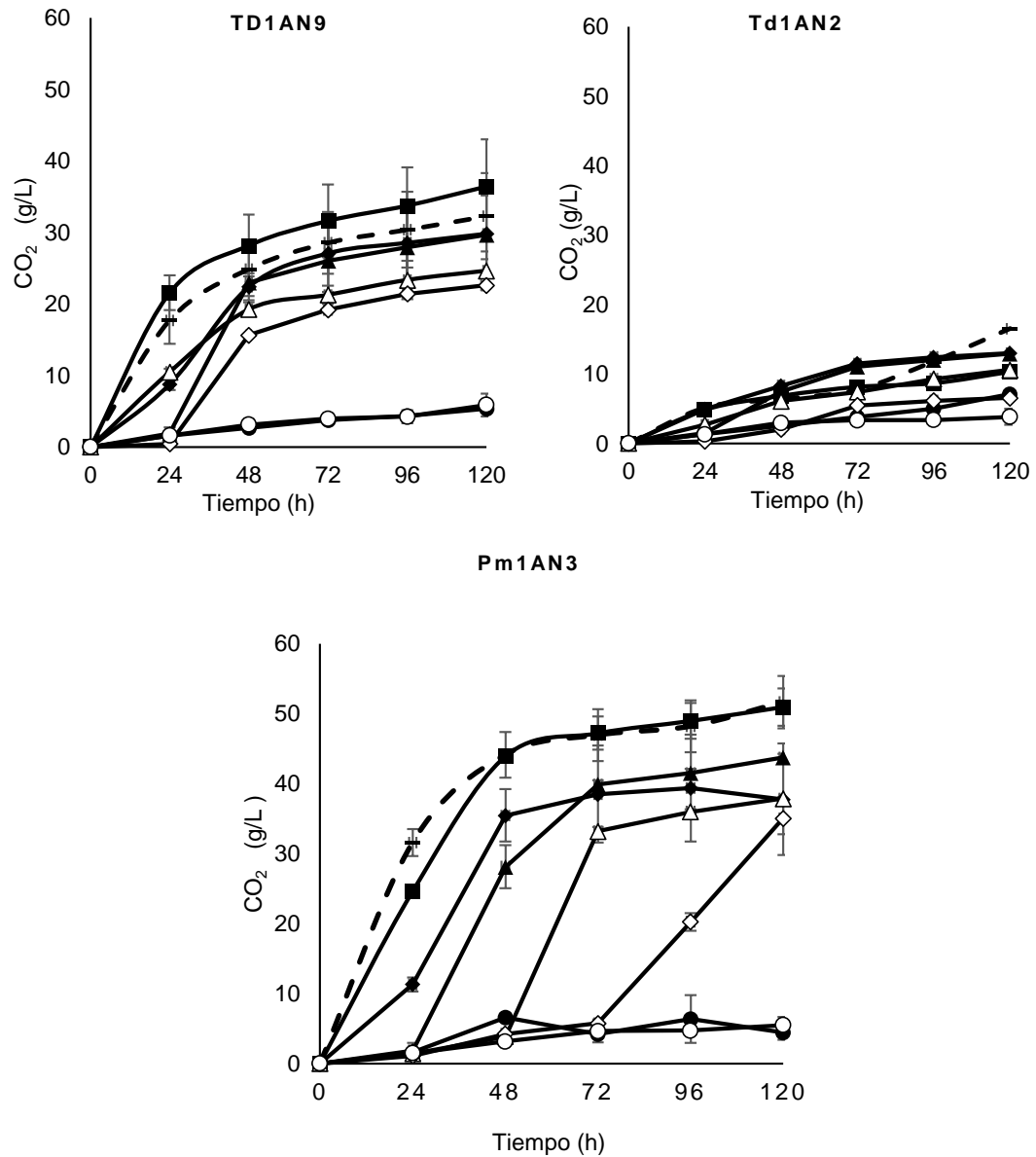
Panel A



**Figura 8.** Medición de la tolerancia a vainillina y furfural de las siete cepas seleccionadas (panel A, *S. cerevisiae*; panel B, *no-Saccharomyces*) evaluado mediante seguimiento de la producción de CO<sub>2</sub> durante la fermentación en el medio M2, 100 g L<sup>-1</sup> (G/F 1:9): - - - -Control, -■- 0.5, -▲- 1.0, -◆- 1.5, -●- 2.0 g/L de vainillina; -Δ- 1.0, -◇- 1.5, -○- 3.0 g/L de furfural.



Panel B



**Continuación Figura 8....** Medición de la tolerancia a vainillina y furfural de las siete cepas seleccionadas (panel A, *S. cerevisiae*; panel B, *no-Saccharomyces*) evaluado mediante seguimiento de la producción de CO<sub>2</sub> durante la fermentación en el medio M2, 100 g L<sup>-1</sup> (G/F 1:9): - - - -Control, -■- 0.5, -▲- 1.0, -◆- 1.5, -●- 2.0 g/L de vainillina; -Δ- 1.0, -◇- 1.5, -○- 3.0 g/L de furfural.

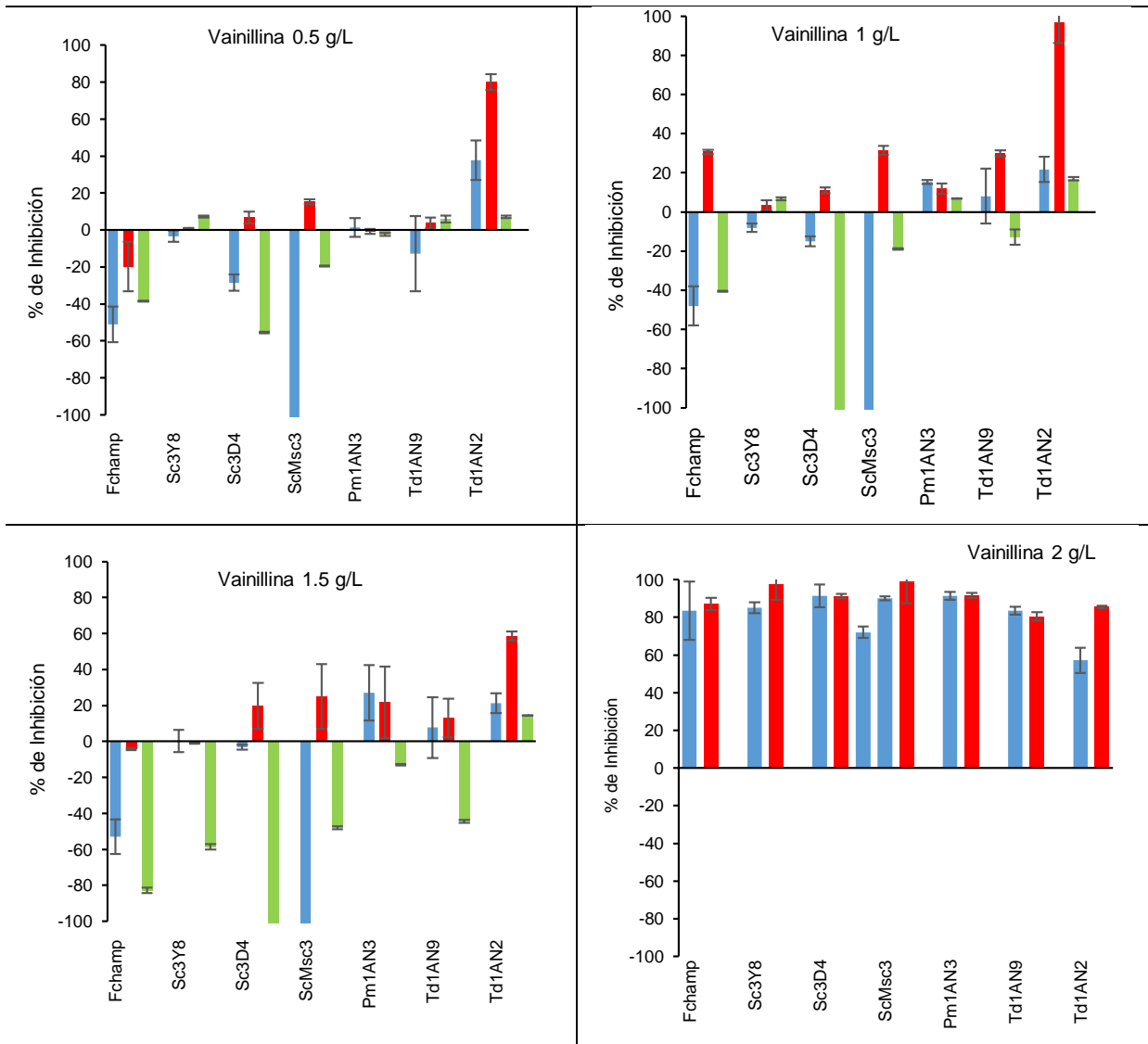
De acuerdo con los perfiles de producción final de CO<sub>2</sub>, las siete cepas seleccionadas fueron tolerantes a concentraciones por debajo de 2 y 3 g/L con vainillina y furfural respectivamente. Mientras que, para concentraciones mayores a estas, en todas las cepas evaluadas no existió actividad metabólica en la producción final de dióxido de carbono. De este modo, a las concentraciones de los compuestos evaluados se les confirió una característica como de concentración de inhibición máxima (2 y 3 g/L), concentración de inhibición media (1.5 g/L) y de concentración de inhibición baja o nula (menores a 1.5 g/L). Se observó que la evaluación de la fermentación con concentraciones bajas de vainillina, las cepas Fermichamp (ésta a concentración de inhibición media), Sc3Y8, ScMsc3 y Td1AN9 aumentaron ligeramente su producción de dióxido de carbono comparando el control. Sin embargo, no sucedió lo mismo en la evaluación de la fermentación a concentraciones bajas con furfural con excepción de Sc3D4 quien mostró el mismo comportamiento de las cepas anteriormente mencionadas.

También se observó que a concentraciones medias con los compuestos vainillina y furfural, en las cepas Sc3D4, Td1AN9, Td1AN2, Pm1AN3 y Fermichamp con furfural, la producción final de dióxido de carbono se redujo ligeramente. Durante el monitoreo, se observó un fenómeno de retraso en la producción de CO<sub>2</sub> principalmente en la fase lag o de adaptación para casi todas las cepas tolerantes evaluadas mayormente concentraciones medias de ambos compuestos. Por ejemplo, en las fermentaciones evaluadas con vainillina con las cepas Fermichamp, Td1AN9 y Pm1AN3 la producción máxima de CO<sub>2</sub> fue hasta 48 horas después de la inoculación y en las cepas Sc3D4, ScMsc3 y Sc3Y8 después de 72 horas, mientras que con la cepa Td1AN2 no mostró esta etapa de retraso. Con la adición de furfural al medio de fermentación se mostraron comportamientos similares, por ejemplo, la producción máxima de CO<sub>2</sub> en las cepas Td1AN9 y Pm1AN3 fue después de las 48 horas, en las cepas Sc3Y8 y Sc3D4 después de las 72 horas y ScMsc3 a las 96 horas de su inoculación.

A lo largo de las fermentaciones se observaron diferentes fenómenos en la producción de CO<sub>2</sub>, como lo descrito anteriormente, sin embargo, la producción final de CO<sub>2</sub> en las diferentes condiciones de estrés para algunas cepas fue muy similar a los controles, como puede observarse en el cuadro 4. Con respecto a la producción de biomasa, las cepas No-*Saccharomyces* produjeron mayor cantidad de biomasa (hasta 6 g/L en peso seco) en comparación a las *Saccharomyces* (hasta 4 g/L en peso seco) datos que se muestran en el mismo cuadro (Cuadro 4). Durante las fermentaciones, la producción de biomasa total final de las cepas con la adición de los compuestos furfural y vainillina no se vio afectada, a excepción de las cepas (ScMsc3 y Td1AN9) en donde se observó que la biomasa incrementaba con la adición de furfural y vainillina al final de la fermentación.

Con los datos de la producción final de dióxido de carbono, biomasa y consumo de azúcares en cada una de las cepas se logró obtener los porcentajes de inhibición para cada concentración de los compuestos que se utilizaron en este trabajo y de esta forma se puede comparar entre cepa los grados de inhibición, los cuales se observan en las Figura 9 y 10.

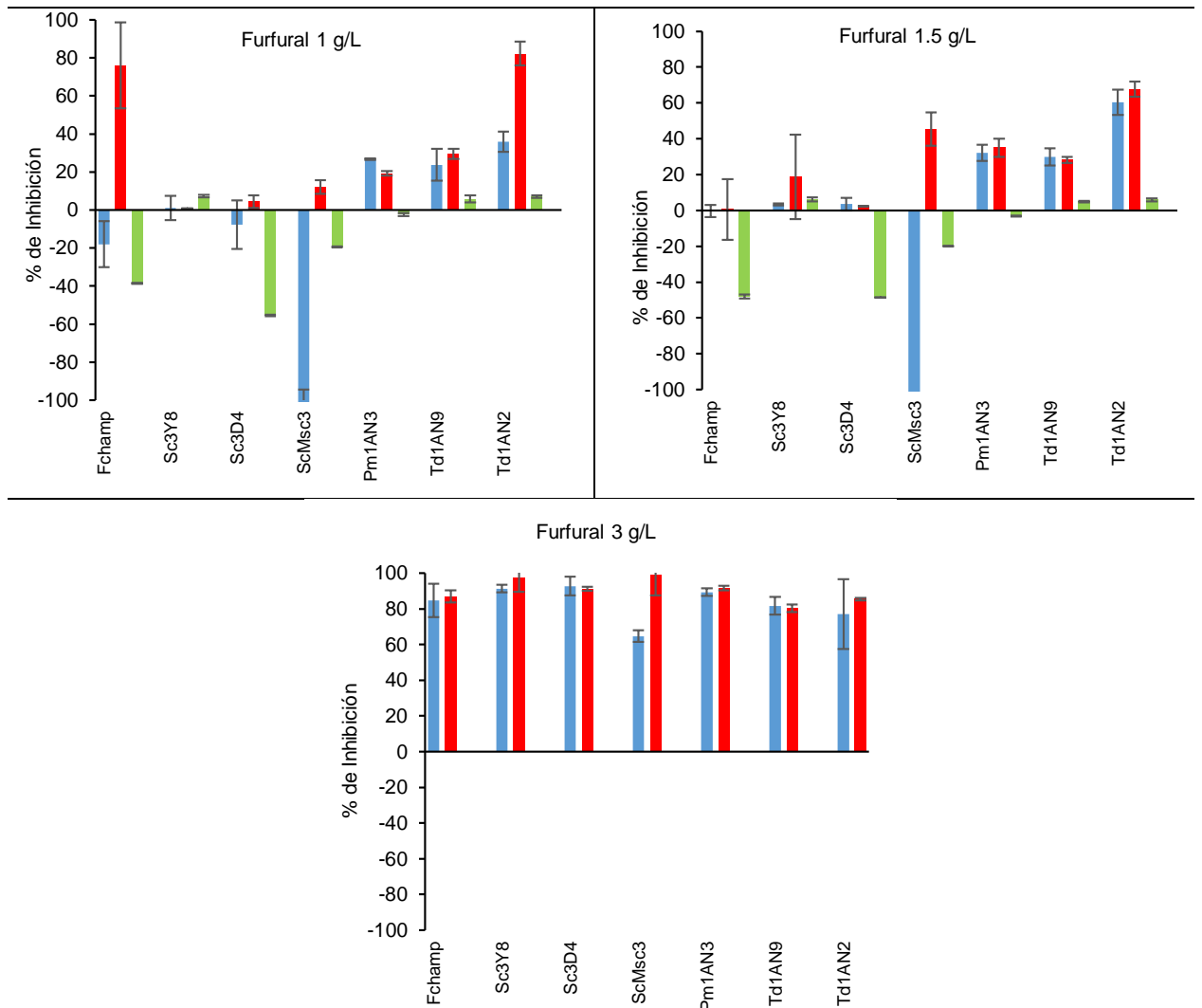
Panel A



**Figura 9.** Porcentajes de inhibición del crecimiento de las 7 cepas de levaduras seleccionadas causados por las diferentes concentraciones de vainillina (panel A) y furfural (panel B), sobre la producción de CO<sub>2</sub> (barra azul), consumo de azúcares (barra roja) y biomasa final producida (barra verde).

El porcentaje de inhibición en la producción de dióxido de carbono estuvo directamente relacionado con el consumo de azúcares. Generalizando, se encontró que las cepas más tolerantes evaluadas a todas las concentraciones con vainillina y furfural fueron ScMsc3, Sc3D4, Fermichamp y Sc3Y8 (con alrededor del 10% de inhibición o un desarrollo en la producción de CO<sub>2</sub>) y las cepas que mostraron menos tolerancia a concentraciones de vainillina y furfural fueron Td1AN2, Td1AN9 y Pm1AN3 (hasta con 40% de inhibición).

Panel B



**Continuación Figura 9.....** Porcentajes de inhibición del crecimiento de las 7 cepas de levaduras seleccionadas causados por las diferentes concentraciones de vainillina (panel A) y furfural (panel B), sobre la producción de CO<sub>2</sub> (barra azul), consumo de azúcares (barra roja) y biomasa final producida (barra verde).

**CENTRO DE BIOTECNOLOGÍA GENÓMICA – INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

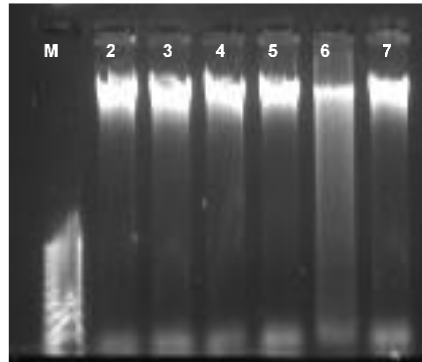
**Cuadro 4.** Valores finales (120 h) de producción de CO<sub>2</sub>, azúcares residuales y biomasa (peso seco) obtenidos en el medio M2 (100 g/L azúcares totales, G/F 1:9) para las 7 cepas seleccionadas *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces* creciendo con diferentes concentraciones de furfural y de vainillina.

Cepas	Control (g/L)	Furfural			Vainillina			
		1.0	2.0	3.0	0.5	1.0	1.5	2.0
		(g/L)						
CO <sub>2</sub> (g/L)								
Fermichamp	21.68 ± 0.29	25.58 ± 2.61	21.75 ± 0.76	3.31 ± 2.04	32.72 ± 2.08	32.08 ± 2.17	33.14 ± 2.09	3.56 ± 3.37
Sc3Y8	50.31 ± 0.12	49.53 ± 3.17	39.86 ± 11.96	4.31 ± 1.08	51.69 ± 1.57	54.09 ± 1.10	49.89 ± 3.13	7.46 ± 1.49
Sc3D4	45.19 ± 0.35	58.64 ± 14.90	45.54 ± 1.38	3.28 ± 2.38	58.05 ± 2.05	51.96 ± 1.12	46.60 ± 0.63	3.85 ± 2.73
ScMsc3	19.32 ± 0.56	40.58 ± 3.04	40.96 ± 1.99	6.82 ± 0.64	45.25 ± 2.05	39.99 ± 0.81	44.20 ± 1.08	5.40 ± 0.59
Pm1AN3	49.79 ± 3.62	37.86 ± 0.25	35.05 ± 2.28	4.72 ± 0.61	50.94 ± 2.67	43.73 ± 0.50	37.72 ± 7.97	4.44 ± 1.06
Td1AN9	28.30 ± 1.29	24.61 ± 2.71	22.61 ± 1.56	5.88 ± 1.59	36.40 ± 6.58	29.66 ± 4.53	29.78 ± 5.48	5.32 ± 0.71
Td1AN2	16.52 ± 1.18	10.59 ± 0.88	6.55 ± 1.17	3.80 ± 3.22	10.29 ± 1.76	12.93 ± 1.07	13.01 ± 0.90	7.08 ± 1.10
Azúcar residual (g/L)								
Fermichamp	48.94 ± 4.60	79.07 ± 22.59	41.84 ± 1.65	105.35 ± 3.33	40.03 ± 1.72	50.77 ± 1.18	29.91 ± 2.13	105.35 ± 3.33
Sc3Y8	0.73 ± 0.73	1.90 ± 0.09	1.30 ± 0.25	113.56 ± 8.2	2.12 ± 0.14	4.29 ± 2.63	1.27 ± 0.27	113.56 ± 8.20
Sc3D4	1.37 ± 0.29	4.83 ± 3.31	2.41 ± 1.46	106.18 ± 1.07	6.98 ± 3.17	10.97 ± 1.57	1.38 ± 0.24	106.18 ± 1.07
ScMsc3	40.19 ± 1.31	14.24 ± 3.57	9.56 ± 1.48	115.10 ± 11.4	17.24 ± 1.45	31.95 ± 2.24	2.63 ± 1.81	115.10 ± 11.41
Pm1AN3	7.92 ± 2.31	24.53 ± 1.23	36.23 ± 5.03	107.37 ± 1.31	7.33 ± 1.37	18.11 ± 2.65	25.45 ± 19.91	107.37 ± 1.31
Td1AN9	39.56 ± 6.20	55.69 ± 2.67	53.39 ± 1.75	101.31 ± 2.14	41.66 ± 2.92	55.85 ± 1.51	45.98 ± 10.70	101.31 ± 2.14
Td1AN2	69.92 ± 3.24	91.24 ± 6.35	84.74 ± 4.30	102.02 ± 0.71	90.69 ± 4.32	94.69 ± 10.14	83.04 ± 2.42	102.02 ± 0.71
Biomasa (g/L)								
Fermichamp	4.37 ± 0.16	6.40 ± 0.50	5.25 ± 0.62	ND	8.48 ± 2.02	9.55 ± 0.18	6.12 ± 0.08	ND
Sc3Y8	4.17 ± 0.66	4.50 ± 0.25	4.87 ± 1.19	ND	4.48 ± 0.37	5.58 ± 0.83	4.52 ± 0.17	ND
Sc3D4	4.12 ± 0.16	4.80 ± 0.83	4.38 ± 0.06	ND	4.37 ± 0.20	5.30 ± 0.40	4.83 ± 0.30	ND
ScMsc3	3.77 ± 0.17	5.68 ± 0.70	5.72 ± 0.21	ND	5.08 ± 0.86	5.23 ± 0.06	5.75 ± 0.88	ND
Pm1AN3	6.18 ± 0.08	6.05 ± 0.25	6.88 ± 0.73	ND	6.13 ± 0.29	7.98 ± 1.48	6.47 ± 1.10	ND
Td1AN9	8.52 ± 1.04	7.48 ± 0.62	8.47 ± 0.81	ND	7.52 ± 0.83	12.80 ± 1.39	7.58 ± 1.14	ND
Td1AN2	6.12 ± 1.76	6.92 ± 1.86	6.02 ± 0.17	ND	8.30 ± 3.91	10.62 ± 0.84	6.98 ± 0.47	ND

ND, no determinado

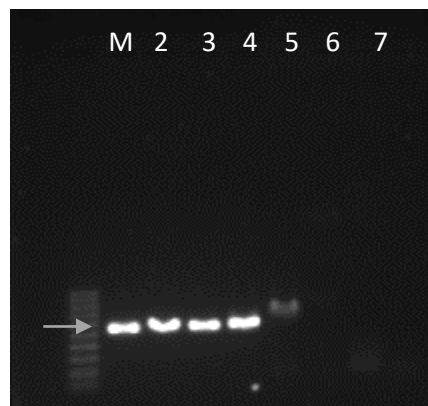
#### 7.4 Extracción y amplificación de ADN

Una vez seleccionadas las cepas de las especies a analizar durante este estudio se procedió a realizar la extracción de ADN, la integridad del ADN se puede apreciar en la figura 10, por lo que se prosiguió a la realización de los análisis.



**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa de la extracción de ADN de las levaduras en estudio. En los carriles del 2 al 5 se muestra el ADN de las levaduras de la especie *S. cerevisiae* (2: Fermichamp, 3: Sc3D4, 4: ScMsc3 y 5: Sc3Y8), mientras que en el carril 6 y 7 ADN de las levaduras de la especie *T. delbrueckii* (6: Td1AN9 y 7: Td1AN2).

En la Figura 11 se muestran los resultados de la amplificación por PCR del gen Sod1 con un tamaño de 465 pb. Cabe destacar que no se logró la amplificación del gen Sod1 para la cepa Td1AN2 (carril 7) debido a la baja especificidad de los iniciadores utilizados.



**Figura 11.** Amplificación del gen del gen Sod1. En el primer carril el marcador de peso molecular de 100 pb, del carril 2 al 5 la amplificación del gen Sod1 de las levaduras de la especie *S. cerevisiae* (2: Fermichamp, 3: Sc3D4, 4: ScMsc3 y 5: Sc3Y8) y en el carril 6 la amplificación del gen Sod1 para la levadura de la especie *T. delbrueckii* (Td1AN9) y en el carril 8 el control negativo (agua).

### 7.5 Determinación de polimorfismos en el gen Sod1

El gen Sod1 se amplificó mediante el uso de iniciadores previamente reportados para las especies de *Saccharomyces cerevisiae*. Las secuencias obtenidas para las cuatro cepas (Fermichamp, 3D4, Msc3 y 3Y8) contenían un marco de lectura abierto (ORF) de 465 pb que codifica una proteína 154 aminoácidos con una masa molecular calculada de 15.882 Da y un punto isoeléctrico de 6,39. Las secuencias aminoacídicas se compararon (Figura 12) con la secuencia del gen Sod1p de la cepa *Saccharomyces Cerevisiae* S288c y el análisis mostró una fuerte identidad del 99% para todas las cepas comparadas en este análisis. Sod1p de las cepas evaluadas contenía residuos de Histidina muy conservados (H-47, H-49, H-64, H-72, H-81, y H-121) que participan en la interacción con los cofactores metálicos y que son esenciales para la actividad y el plegamiento de todas las enzimas Sod1, además, los residuos que participan en interacciones críticas estaban presentes en las posiciones adecuadas: el residuo aspártico D-84 involucrado en enlace de  $\text{Cu}^{2+}$ , el residuo de arginina R-144 que participa en la dirección del sustrato al sitio activo, y los dos residuos de cisteína C-58 y C-147, que participan en la formación de un enlace disulfuro. En la región N-terminal, todas las cepas evaluadas presentaron una histidina H-3 en lugar de glutamina Q-3, en la región C-terminal, las cepas Sc3Y8, Fermichamp y ScMsc3 presentaron una serina S-153 en lugar de una treonina T-153 como en las cepas S288c y Sc3D4.

			10	20	30	40	50	60	
			..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	
gi 330443638:623014-622550_Sac	1		MVQAVAVLKG	DAGVSGVVKF	EQASESEPTT	VSYEIAGNSP	NAERGFHIHE	FGDATNGCVS	
Sc3D4	1		MVHAVAVLKG	DAGVSGVVKF	EQASESEPTT	VSYEIAGNSP	NAERGFHIHE	FGDATNGCVS	
Sc3Y8	1		MVHAVAVLKG	DAGVSGVVKF	EQASESEPTT	VSYEIAGNSP	NAERGFHIHE	FGDATNGCVS	
ScFermichamp	1		MVHAVAVLKG	DAGVSGVVKF	EQASESEPTT	VSYEIAGNSP	NAERGFHIHE	FGDATNGCVS	
ScMsc3	1		MVHAVAVLKG	DAGVSGVVKF	EQASESEPTT	VSYEIAGNSP	NAERGFHIHE	FGDATNGCVS	
				70	80	90	100	110	120
				..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
gi 330443638:623014-622550_Sac	61		AGPHFNPFKK	THGAPTDEVR	HVGDMGNVKT	DENGVAKGSF	KDSLKLIIGP	TSVVGRSVVI	
Sc3D4	61		AGPHFNPFKK	THGAPTDEVR	HVGDMGNVKT	DENGVAKGSF	KDSLKLIIGP	TSVVGRSVVI	
Sc3Y8	61		AGPHFNPFKK	THGAPTDEVR	HVGDMGNVKT	DENGVAKGSF	KDSLKLIIGP	TSVVGRSVVI	
ScFermichamp	61		AGPHFNPFKK	THGAPTDEVR	HVGDMGNVKT	DENGVAKGSF	KDSLKLIIGP	TSVVGRSVVI	
ScMsc3	61		AGPHFNPFKK	THGAPTDEVR	HVGDMGNVKT	DENGVAKGSF	KDSLKLIIGP	TSVVGRSVVI	
				130	140	150			
				..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	
gi 330443638:623014-622550_Sac	121		HAGQDDLKGG	DTEESLKTGN	AGPRPACGVI	GLTN			
Sc3D4	121		HAGQDDLKGG	DTEESLKTGN	AGPRPACGVI	GLTN			
Sc3Y8	121		HAGQDDLKGG	DTEESLKTGN	AGPRPACGVI	GLSN			
ScFermichamp	121		HAGQDDLKGG	DTEESLKTGN	AGPRPACGVI	GLSN			
ScMsc3	121		HAGQDDLKGG	DTEESLKTGN	AGPRPACGVI	GLSN			

**Figura 12.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las cepas *S. cerevisiae* de la colección LBI-CBG evaluadas contra la secuencia de *S. cerevisiae* S288c.

## 7.6 Caracterización metabólica en cepas seleccionadas

Una vez que se obtuvieron las secuencias aminoacídicas de las cepas de especies *Saccharomyces cerevisiae*, cuatro cepas *Saccharomyces cerevisiae* fueron evaluadas por su productividad de CO<sub>2</sub> en la cinética de fermentación en medio M2 con concentraciones finales de 1.5 g/L con vainillina y furfural, se completó la cinética de crecimiento celular y se monitoreó el consumo de azúcares a lo largo de la fermentación. Los resultados de la evaluación se muestran en los apartados siguientes. Los datos de la producción de dióxido de carbono fueron incluidos en la Figura 8.

### 7.6.2 Cinética de crecimiento

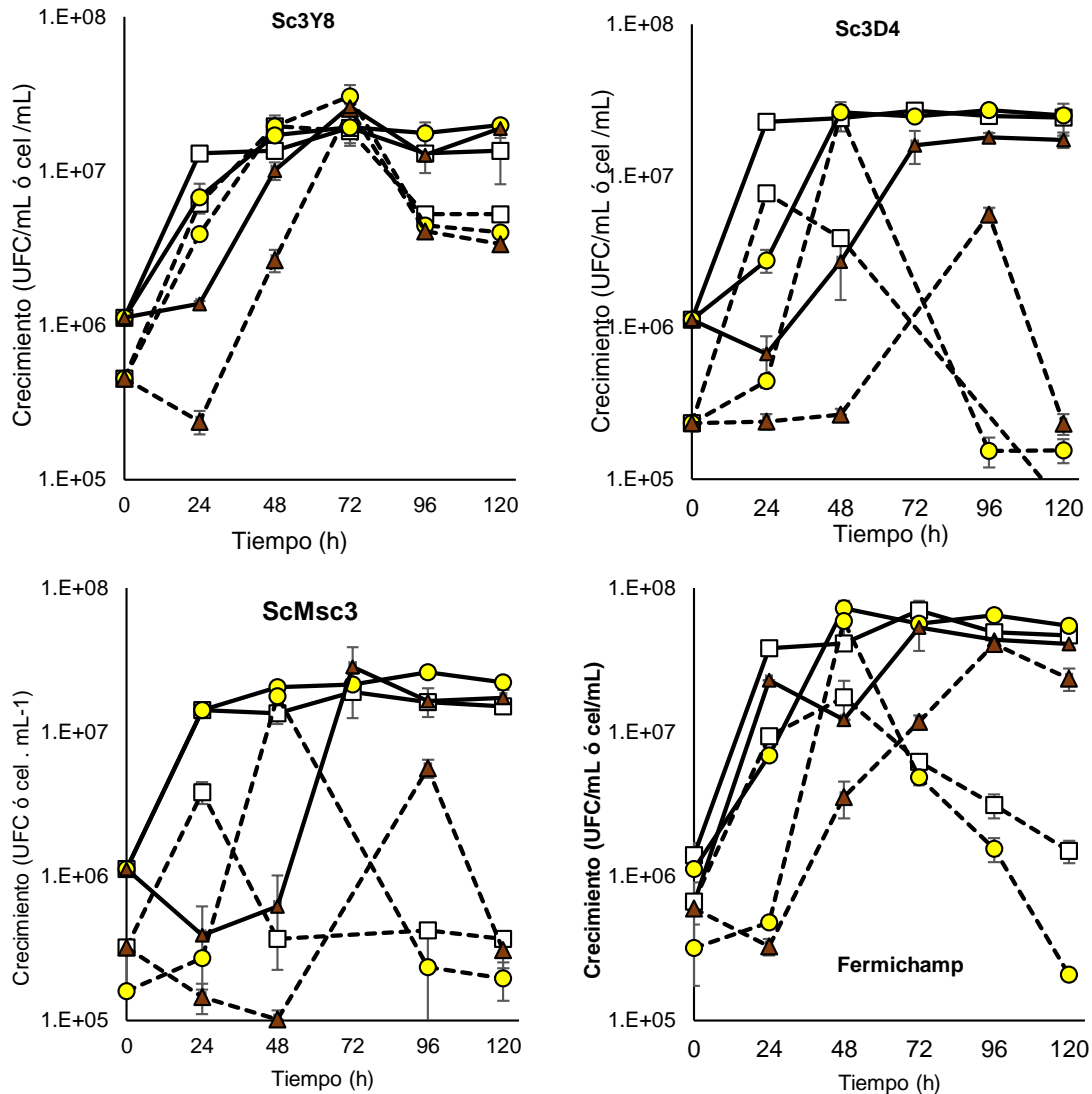
Se compararon las cinéticas de crecimiento de las cuatro cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (3D4, Msc3, Fermichamp y 3Y8) cuando fueron evaluadas sobre el medio M2 (G/F 1:9) y en los medios con vainillina y furfural ambos a concentraciones finales de 1.5 g/L. Como se mencionó en anteriormente, el crecimiento se monitoreó durante toda la fermentación, es decir, hasta las 120 horas de cultivo.

En las cinéticas de las cuatro cepas que se muestran en la Figura 13, en el medio M2 (control) se observaron las típicas 4 fases de la curva de crecimiento microbiano. Sin embargo, la fase de retraso no fue observada debido a la distancia entre los puntos monitoreados (c/ 24 horas). Por lo tanto, la fase exponencial de crecimiento se observó desde las primeras horas hasta las 24 horas, y finalmente, la fase estacionaria a partir de las 24 horas de fermentación, la cual correspondió al agotamiento de los azúcares del medio. Es importante recalcar que en las tres cepas se alcanzó una alta población de aproximadamente  $2 \times 10^7$  cel/mL, y de  $4 \times 10^7$  cel/mL para la cepa control Fermichamp, siendo esta concentración en los dos medios de fermentación (vainillina y furfural) probados.

Por otra parte, se observó que el crecimiento de las cepas en el medio M2 con estrés a furfural y vainillina en la fase lag o de adaptación fue prolongada a distintas horas para ambos compuestos. Por ejemplo, con la adición de furfural, la fase lag en la cepa Sc3Y8 a un tiempo de 48 horas, la cepa Sc3D4 y ScMsc3 a un tiempo de 72 horas, y caso contrario de Fermichamp, en el que sólo se observó un menor número de células. Mientras que solo el crecimiento en la fase lag de la cepa Sc3D4 con la adición vainillina se prolongó hasta 48 horas ya que en el crecimiento de las cepas Sc3Y8, ScMsc3 y Fermichamp, la fase de adaptación no fue prolongada con la adición de vainillina.



Finalmente, fue posible medir la viabilidad de las cuatro cepas a lo largo de la fermentación mediante la técnica de microgota. El número de células viables durante el experimento fue menor al número total de células con respecto al control, y además, la viabilidad de las cuatro cepas redujo en los medios M2 con ambos compuestos. Sin embargo, la viabilidad de las cepas en el medio de fermentación con furfural generalmente era más baja en comparación con la viabilidad durante la fermentación con vainillina, además de que en la fase de adaptación el número de células viables redujo considerablemente para las cuatro cepas.

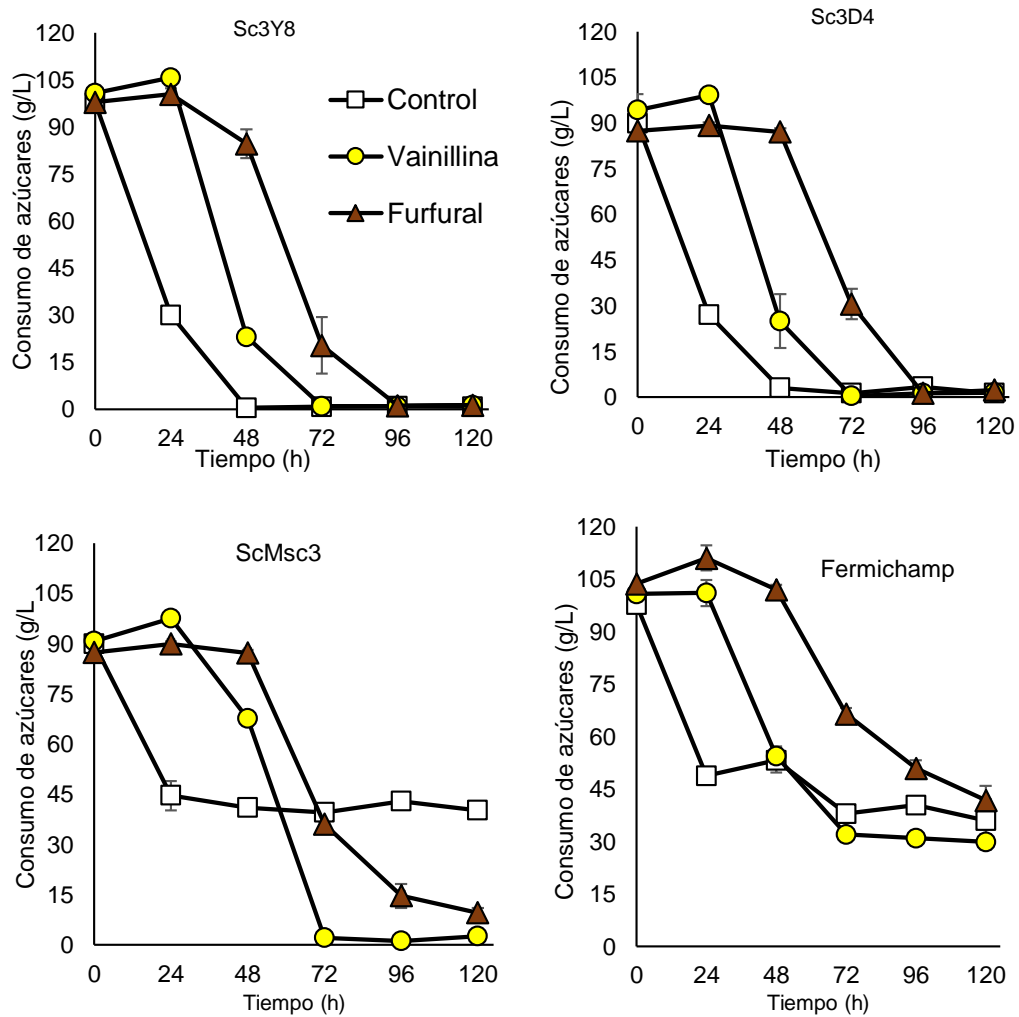


**Figura 13.** Cinética de crecimiento durante la fermentación en presencia de 1.5 g/L de vainillina (circulo amarillo) ó de 1.5 g/L de Furfural (triángulo café), y el cultivo testigo (cuadrado blanco) de las tres cepas *Saccharomyces cerevisiae* LBI-CBG y de la cepa comercial Fermichamp. Las líneas continuas señalan el conteo celular total medido en cámara Neubauer (cel/mL) y las líneas punteadas indican el crecimiento por conteo en microgota (UFC/mL) ó viabilidad.

Se observó que, después de que las cepas alcanzaban el crecimiento celular máximo observado al término de la fase exponencial, el valor de la viabilidad iba disminuyendo considerablemente.

### 7.6.3 Cinética de consumo de azúcares

El consumo de azúcares se relacionó directamente con la producción de dióxido de carbono, es decir, mayor producción de éste, mayor grado de consumo de azúcares. En la Figura 14, se comparan las cinéticas de consumo de azúcares totales de las cuatro cepas durante las fermentaciones con el medio M2 control y los compuestos inhibidores.



**Figura 14.** Consumo de azúcares durante la fermentación en presencia de vainillina y furfural (1.5 g/L) de tres cepas *Saccharomyces* y la cepa comercial Fermichamp.

Estos datos de consumo de azúcares coinciden con el efecto de la prolongación de la fase de adaptación (lag) que se observó en la Fig. 8, ya que, el consumo en los primeros tiempos fue retrasado. Sin embargo, el consumo total de azúcares al final de las fermentaciones fue muy similar al control para todas las cepas, con excepción de la cepa ScMsc3, ya que el consumo de azúcares en los medios con estrés fue mayor al control, tal y como se observó durante la producción de dióxido de carbono para esta cepa.

#### **7.6.4 Cuantificación de la proteína**

La cuantificación de la proteína se logró determinar bajo el Método de Bradford, y fue posible comparar la concentración de proteína en el extracto crudo y en el extracto enzimático que se obtuvo de la cepa Sc3Y8 a un tiempo de 48 horas de fermentación. El extracto crudo tenía una concentración de  $2.31 \pm 0.31 \mu\text{g/mL}$ , mientras que el extracto enzimático obtenido bajo el tratamiento propuesto por el protocolo del Kit de Sod, se logró obtener una concentración de  $7.45 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$ , lo cual indicó la validación del método de extracción de enzima intracelular para la determinación de la actividad enzimática.

#### **7.6.5 Cuantificación de peróxido de hidrógeno**

La cuantificación del peróxido de hidrógeno se realizó durante las primeras 96 horas de la fermentación con intervalos 24 horas para cada punto de monitoreo. Los datos se muestran en el cuadro 5. Generalmente, existió una variación en los niveles de producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en las primeras 48 horas y hasta las 72 horas de la fermentación ya sea en el control y con ambos compuestos (vainillina y furfural). Los valores más bajos de la producción de peróxido de hidrógeno fueron a las 48 horas de fermentación y los valores más altos a las 96 horas en todas las cepas. Sin embargo, la cepa Sc3Y8 produjo bajos niveles de peróxido de hidrógeno al final de la fermentación (96 h) en comparación con todas las cepas.

**Cuadro 5.** Concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular en muestras de la cinética de fermentación en medio M2 suplementado con 1.5 g/L de vainillina o de furfural, respectivamente.

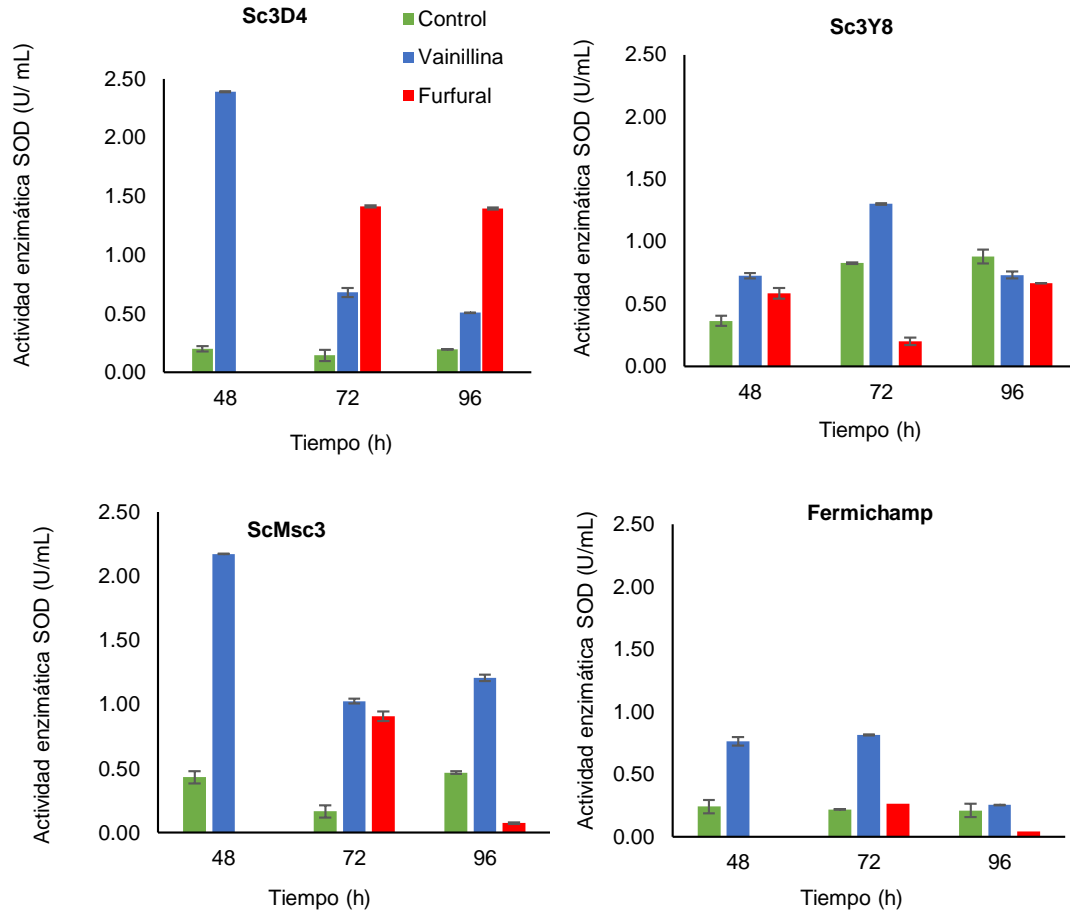
Compuestos	Tiempo (h)	Concentración intracelular de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (µmoles/g FW)			
		Sc3D4	ScMsc3	Sc3Y8	Fermichamp
Control	48	263.38 ± 51.45	956.47 ± 109.81	20.79 ± 25.72	501.01 ± 188.13
	72	887.16 ± 245.35	246.87 ± 163.56	114.86 ± 154.24	827.76 ± 140.96
	96	1204.0 ± 305.18	1501.0 ± 19.80	15.84 ± 0.00	1243.6 ± 39.61
Vainillina	48	179.22 ± 130.89	213.87 ± 105.72	203.97 ± 128.72	461.40 ± 9.90
	72	793.10 ± 432.36	253.48 ± 216.48	55.45 ± 48.51	312.88 ± 97.01
	96	1689.2 ± 762.41	1501.0 ± 39.61	491.11 ± 59.41	758.45 ± 188.13
Furfural	48	ND	ND	233.67 ± 0.00	ND
	72	253.48 ± 214.66	718.84 ± 262.15	570.32 ± 19.80	497.71 ± 33.66
	96	778.25 ± 9.90	609.93 ± 18.67	134.66 ± 19.80	302.98 ± 128.72

ND, no determinado

### 7.6.6 Determinación de la actividad enzimática

La actividad superóxido dismutasa (SOD) y la actividad catalasa (CAT) fue determinada en los extractos intracelulares en la biomasa de cada cepa y para cada punto de fermentación (48, 72 y 96 horas). La determinación de la actividad SOD se comparó con la actividad SOD del control, la cual se muestra en la Figura 15.

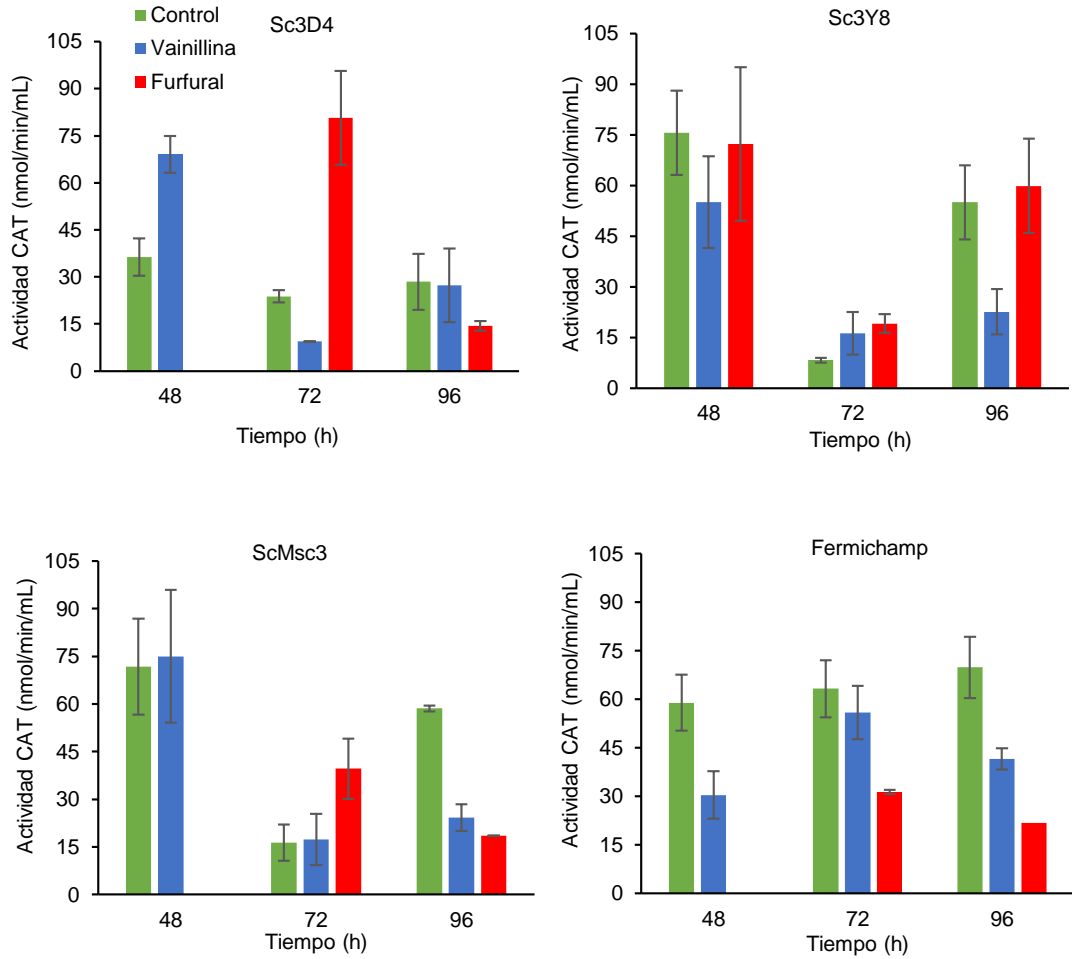
Para todas las cepas la actividad enzimática en el medio control mostró valores menores de 0.5 U/mL, mientras que en los medios donde se agregó vainillina y furfural los valores de la actividad enzimática aumentaron drásticamente. La actividad SOD de las cepas fue significativamente más alta en los medios con estrés, especialmente con la adición de vainillina, por lo menos en las cepas ScMsc3, Sc3Y8 y Sc3D4.



**Figura 15.** Actividad superóxido dismutasa (SOD) en las cepas *Saccharomyces*: Sc3D4, Sc3Y8, ScMsc3 y la cepa comercial Fermichamp creciendo en el medio M2: control (verde), con 1.5 g/L de vainillina (azul), y con 1.5 g/L de furfural (rojo). Las barras de error indican la desviación estándar.

A lo largo de la fermentación, los niveles más altos de actividad SOD fueron registrados para la cepa Sc3D4 durante los tiempos de 48 horas con vainillina y 72 y 96 horas con furfural y en la cepa ScMsc3 durante los tres tiempos monitoreados con el compuesto fenólico vainillina (más de 1 U/mL y hasta 2 U/mL). Por otra parte la actividad enzimática más baja fue dada por la cepa Fermichamp (menos de 1 U/mL) para todos los tiempos y para ambos compuestos evaluados.

La actividad catalasa (CAT) también fue evaluada para las cuatro cepas *Saccharomyces*, La determinación de la actividad CAT se comparó con la actividad CAT de cada control, la cual se muestra en la Figura 16.



**Figura 16.** Actividad catalasa (CAT) en las cuatro cepas *Saccharomyces*: Sc3D4, Sc3Y8, ScMsc3 y la cepa comercial Fermichamp, creciendo en el medio M2: control (verde), con 1.5 g/L de vainillina (azul), y con 1.5 g/L de furfural (rojo). Las barras de error indican la desviación estándar.

Se encontró que la actividad CAT en el control varió a lo largo de los tiempos de fermentación monitoreados, a las primeras 24 horas de fermentación, la actividad CAT mostró tener valores de hasta 40 nmol/min/mL. Sin embargo, los valores de la actividad CAT disminuyeron a las 48 horas y nuevamente se elevaron al tiempo de 72 horas. Con excepción de la cepa Fermichamp, en donde los niveles de CAT no variaron con respecto al tiempo de fermentación.

## 8. DISCUSION

### 8.1 Tolerancia al estrés por SO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

El metabisulfito de potasio es una sustancia cristalina que se utiliza en la industria enológica como conservante y fungicida. Esta sal de potasio en los medios de fermentación proporciona dióxido de azufre que es utilizado como conservador. Así que, durante la liberación de este compuesto al medio, una parte de este SO<sub>2</sub> es transportado por difusión facilitada hacia el citoplasma de las células de levadura (Vilela *et al.*, 2013). Sin embargo, no todas las células de levadura tienen la misma capacidad tolerar el estrés causado por el SO<sub>2</sub> y va a depender del origen de aislamiento (Méndes *et al.*, 2013) y/o la capacidad de éstas por desarrollar protección antioxidante (Zhao y Bai, 2009).

La viabilidad ha sido usada para evaluar la resistencia a diferentes tipos de estrés químicos. En algunos trabajos los compuestos causantes de estrés oxidativo son añadidos a un medio sólido y posteriormente se inocula la levadura (Thorpe *et al.*, 2004). En base a esta metodología, las cepas *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* mostraron perfiles de tolerancia alta (más de 1000 ppm), media (más de 800 ppm) y baja (más de 600 ppm) con SO<sub>2</sub>. Cabe destacar que estos rangos de concentración son superiores a los reportados por Fioré *et al.* (2005) en donde las cepas aisladas de uva y agave fueron evaluadas desde 0 a 300 ppm con SO<sub>2</sub>. Por lo tanto, independientemente del género, las cepas utilizadas en este trabajo fueron más tolerantes a este estrés en comparación a las ya reportadas. Un dato importante de dicho trabajo fue que las cepas de agave (*Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*) y únicamente las cepas *Saccharomyces* de uva fueron tolerantes a todas las concentraciones evaluadas. Además, dentro de las cepas no-*Saccharomyces*, las cepas de agave mostraron ser más tolerantes que las cepas de uva ya que éstas últimas sólo crecieron a concentraciones bajas de SO<sub>2</sub>. Particularmente, se observó que las cepas *Saccharomyces* mostraron diferencias en su capacidad de crecimiento bajo este tipo de estrés. Estas diferencias de la tolerancia a SO<sub>2</sub>, ya han sido previamente reportadas (Gardner *et al.*, 1993).

Por otra parte, el peróxido de hidrógeno añadido al medio de crecimiento ejerció un efecto tóxico en algunas cepas debido a que, con el aumento de la concentración de éste compuesto, el número de células viables fue reducido, como consecuencia, el perfil de las cepas *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* mostraron alta (hasta 25 mM), media (hasta 20 mM) y baja (hasta 15 mM) tolerancia hacia este compuesto. La tolerancia que mostraron estas cepas en comparación con otras aún es más alta que las reportadas, por ejemplo, en el trabajo de Zhao *et al.*, (2014) quienes realizaron el mejoramiento genético de algunas cepas y las expusieron a estrés hasta concentraciones de 6 mM con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otra parte, otras levaduras de mezcal fueron

evaluadas en el trabajo de Arellano *et al.*, (2013) a concentraciones por arriba de 50 mM con peróxido de hidrógeno y con MSB (Menadiona Sodio Bisulfito) otro agente de estrés oxidativo menos letal, sin embargo, la adición de 100 mM de estos compuestos redujo la viabilidad un 99% en algunas cepas. Adicionalmente, quedó demostrada la capacidad de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* la cual es más tolerante que las cepas de *Kluyveromyces marxianus* aisladas de mezcal.

## 8.2 Tolerancia al estrés por compuestos fenólicos durante las fermentaciones

De acuerdo con los perfiles de producción de CO<sub>2</sub>, las siete cepas seleccionadas fueron tolerantes a concentraciones por debajo de 2 y 3 g/L con vainillina y furfural respectivamente. Otras cepas *Saccharomyces cerevisiae* fueron evaluadas con 0.91 g/L con furfural (Wang *et al.*, 2013), 5 mM de vainillina (Fitzgerald *et al.*, 2003) ó 1 g/L de vainillina (Shen *et al.*, 2014) en el medio de crecimiento, por lo tanto, se considera que las cepas utilizadas en este trabajo tienen una mayor capacidad de tolerar estos compuestos.

Sin embargo, hay algunos aspectos como el grado de inhibición causado en la producción de CO<sub>2</sub>, en el consumo de azúcares y por supuesto en la viabilidad de las cepas durante la fermentación. Por ejemplo, el aumento del porcentaje de inhibición en la producción de CO<sub>2</sub> fue directamente relacionado con el aumento de la concentración de los compuestos añadidos al medio, así que, al aumentar las concentraciones hasta 1.5 g/L de vainillina y furfural los porcentajes de inhibición aumentaron hasta un 30% y 60% respectivamente para algunas cepas. Es conocido que a concentraciones bajas de furfural no tienen un fuerte efecto en el metabolismo celular durante el crecimiento fermentativo (anaerobio) así como en el crecimiento aerobio, sin embargo, a concentraciones mayores, los metabolitos producidos alcanzan un mayor grado de inhibición (Horváth *et al.* 2003).

De la misma forma, el porcentaje de inhibición en la producción de CO<sub>2</sub> estuvo directamente relacionado a la cantidad de azúcares residuales al final de las fermentaciones, cuando el porcentaje de inhibición es mayor, existió una mayor cantidad de azúcares residuales; se puede suponer que los compuestos vainillina y furfural, pueden intervenir en los procesos celulares, ejercer un tipo de estrés y/o utilizar la energía para metabolizar los compuestos propuestos a compuestos menos tóxicos (Horváth *et al.*, 2003; Shen *et al.* 2014).

## 8.3 Determinación de polimorfismos en el gen Sod1

En células eucariotas, la proteína Cu/Zn-SOD (Sod1) adquiere principalmente el cobre a través de la chaperona CCS (Chaperona de cobre de superóxido dismutasa). La enzima de *S. cerevisiae*



solo puede recibir el cobre mediante esta CCS y ese proceso requiere de la presencia de dos residuos de prolina cerca del C terminal (Raimondi *et al.*, 2008), en este trabajo los residuos P-143 y P-145 fueron encontrados en las cuatro cepas que se analizaron, por lo tanto, no existe diferencia entre el mecanismo para la interacción de cationes entre la enzima SOD y los diferentes cationes que se unen para la activación de su función como antioxidante.

En la búsqueda de polimorfismos se encontró que si existieron cambios de aminoácidos, sin embargo, estos no se encontraban en los dominios activos en donde implica una interacción con el sustrato o el sitio activo de la enzima. Probablemente, puede deberse a que todas las cepas utilizadas para este análisis eran del género *Saccharomyces* y dentro de la comparación por género no existió ninguna variación de importancia, al menos a nivel de secuencia.

#### **8.4 Caracterización metabólica en cepas *Saccharomyces***

La composición de un mosto de fermentación depende del material a utilizar y del producto final que se requiera. En este trabajo, se evaluaron los compuestos vainillina y furfural ya que son los principales compuestos derivados de la degradación de los residuos lignocelulósicos. Estos inhibidores impiden el crecimiento, bloquean el metabolismo de los microorganismos e inducen la acumulación de ROS en *S. cerevisiae*, reducen la actividad enzimática y biológica, descomponen el ADN e inhiben la síntesis de proteínas y ARN (Shen *et al.*, 2014). También se sabe que los mostos de agave contienen estos tipos de inhibidores de crecimiento, causando estrés en la levadura durante la fermentación (García *et al.*, 2011).

Actualmente, se conoce el mecanismo por el que algunos compuestos químicos como los utilizados en este trabajo ejercen un efecto oxidante que es observado por la inhibición del crecimiento celular (Cohen y d'Arcy Doherty, 1987). Es por ello que el crecimiento a 1.5 g/L con vainillina y furfural se retrasó de manera importante, sin embargo, la biomasa final alcanzó valores similares a las condiciones no estresadas 48 horas después para la vainillina y 72 horas en el caso del medio con furfural. Se sabe que la resistencia al estrés oxidativo aumenta durante la fase estacionaria (Arellano *et al.*, 2013), lo cual se observó en este trabajo. El efecto de la toxicidad de la vainillina se había observado previamente, con la prolongación de la fase lag de crecimiento según lo observado por Nguyen *et al.*, (2014) a varias concentraciones de vainillina (0-6 mM), las cuales eran inferiores a las utilizadas en este trabajo.

Durante la fermentación, las levaduras fueron afectadas por el estrés causado con vainillina y furfural. Sin embargo, las células podían sobrevivir a concentraciones medias de vainillina y furfural debido a la capacidad antioxidante de algunas enzimas. En este trabajo se observó que las enzimas SOD y CAT tuvieron un rol importante para la detoxificación de las diferentes

especies reactivas de oxígeno. Por ejemplo, la enzima superóxido dismutasa actúa dismutando el superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, mientras que la enzima catalasa cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, ambas responden a reacciones en cascada. Se ha comprobado que los compuestos fenólicos (vainillina) producen especies reactivas de oxígeno, principalmente el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Arellano *et al.*, 2013), lo cual fue comprobado por la medición de peróxido de hidrógeno en este trabajo y cabe destacar que los niveles de peróxido fueron más altos al final de la fermentación, lo cual indica que el ciclo celular final o apoptosis podría también inducir la producción de peróxido de hidrógeno (Perrone *et al.*, 2008).

Las actividades enzimáticas para ambas enzimas fueron muy variadas, debido a que el estrés oxidativo no se presentaba en toda la fermentación, de acuerdo con los picos de actividad enzimática para todas las cepas evaluadas. Sin embargo, la actividad SOD fue la más afectada, elevando sus niveles, lo cual podría relacionarse con la producción del anión superóxido, además de la producción de peróxido de hidrógeno intracelular ocasionado por presencia de estos compuestos en las levaduras. El crecimiento celular y los niveles de actividad enzimática fueron diferentes en cada cepa durante el estrés oxidativo, y puede deberse a la variabilidad de cada cepa, las cuales poseen la capacidad de activar mecanismos de protección celular para adaptarse a cambios ambientales y reparar componentes celulares a distintos niveles (Arellano *et al.*, 2013).

La actividad enzimática SOD fue la más inducida durante el crecimiento con vainillina en comparación con el control (hasta 1.5 U/mL = 201 U/mg de proteína para Sc3Y8). Se ha comprobado que en la presencia de compuestos tóxicos estresantes los niveles de la enzima SOD aumentan, infiriendo la participación de ésta para detoxificar el sistema biológico, tal como los observados por Pinheiro *et al.*, (2002), en este trabajo, los niveles de la actividad enzimática SOD aumentan en comparación a la actividad CAT (hasta 211.6 U/mg de proteína con paraquat), los niveles actividad enzimática CAT permanecieron constantes (hasta 0.07 U/mg de proteína) en ambos compuestos. De manera similar el cambio más notable en la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue demostrado en las cepas *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas por Zhao *et al.*, (2014) quien evaluó ambas enzimas concluyendo que la actividad SOD fue modificada aumentando sus niveles de actividad (hasta 155 U/mg de proteína). Sin embargo, los niveles de actividad enzimática SOD durante el estrés o a condiciones normales dependen del medio de crecimiento en donde se encuentren, por ejemplo, la adición suplementos como Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> al medio de cultivo podrían incrementar la actividad SOD específica (Raimondi *et al.*, 2008) y mejorar su capacidad antioxidante.

Los datos obtenidos en actividad enzimática revelan un comportamiento similar a otras cepas ya sea del género *Saccharomyces* o *Kluyveromyces marxianus* (Pinheiro *et al.*, 2002). Sin embargo,

la actividad CAT, se comportó de manera uniforme en algunos puntos de la fermentación, por ejemplo en la cepa Sc3Y8 a las 72 horas (menos de 30 nmol/min/mL), en las cuales no existió cambios en la presencia de los compuestos en comparación con el control, y puede deberse a un equilibrio entre las especies reactivas de oxígeno producidas, que fueron más bien detoxificadas por la actividad de la SOD, más que de la enzima catalasa, ya que es bien conocido que ambas enzimas actúan por rutas en cascada (Cohen y D' Arcy, 1987).

## 9. CONCLUSIONES

1. Todas las cepas de estudio en este trabajo presentaron una tolerancia alta al estrés por compuestos fenólicos y azufrados con respecto a lo ya reportado.
2. Las cepas en estudio pueden tolerar concentraciones mayores a 600 ppm de SO<sub>2</sub> y hasta 25 mM con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
3. Se logró una selección de cepas de alta, media y baja tolerancia a las condiciones probadas.
4. Las tres levaduras evaluadas (Sc3Y8, ScMsc3, Sc3D4) y la cepa control Fermichamp) fueron altamente tolerantes (hasta 1.5 g/L con vainillina y furfural).
- 5.- La secuencia de los genes que codifican para las enzimas SOD y CAT, no mostraron una correlación con sus niveles de tolerancia, ya que los dominios importantes en la proteína SOD fueron conservados y muy similares entre las cepas de alta tolerancia (*Saccharomyces*).
6. Y finalmente se concluye que las cepas más tolerantes a los compuestos evaluados son las de mejor desempeño metabólico previamente evaluado en los trabajos del LBI.

## 10. PERSPECTIVAS

Debido a que las cepas caracterizadas en este trabajo mostraron ser tolerantes al estrés causado por compuestos fenólicos y azufrados en diferentes grados, se sugiere la comprobación en lotes de fermentación industriales o de tipo piloto, para así continuar con el uso potencial sugerido, es decir el uso en la producción de Bio-etanol u otros productos finales de la fermentación. Además, es posible aumentar su nivel de tolerancia gracias a diversas metodologías de adaptación si en su debido momento se requiere la aplicación en mostos de composición más compleja.

Se sugiere un estudio más a fondo sobre los mecanismos biológicos por los cuales las cepas, en particular las cepas aisladas de agave, tienen la capacidad de tolerar concentraciones de compuestos fenólicos y azufrados más altas en comparación con las cepas aisladas de uva, por ejemplo. Así mismo, el uso de la transcriptómica puede favorecer en el conocimiento de aquellos genes relacionados con la tolerancia a estrés oxidativo e identificar aquellos de menor y mayor expresión bajo diferentes condiciones para explicar los fenómenos de tolerancia y a su vez el proceso de muerte celular.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B. J., Lewis R., Roberts W. (2010) Essential cell biology. In: How cells obtain energy from food. fermentations allow ATP to be produced in the absence of oxygen. Garland Science. New York & London. Pág. 432
- Allen S., Clark W., Mccaffery J., Cai Z, Lanctot A., Slininger P., Lewis Z., Gorsich S. (2010) Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels* 3, 1-10
- Antoce A., Namolosanu I, Radoi F. (2011) Comparative study regarding the ethanol resistance of some yeast strains isolated from Romanian vineyards. *Romanian Biotechnological Letters* 16, 5981–5988
- Arellano M., Gschaedler A., Noriega R., Clemente M., Manzo S., González J., Saavedra M. (2013) Respiratory capacity of the *Kluyveromyces marxianus* yeast isolated from the mezcal process during oxidative stress. *World Journal Microbiology Biotechnology* 29, 1279-1287
- Arratia J. M. (2009) Diversidad genética de levaduras involucradas en la fermentación del mezcal tamaulipeco. Tesis de Maestría, Centro de Biotecnología Genómica IPN
- Arshad M., Khan Z. M., Khalilúr R., Shah F.A., Rajoka M.I. (2008) Optimization of process variables for minimization of byproduct formation during fermentation of blackstrap molasses to ethanol at industrial scale. *Letters in Applied Microbiology* 47, 410–414
- Benjaphokee S., Hasegawa D., Yokota D., Asvarak T., Auesukaree C., Sugiyama M., Kaneko Y., Boonchird C., Harashima S. (2012) Highly efficient bioethanol production by a *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress tolerance to high temperature, acid and ethanol. *New Biotechnology* 29, 379-386
- Benn S., Peppard T. (1996) Characterization of Tequila flavor by instrumental and sensory analysis. *Journal Agriculture Food Chemical* 44, 557-566
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 48-254
- Caridi A. (2003) Effect of protectants on the fermentation performance of wine yeasts subjected to osmotic stress. *Food Technology Biotechnology* 41:2, 145–148
- Carrasco P., Querol A., Del Olmo M. (2001) Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Archives Microbiology* 175, 450-457
- Ciesarova Z., Smogrovicová D., Domeny Z. (1996) Enhancement of yeast ethanol tolerance by calcium and magnesium. *Folia Microbiology* 41, 485–488
- Cohen G. M. y d'Arcy Doherty M. (1987) Free radical mediated cell toxicity by redox cycling chemicals. *British Journal of Cancer* 55, 46-52
- De La Torre F.J., Narváez J.A., López V.E., Larralde C.P. (2016). Ethanol tolerance is decreased by fructose in *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts. *LWT Food Science and Technology* 67, 1-7.

- Fiore C., Arrizon J., Gschaedler A., Flores J., Romano P., Lucano A. (2005) Comparison between yeasts from grape and agave musts for traits of technological interest. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87, 1317- 1326
- Fitzgerald D., Stratford M., Narbada A.(2003) Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *International Journal of Food Microbiology* 86, 113– 122
- Folch J. L., Garay A., Lledías F., Covarrubias R. A. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol. 46, 1-2 pp. 24-46
- Garay A., Covarrubias A. A., Clark I., Niño I., Gosset G., Martínez A. (2004). Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied Microbiology Biotechnology* 63, 734–741
- García J. (2012). “México, país de magueyes”. Jornada del Campo. Consultado en Julio 2016: <http://www.jornada.unam.mx/2012/02/18/delcampo.html>
- García M., Jimenez I., Navarrete J., Rico M., Miranda L. Botello A., (2011) Kinetic Study of the thermal hydrolysis of *Agave salmiana* for Mezcal production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 7333–7340
- García M., Rios G., Ali R., Belles J. (1997) Comparative physiology of salt tolerance in *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 143, 1125–1131
- Gibson B., Lawrence S., Leclaire J., Powell C., Smart K. (2007) Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiology Reviews* 31, 535- 569
- Gschaedler M. A., Rodríguez M. G., Prado R. R., Flores M. J. L. (2016) Ciencia y Tecnología del Tequila: Avances y perspectivas In: La fermentación: Etapa clave en la elaboración del Tequila. Grupo Promueve. Guadalajara, Jalisco. Pág. 97-115
- Herrero E., Ros J., Bellí G., Cabisco E. (2008) Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1780, 1217–1235
- Holubarová A., Muller P., Svoboda A. (2008) A response of yeast cells to heat stress : cell viability and the stability of cytoskeletal structures. *SCRIPTA MEDICA (BRNO)*. 73, 381–392.
- Horváth I., Franzén C., Taherzadeh M., Niklasson C., Lidén G. (2003) Effects of furfural on the respiratory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in glucose-limited chemostats. *Applied And Environmental Microbiology* 69, 4076–4086
- Hounsa C., Brandt E., Hp J., Hohmann S., Prior B. (1998) Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology* 144, 671-680
- Huitron C., Perez R., Sanchez A.E., Lappe P., Rocha Zavaleta L. (2008). Agricultural waste from the tequila industry as substrate for the production of commercially important enzymes. *Journal of Environmental Biology* 29, 37-41.
- Ibarra H., Botero G., Cortéz A. (2010) Operaciones unitarias en la producción de tequila”. Ingeniería de tequilas. Primera edición. Grupo Ingeniería Institucional. Bogotá Colombia, 17-37

- Jamieson D. (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 1511–1527
- Jiménez M., Gomar E., Palacios A., Ortiz J., Olmo M. (2011) Towards an understanding of the adaptation of wine yeasts to must: relevance of the osmotic stress response. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 89, 1551–1561
- Kaino T., Takagi H. (2008) Gene expression profiles and intracellular contents of stress protectants in *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol and sorbitol stresses. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79, 273–283
- Krems B., Charizanis C., Entian K. (1995) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* sensitive to oxidative and osmotic stress. *Curr Genet* 27, 427–434
- Martins F., Pereira J. A., Baptista P. (2014) Oxidative stress response of *Beauveria bassiana* to Bordeaux mixture and its influence on fungus growth and development. *Pest Management Science* 70, 1220–1227
- Mendes I., Franco-Duarte R., Umek L., Fonseca E., Drumonde-Neves J., Dequin S., Zupan B., Schuller D. (2013) Computational models for prediction of yeast strain potential for winemaking from phenotypic profiles. *Plos One* 8, 2-10
- Moradas P., Costa V., Piper P., Mager W. (1996) The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Molecular Microbiology* 19, 651–658
- Nguyen T.T.M., Iwaki A., Ohya Y., Izawa S. (2014) Vanillin causes the activation of Yap1 and mitochondrial fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 117, 33- 38
- Palmqvist E., Hahn B. (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology* 74, 25–33,
- Perrone G., Tan S., Dawes I. (2008) Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1783, 1354–1368
- Pinheiro R., Belo I., Mota M. (2002) Oxidative stress response of *Kluyveromyces marxianus* to hydrogen peroxide, paraquat and pressure. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58:842–847
- Piotrowski S., Zhang Y., Bates D. M., Keating D., Sato K., Ong M., Landick R. (2014) Death by a thousand cuts: the challenges and diverse landscape of lignocellulosic hydrolysate inhibitors. *Frontiers in Microbiology* 5, 1-8
- Raimondi S., Uccelletti D., Matteuzzi D., Pagnoni U. M., Rossi M., Palleschi C. (2008) Characterization of the superoxide dismutase SOD1 gene of *Kluyveromyces marxianus* L3 and improved production of SOD activity. *Applied Microbiology Biotechnology* 77, 1269–1277
- Reader U., Broda P. (1985) Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters Applied Microbiology* 1, 17-20



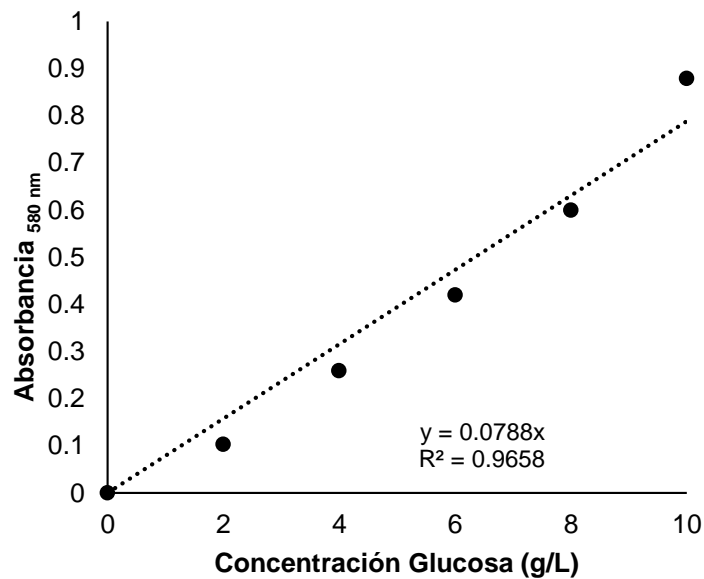
- Shen Y., Li H., Wang X., Zhang X., Hou J., Wang L., Gao N., Bao X. (2014) High vanillin tolerance of an evolved *Saccharomyces cerevisiae* strain owing to its enhanced vanillin reduction and antioxidative capacity. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology* 41:1637–1645
- Sun Z., Lv G., Li S. (2007) Differential role of microenvironment in microencapsulation for improved cell tolerance to stress. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 1419–1427
- Tekolo O., Mckenzie J., Botha A., Prior B. (2010) The osmotic stress tolerance of basidiomycetous yeasts. *FEMS Yeast Res* 10, 482–491
- Thorpe G. Fong C., Alic N., Higgins V., Dawes I. (2004) Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 6564–6569
- Thorpe G., Reodica M., Davies M. J., Heeren G., Jarolim S., Pillay B., Breitenbach M., Higgins V., Dawes I. (2013) Superoxide radicals have a protective role during H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress. *Molecular Biology of the Cell* 24, 2876- 2884
- Vilela A., Méndez A., Schuller D., Corte R. (2013) Reduction of volatile acidity of acidic wines by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 4991–5000.
- Vital López Patricia, Larralde-Corona Claudia Patricia. (2016). Respuestas metabólicas al estrés de levaduras de importancia industrial. Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes 67, 86-91. ISSN 1665-4412, México.
- Walker G. M. (2000) *Yeast Physiology and Biotechnology*. West Sussex, England, John Wiley & Sons Ltd.
- Wang X., Li B., Ding M., Zhang W., Yuan Y. (2013) Metabolomic analysis reveals key metabolites related to the rapid adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to multiple inhibitors of furfural, acetic acid, and phenol. *OMICS A Journal of Integrative Biology* 17, 150-159
- Wood I. P., Elliston A., Ryden P., Bancroft I., Roberts I. N., Waldron W. K. (2012) Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the Dinitrosalicylic acid assay. *Biomass and Bioenergy* 44, 117-121
- Wu M., O'Doherty P., Murphy P., Lyons V., Christophersen M., Rogers P., Bailey T., Higgins V. (2011) Different reactive oxygen species lead to distinct changes of cellular metal ions in the eukaryotic model organism *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal. Molecular. Sciences* 12, 8119-8132
- Zhao H., Li J., Han B., Li X., Chen J. (2014) Improvement of oxidative stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* through global transcription machinery engineering. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology* 41, 869–878
- Zhao X.Q., Bai F.W. (2009) Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *Journal of Biotechnology* 144, 23–30
- Zorrilla A., Eirez M., Expósito I. (2004) Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 23, 51-57.

Zuzuarregui A., Del Olmo M. (2004) Analyses of stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection. *Antonie van Leeuwenhoek* 85, 271–280

## APÉNDICES

## APENDICE I. Curva estándar para Método Ácido 3,5 Dinitrosalicílico.

Se preparó un stock con Glucosa de 20 g/L y a partir de ahí se construyeron las siguientes concentraciones estándar: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 g/L. Una vez realizado este paso la reacción fue llevada a cabo con 50  $\mu$ L del estándar y 950  $\mu$ L del reactivo DNS. Esta reacción fue realizada en calor a 80 °C durante 8 minutos y después fue detenida en hielo por al menos 15 minutos. El resultado de la oxidación del reactivo DNS, fue medido en un espectrofotómetro a 580 nm.

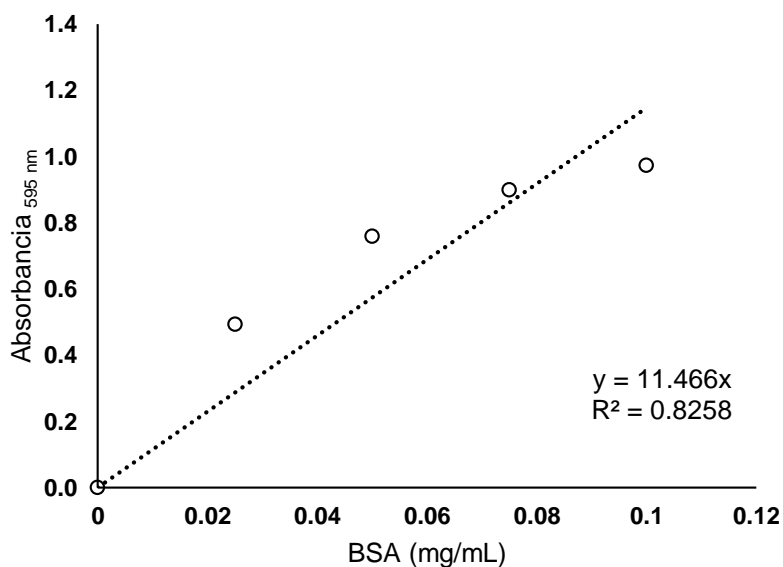


**APÉNDICE II. Cuantificación de proteína por el Método de Bradford**

Se construyó una curva de calibración de proteínas de 0,01 a 0,150 mg.mL<sup>-1</sup> de BSA. A cada concentración de BSA fue añadido reactivo de Bradford como se muestra en la Cuadro siguiente:

No. De Tubo	Muestra estándar mL	[BSA] Proteína Estándar (mg .ml <sup>-1</sup> )	Reactivo Bradford (mL)	Vol. Final (mL)
1	1.0	0	1.0	2.0
2	1.0	0.025	1.0	2.0
3	1.0	0.050	1.0	2.0
4	1.0	0.075	1.0	2.0
5	1.0	0.1	1.0	2.0
6	1.0	0.125	1.0	2.0
7	1.0	0.150	1.0	2.0

Como puede verse en la Cuadro, se adicionó 1mL del reactivo de Bradford y 1 mL de la muestra estándar y de las muestras de extractos enzimáticos. Posteriormente se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente y se midieron a 595nm con ayuda de un espectrofotómetro. Cada muestra estándar se realizó por triplicado.



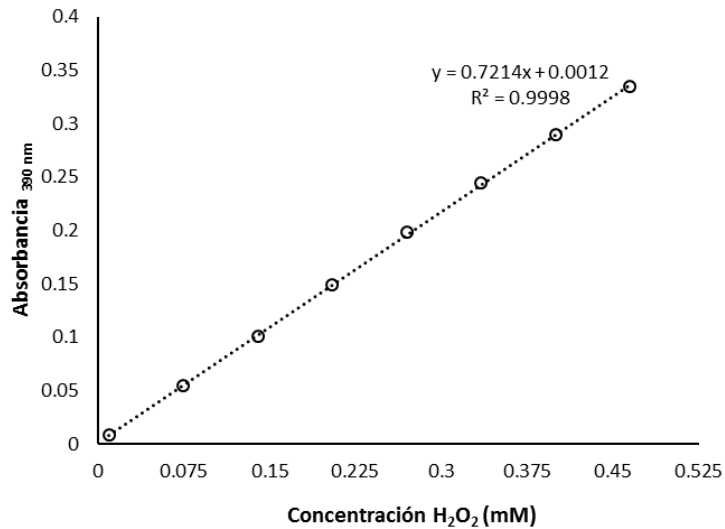
**APÉNDICE III. Curva de calibración de Peróxido de hidrógeno**

A partir de un Stock de peróxido de hidrógeno 1M, se preparó una curva de calibración con las concentraciones: 0.01, 0.075, 0.14, 0.205, 0.207, 0.335, 0.4 y 0.465 milimolar de acuerdo a la siguiente tabla:

No. tubo	Volumen de Sock (µL)	Volumen de agua (mL)	Concentración final de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)
1	0	10	0
2	0.1	9.9999	0.01
3	0.75	9.99925	0.075
4	1.4	9.9986	0.14
5	2.05	9.9975	0.205
6	2.7	9.9973	0.270
7	3.35	9.99665	0.335
8	4	9.9996	0.4
9	4.65	9.995335	0.465

Los tubos falcon se mezclaron en vortex y se les dejó reposar por 5 minutos antes de la lectura en el espectrofotómetro.

**Curva de calibración con Peróxido de Hidrógeno**



## APÉNDICE IV Protocolo Kit Catalasa

### 1. Catalase Assay Buffer (10x)

Diluir 2 mL de Catalase Assay Buffer (10x) concentrado con 18 mL de agua grado HPLC. La concentración final del Buffer quedaría a 100mM de fosfato de potasio, pH 7. Almacenar a 4°C y es estable por 2 meses.

### 2. Catalase Sample Buffer (10x)

Diluir 5 mL de Catalase Sample Buffer (10x) concentrado con 45 mL de agua grado HPLC. La concentración final de este buffer quedaría a 25mM de fosfato de potasio, pH 7.5, 1Mm EDTA, 0.1% BSA.

Este buffer se utiliza para diluir los estándares de formaldehído, catalasa (control) y las muestras de CAT antes del ensayo.

Almacenar a 4°C, estable por 2 meses.

### 3. Catalase Formaldehído Standard.

4.25 mM de Formaldehído, listo para su uso.

### 4. Catalase Control

Adicionar 2 mL de Sample Buffer diluido, dar vortex. (Es estable 1 mes, -20 °C).

Tomar 100 µL de enzima reconstituida y diluir con 1.9 mL de Sample Buffer. (20 µL de esta alícuota causa una absorbancia  $A=0.29$  después de restar la Abs de fondo).

**Nota:** La mezcla de 100 µL de enzima reconstituida más los 1.9 mL de Sample Buffer es estable durante 30 min.

### 5. Catalase Potassium Hydroxide

Un volumen de 4 mL de Hidróxido de Potasio (KOH) 10M está listo para su uso.

### 6. Catalase Hydrogen Peroxide

Diluir 40 µL de Catalase Hydrogen Peroxide con 9.96 mL de agua grado HPLC.

**Nota:** esta mezcla es estable por 2 horas.

**PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR:**

1. Diluir 10 µL del reactivo Catalase Formaldehído Standard con 9.99 mL del Sample Buffer diluido para obtener un stock de 4.25 mM de Formaldehído.

A partir de este stock, preparar los estándares por duplicado como aparece en la Cuadro:

<b>Tubo</b>	<b>Formaldehído (µl)</b>	<b>Sample Buffer (µl)</b>	<b>Final Concentration (µM formaldehído)*</b>
<b>A</b>	0	1,000	0
<b>B</b>	10	990	5
<b>C</b>	30	970	15
<b>D</b>	60	940	30
<b>E</b>	90	910	45
<b>F</b>	120	880	60
<b>G</b>	150	850	75

**REALIZACIÓN DEL ENSAYO.**

**1. Standards Formaldehyde Wells:** Adicionar 100 µL de Buffer Assay diluido, 30 µL de metanol y 20 µL del Standard (A-G).

**2. Pozo para el control positivo (Bovine liver CAT):** Adicionar 100 µL de Assay Buffer diluido, 30 µL de metanol, 20 µL de Catalasa diluida Control en dos pozos. Este debe medir 2-35 nmol/min/ mL.

**3. Pozos para la muestra:** Añadir 100 µL de Assay Buffer diluido, 30 µL de metanol y 20 µL de la muestra (duplicados)

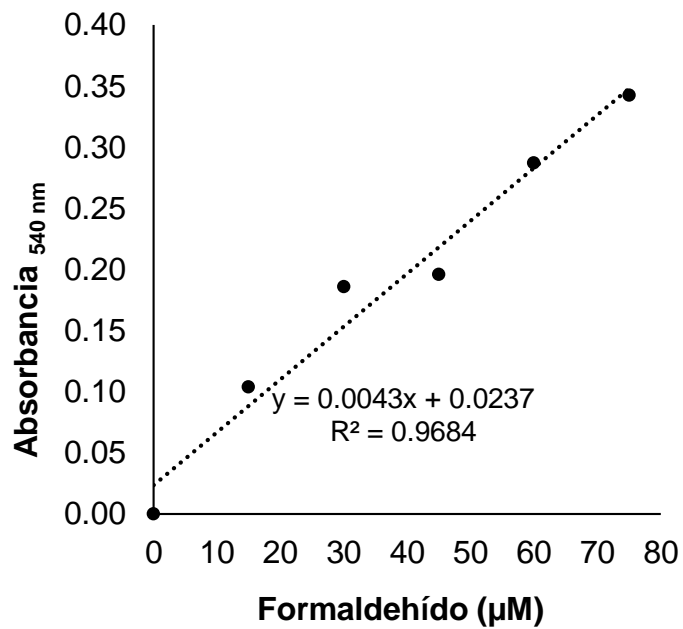
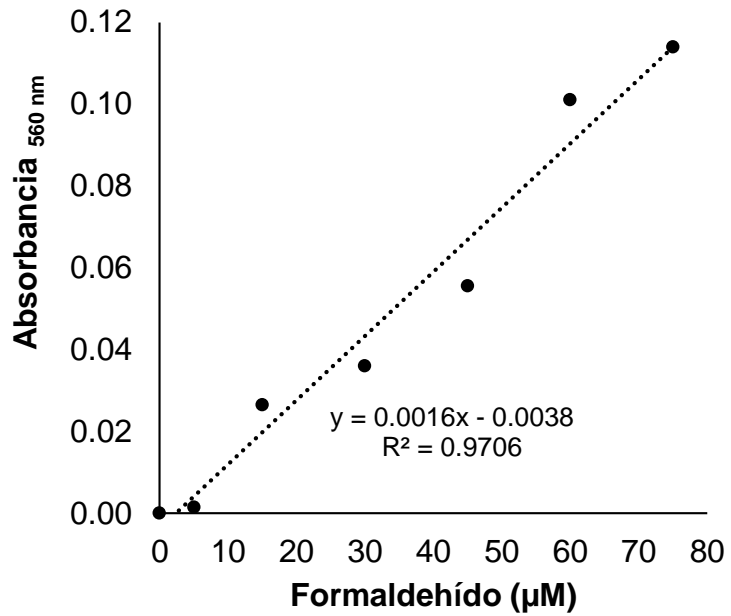
4. Iniciar la reacción adicionando 20 µL de peróxido de hidrógeno diluido a todas las placas usadas. Se añade muy rápido haciéndolo en el menor tiempo posible.

5. Cubrir la placa con su tapa e incubar en un Shaker por 20 minutos a temperatura ambiente.

6. Añadir 30 µL de hidróxido de potasio a cada placa para terminar la reacción y después 30 µL de Catalase purpald (cromogen) a cada placa.

7. Cubrir e incubar por 10 minutos en Shaker a temperatura ambiente.
8. Añadir 10  $\mu\text{L}$  de Catalase Potassium Periodate y cubrir por 5 minutos a temperatura ambiente en Shaker.
9. Leer la absorbancia a 540 nm.

Curvas estándar de Formaldehído





**APENDICE V. Protocolo kit Sod**

**PREPARACIÓN DE REACTIVOS**

**1. Assay Buffer (Buffer de ensayo 10x)**

Diluir 3 mL de Buffer en 27 mL de agua destilada. Este buffer queda a una concentración final de 50 Mm de Tris HCl pH 8, 0.1 Mm DTPA, 0.1 Hipoxantine.

Utilizar para diluir el detector radical. Almacenar a 4° C y es estable por dos meses.

**2. Sample Buffer (Buffer de la muestra 10x)**

Diluir 2 mL de Sample Buffer concentrado con 18 mL de agua destilada.

Almacenar 4 °C y es estable por 6 meses.

**3. Radical detector**

Diluir 50 µL con 19.95 mL de Assay Buffer.

Cubrir con papel aluminio.

Almacenar a -20 °C y es estable por dos horas, preparar más si se requiere el uso de más de 96 placas.

**3. SOD Estándar**

El vial contiene 100 µL de SOD (Cu/Zn) de eritrocito bovino. Una vez descongelada, mantener en hielo. La enzima que no se utilice almacenar a -20 °C.

**4. Xantina Oxidasa**

Descongelar sobre hielo un vial y transferir 50 µL que se diluye en 1.95 mL de Sample Buffer diluido. La enzima diluida es estable por una hora. No volver a usar una enzima descongelada y diluida.

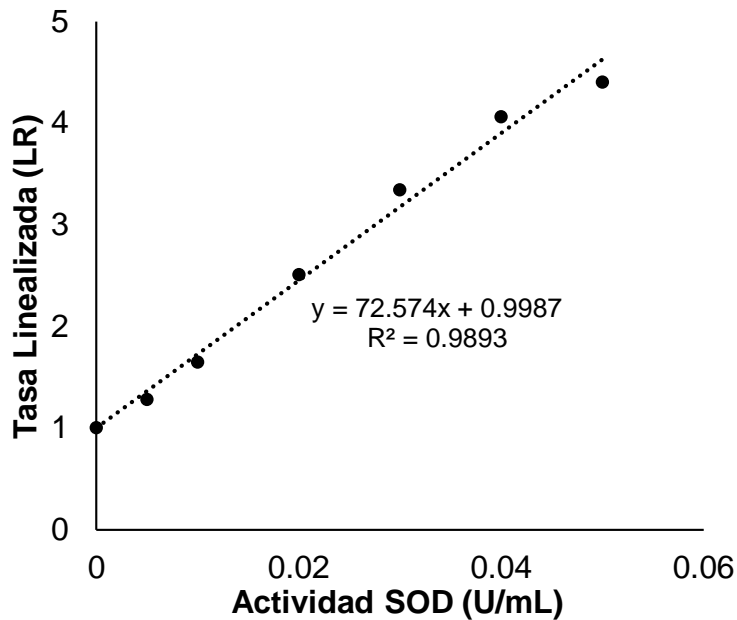
**PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR:**

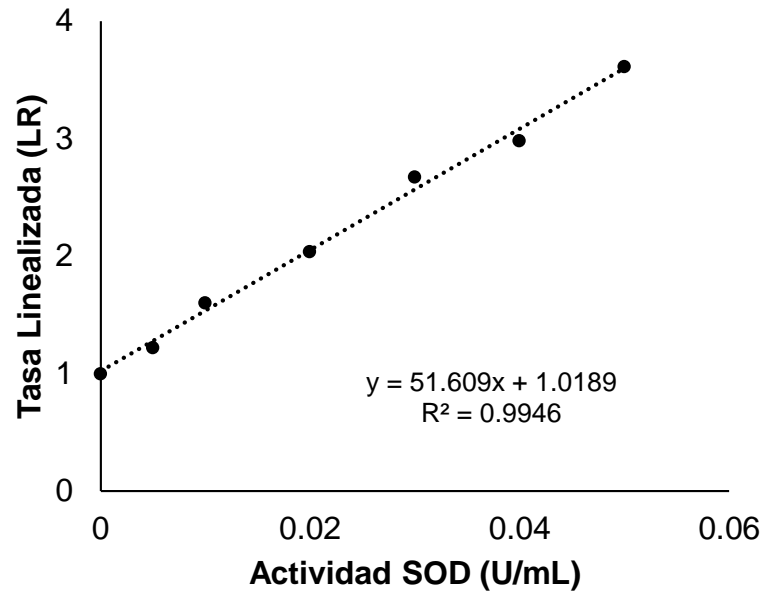
1. Diluir 20 µL de SOD Standard con 1.98 ml de Sample Buffer diluido previamente para obtener una Solución SOD Stock. Añadir los reactivos como aparecen en la Cuadro siguiente:

<b>Tubo</b>	<b>SOD Stock (µl)</b>	<b>Sample Buffer (µl)</b>	<b>Actividad SOD final (U/ml)</b>
<b>A</b>	0	1,000	0
<b>B</b>	20	980	0.005
<b>C</b>	40	960	0.010
<b>D</b>	80	920	0.020
<b>E</b>	120	880	0.030
<b>F</b>	160	840	0.040
<b>G</b>	200	800	0.050

**REALIZACIÓN DEL ENSAYO:**

1. Pozos del estándar SOD. Añadir 200 µL del Radical Detector diluido y 10 µL de Estándar (Tubos A-G) para cada pozo designado, recordar que es por duplicado.
2. Pozos de la muestra. Añadir 200 µL del Radical Detector diluido y 10 µL de la muestra para cada pozo designado
3. Iniciar la reacción por la adición de 20 µL de Xantina Oxidasa diluida para todos los pozos usados. Asegurarse de empezar a añadir la Xantina oxidasa tan rápido como sea posible.
4. Cuidadosamente agitar la placa de 96 pozos por pocos segundos para mezclar. Cubrir con la tapa.
5. Incubar la placa sobre un Shaker por 30 minutos a temperatura ambiente. Leer la absorbancia a 440- 460 nm usando un lector de placas.





## APÉNDICE VI PURIFICACIÓN DE BANDAS DE GEL

Purificación de bandas de gel (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System) de Promega

### **a. Disolviendo la banda de gel.**

1.- Después de la electroforesis, corte la banda de ADN a partir del gel y colóquelos en tubos Eppendorf de 1.5ml estéril.

2.-Adicione 10ul de solución “Membrane Binding” por cada 10mg de banda de gel. De vortex e incube de 50-65°C, hasta que se disuelva completamente el gel. Aprox. 10min.

### **b. Unión del DNA en la matriz de la minicolumna.**

1.- Inserte la mini-columna SV dentro del tubo colector.

2.-Tranfiere la mezcla del gel disuelto previamente (paso “b”) en la minicolumna y ensamble en el tubo colector. Incube por un minuto a temperatura ambiente.

3.- Centrifugue a 16000g por 1 min. Deseche el líquido de la columna colectora y reinserte la mini-columna en el tubo colector.

### **c. Lavado**

1.- Adicione 700ul de la solución “Membrane Wash Solution”( solución que se disolvió previamente en etanol). Centrifugue a 16000g por 1 min. Deseche el líquido y reinserte la mini-columna al tubo colector.

2.-Repita el lavado pero con 500ul de “Membrane Wash Solution” por 5 min. Elimine el residuo.

3.- Coloque nuevamente la mini-columna en el tubo colector ya vacío, y centrifugue por 1 min con la tapa de la micro centrífuga abierta, para permitir la evaporación de cualquier residuo de etanol.

### **d. Elución del ADN**

1.- Transfiere con cuidado la mini-columna a un tubo Eppendorf de 1.5ml limpio y estéril.

2.-Adicione 50ul de agua libre de nucleasas e incube por 1 min a temperatura ambiente. Centrifugue por 1minuto a 16000g.

3.-Deseche la mini-columna y almacene el ADN a 4°C o -20°C.

## APENDICE VII. Productividad

### Publicaciones

Vital López Patricia, Larralde Corona Claudia Patricia. (2016). Respuestas metabólicas al estrés de levaduras de importancia industrial. Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes 67, 86-91. ISSN 1665-4412, México.

Vital-López P., Ramírez-González M.S., Narváez-Zapata J.A., Larralde-Corona C.P. Tolerance to phenolic compounds by mezcal yeasts. Capítulo de libro AGAVE- ISA III 2016. *En evaluación*.

### Participación en Congresos

Vital-López Patricia, Ramírez-González Ma. Socorro, Narváez-Zapata José A., Larralde-Corona Claudia Patricia. Tolerance to phenolic compounds by mezcal yeasts. III Simposio Internacional del Agave, del 3 al 5 Noviembre de 2016, Guadalajara Jalisco. Oral.

Vital López Patricia. Caracterización de la tolerancia al estrés por compuestos azufrados en levaduras *Saccharomyces* y no- *Saccharomyces* aisladas de mezcal. I Congreso Binacional de Temas Biotecnológicos, CBG-IPN, 20-22 Junio de 2016, Reynosa Tamps. Poster.

De la Torre González Francisco J., Vital López Patricia, Narváez Zapata José A., Taillandier Patricia, Larralde Corona C. Patricia. Aplicación de levaduras de mezcal en la fermentación de vinos tinto y blanco. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, del 21 al 26 de Junio de 2015, Guadalajara (Jal), México. Poster.

### Divulgación en radio GAPE (Reynosa, Tamaulipas)

“Selección de cepas aisladas de la producción de mezcal para su futura aplicación en la producción de Bioetanol” 05 de Noviembre de 2015

“Tolerancia a estrés a compuestos fenólicos en levaduras y su posible mecanismo de tolerancia” 8 de Abril de 2016

“Levaduras de importancia Biotecnológica en el área industrial” 18 de Octubre de 2016