



**UNIVERSIDAD MICHUACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

TESIS

**“Estudio de la resistencia a compuestos tóxicos para la
producción de bioetanol lignocelulósico en levaduras
Kluyveromyces con remodelación de la cadena acil lipídica de
membranas”**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA:

Q. F. B. BELEM VARGAS OCHOA

ASESOR: D.C. ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

MORELIA, MICH. ENERO DE 2018

ÍNDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	ABSTRACT.....	2
3.	ANTECEDENTES	3
	3.1 Producción de bioetanol	3
	3.2 Utilización de biomasa lignocelulósica en la producción de bioetanol	4
	3.3 Compuestos tóxicos generados durante la producción de bioetanol	5
	3.4 Generación de estrés oxidante por compuestos tóxicos en la producción de bioetanol lignocelulósico	6
	1.4.1 Ácido acético	7
	1.4.2 Etanol	9
	1.4.3 Furfural	10
	3.5 Participación de las membranas de levaduras en la resistencia al estrés	12
	1.5.1 Membrana celular como sensor de estrés	13
	3.6 Influencia de los ácidos grasos en las características de la membrana y en la resistencia al estrés	15
	3.7 Modificación de la composición lipídica de membranas	17
	3.8 Transporte de ácidos grasos a través de las membranas	18
	3.9 Remodelación de la cadena acil lipídica de membranas.....	21
	3.10 Defensas celulares antioxidantes.....	22
4.	JUSTIFICACIÓN.....	23
5.	HIPÓTESIS.....	23
6.	OBJETIVOS.....	23
	6.1 Objetivo general	23
	6.2 Objetivos particulares	24
7.	MATERIALES Y MÉTODOS	24
	7.1 Levaduras	24
	7.2 Reactivos y solventes	24
	7.3 Condiciones de crecimiento aerobio	25
	7.4 Crecimiento anaerobio (adición de ácidos grasos)	25
	7.5 Determinación de la IC50	25
	7.6 Tratamiento con inhibidores	26
	7.7 Viabilidad celular	26

7.8 Lipoperoxidación	26
7.9 Carbonilación de proteínas.....	27
7.10 Lisis Celular	27
7.11 Determinación de superóxido dismutasa	27
7.12 Determinación de ERO mediante citometría de flujo	28
7.13 Extracción y cuantificación de ácidos grasos.....	28
7.14 Equipos	29
7.15 Análisis estadístico	29
8. RESULTADOS	30
8.1 Evaluación del efecto de la adición de ácidos grasos con diferente grado de insaturación sobre la composición membranal de <i>K. marxianus</i>	30
8.2 Análisis de la influencia de ácidos grasos con diferente grado de insaturación sobre la resistencia a estrés por compuestos tóxicos para la producción de bioetanol lignocelulósico.....	33
8.3 Determinación del efecto de la adición de ácidos grasos con diferente grado de insaturación sobre la respuesta antioxidante de <i>K. marxianus</i> durante el estrés por compuestos tóxicos para la producción de bioetanol lignocelulósico.	44
9. DISCUSIÓN.....	58
10. CONCLUSIÓN.....	65
11. REFERENCIAS	65

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco (CIATEJ), Unidad Zapopan, por recibirme durante una estancia.

A la UNAM-FES Iztacala por recibirme y permitirme realizar experimentación en sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

A mi asesor y comité por el apoyo que me otorgaron y por participar en mi formación.

1. RESUMEN

Debido a la demanda actual de combustibles alternos, se ha intensificado la investigación y el uso de bioetanol como combustible. El bioetanol se puede producir a partir de lignocelulosa como materia prima ya que este material es abundante, económico y posee grandes cantidades de azúcares fermentables. Sin embargo, durante su producción las levaduras enfrentan una variedad de cambios en el ambiente, como son la acumulación de etanol y compuestos tóxicos, principalmente el ácido acético y el furfural. Se ha demostrado que estos compuestos favorecen la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y cuando su producción prevalece sobre el sistema celular de defensa, se genera estrés oxidante que, a su vez, puede causar daño a ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, afectando la fermentación. Algunos autores han sugerido una relación entre la composición de ácidos grasos en los fosfolípidos de las membranas y la tolerancia a algunos tipos de estrés. Por lo tanto, fue de interés estudiar la relación entre la resistencia a compuestos tóxicos generados durante la producción de bioetanol lignocelulósico y el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas de la levadura *Kluyveromyces*, a través de biomarcadores de estrés oxidante. En el presente trabajo se determinó la resistencia de las levaduras *K. marxianus* OFF1 y SLP1 al ácido acético, el etanol y el furfural a través de ensayos de viabilidad. La viabilidad en ambas levaduras se mejoró al adicionar de forma independiente los ácidos grasos oleico, linoleico, linolénico y araquídico y utilizando la concentración inhibidora 50 (IC50) de etanol y furfural para cada levadura. Los niveles de lipoperoxidación, un efecto negativo del estrés oxidante, se redujo mediante la adición de los ácidos grasos mencionados anteriormente. Los niveles de ERO se redujeron mediante la adición de ácidos grasos oleico y araquídico. En conclusión, la adición de ácidos grasos a la levadura generó cambios en el perfil de las cadenas acil lipídicas de las membranas, lo que favoreció su resistencia a los compuestos tóxicos probados, reduciendo los efectos del estrés oxidante.

Palabras clave: ácidos grasos, bioetanol, estrés oxidante, *Kluyveromyces*

2. ABSTRACT

Due to the current demand for alternative fuels, the research and use of bioethanol as fuel has intensified. Bioethanol can be produced from lignocellulose as a raw material since this material is abundant, economical and has large amounts of fermentable sugars. However, during their production the yeasts face a variety of changes in the environment, such accumulation of ethanol and toxic compounds, mainly acetic acid and furfural, generating stress. This stress has been shown to favor the production of reactive oxygen species (ROS) and when their production prevails over the cellular defense system, oxidative stress is generated, which also can result in damage to nucleic acids, proteins and lipids, affecting the fermentation process. Several authors have suggested a relationship between the fatty acid composition of phospholipid membranes and tolerance to some types of stress. Therefore, it was of interest to study the relationship between resistance to toxic compounds generated during bioethanol production and the degree of unsaturation of the fatty acids of the yeast membranes of *Kluyveromyces*, through oxidative stress biomarkers. In the present work the resistance of the yeasts *K. marxianus* OFF1 and SLP1 against the acetic acid, ethanol and furfural was determined through viability assays. Viability in both yeasts was improved with the addition of oleic, linoleic, linolenic and arachidic fatty acids in separate way at the inhibitory concentration 50 (IC50) of ethanol and furfural for each yeast. The rate of lipoperoxidation, a negative effect of oxidative stress, was reduced in by the addition of the fatty acids mentioned above. Levels of ROS were reduced by the addition of oleic and arachidic fatty acids. In conclusion, the addition of fatty acids to the yeast generated changes in the acil lipid chains profile of yeast membranes which favored its resistance to the toxic compounds tested reducing the effects of the oxidative stress.

3. ANTECEDENTES

3.1 Producción de bioetanol

La mejora del nivel de vida insta a la búsqueda de fuentes alternativas de energía para satisfacer el consumo energético en todo el mundo. El uso de combustibles fósiles como los principales recursos energéticos ha causado el surgimiento de problemas mundiales como la contaminación y el calentamiento global (Hoekman, 2009; Azhar *et al.*, 2017). Estos resultados condujeron a la búsqueda de energía amigable con el medio ambiente, renovable y sostenible por parte del gobierno y los sectores industrial y energético. Entre las energías renovables, se dio prioridad a los biocombustibles líquidos, ya que representan alrededor del 40% del consumo total de energía en el mundo. El uso de biocombustibles líquidos contribuye a la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero, oportunidades de empleo, desarrollo regional y seguridad en el suministro (Demirbas y Balat, 2006; Azhar *et al.*, 2017).

El bioetanol también se conoce como alcohol etílico o químicamente C_2H_5OH o EtOH. Puede ser utilizado directamente como etanol puro o mezclado con gasolina para producir "gasohol". Se puede utilizar como mejorador de la gasolina aumentando su octanaje y en mezclas de bioetanol-diesel para reducir la emisión de gases de desecho (Balat y Balat, 2009). El bioetanol ofrece varias ventajas sobre la gasolina, como el índice de octano más alto (108), límites más altos de inflamabilidad, velocidades de llama más elevadas y mayor calor de vaporización (Balat y Balat, 2009; Azhar *et al.*, 2017). En contraste con el petróleo, el bioetanol es menos tóxico, fácilmente biodegradable y produce menos contaminantes atmosféricos.

Se han utilizado en la producción de bioetanol en la primera y segunda generación una variedad de materias primas. Por ejemplo, el bioetanol de primera generación implica materias primas ricas en sacarosa (caña de azúcar, remolacha azucarera, sorgo dulce y frutas) y almidón (maíz, trigo, arroz, patata, yuca, batata y cebada). Sin embargo, el bioetanol de segunda generación proviene de la biomasa lignocelulósica, como la madera, la paja y las hierbas (Nigam y Singh, 2011).

Anualmente se producen en el mundo alrededor de 100 mil millones de litros de etanol como combustible, principalmente con la utilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual lleva a cabo la fermentación de azúcares a partir de caña de azúcar y almidón de maíz. Sin embargo, existe gran interés en el uso de lignocelulosa como materia prima para la producción de etanol, ya que esta fuente es mucho más abundante y, lo más importante, no representa un riesgo en el suministro de alimentos (Caspeta *et al.*, 2015). La biomasa lignocelulósica, como residuos agrícolas y de bosques, son considerados como potenciales fuentes renovables, viables y sostenibles para la producción de etanol, debido a que contienen grandes cantidades de azúcares potencialmente fermentables (Goshima *et al.*, 2013).

3.2 Utilización de biomasa lignocelulósica en la producción de bioetanol

Los compuestos lignocelulósicos incluyen madera, hierba, desechos forestales, desechos agrícolas y residuos de cosechas (bagazos). Los principales constituyentes de la lignocelulosa son celulosa, hemicelulosa y lignina. Los azúcares contenidos en estos compuestos pueden ser liberados por hidrólisis y subsecuentemente fermentados a etanol por microorganismos. La celulosa es un polímero lineal de alto peso molecular formado por unidades de D-glucosa unido por enlaces β -1-4 y el cual puede aparecer como un material altamente cristalino (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000). La hemicelulosa es un polisacárido ramificado que está contituido por las pentosas D-xilosa y L-arabinosa y las hexosas D-manosa, D-glucosa, D-galactosa y ácidos urónicos. La estructura ramificada de la hemicelulosa produce más fácilmente hidrolizados que la celulosa. La lignina es un polímero aromático sintetizado a partir de precursores fenilpropanoides. Las ligninas se dividen en dos clases, nombradas guaiacil ligninas y guaiacil siringil ligninas que difieren en los sustituyentes del esqueleto fenilpropanoide (Caspeta *et al.*, 2015).

sustituidos, son los compuestos inhibidores dominantes que se encuentran en los hidrolizados lignocelulósicos. Estos compuestos, resultan tóxicos para las células fermentativas, por lo cual, estos microorganismos deben ser capaces de generar los mecanismos de adaptación necesarios (Caspeta *et al.*, 2015).

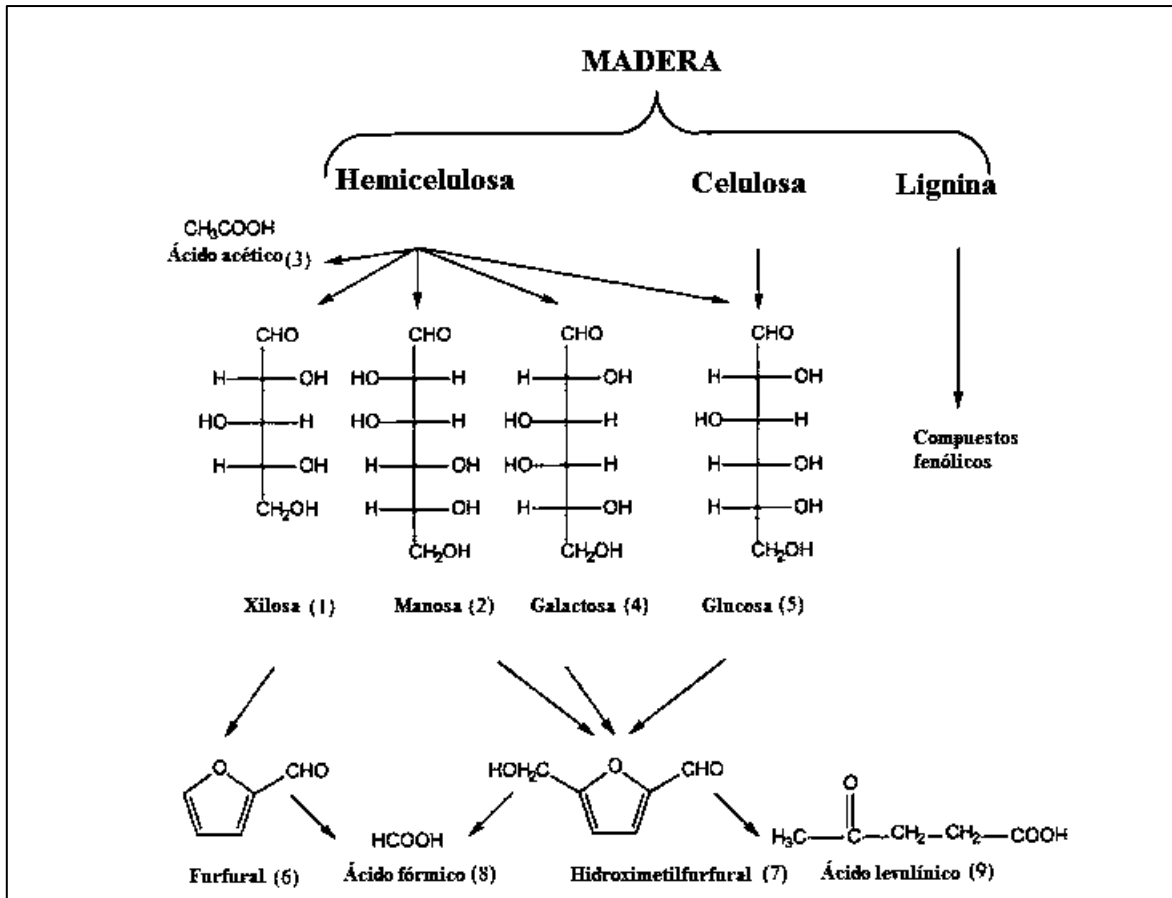


Figura 2. Reacciones que ocurren durante la hidrólisis de materiales lignocelulósicos (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000).

3.4 Generación de estrés oxidante por compuestos tóxicos en la producción de bioetanol lignocelulósico

Durante la producción industrial de bioetanol mediante el uso de células de levaduras, dichas células enfrentan una variedad de cambios en el ambiente, como incremento en la presión osmótica, acumulación de etanol, dióxido de carbono y otros compuestos tóxicos, así como un descenso en la cantidad de nutrientes (Attfield, 1997; Dinh *et al.*, 2008). De esos cambios ambientales, la

acumulación de etanol y productos como el ácido acético y furfural durante el cultivo, causa estrés a las células de levaduras, lo que conlleva a un descenso en el crecimiento celular y en la producción de bioetanol (Dinh *et al.*, 2008). Por lo cual, se ha intensificado el interés por encontrar microorganismos capaces de resistir condiciones adversas generadas durante estos procesos y que a la vez sean capaces de mantener sus actividades metabólicas estables (Caspeta *et al.*, 2015). Esto se puede lograr generando fenotipos de células tolerantes como *S. cerevisiae* o *K. marxianus*, capaces de disminuir los efectos de condiciones inhibitorias de las funciones celulares, necesarias para dichos procesos.

Durante los procesos industriales como la producción de bioetanol, las levaduras están expuestas a diversos factores de estrés nutricional y ambiental. Esta condición induce estrés oxidante debido a la disminución del pH intracelular y la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ERO), que conduce al daño celular y la disminución de la capacidad de fermentación (Atffield, 1997). Las ERO son subproductos normales del metabolismo celular. Sin embargo, cuando su producción prevalece sobre el sistema celular de defensa, se genera la condición conocida como estrés oxidante, lo cual puede resultar en daños a los ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y orgánulos celulares (Gibson *et al.*, 2007). De acuerdo con esto, las levaduras muestran correlaciones entre la capacidad fermentativa y la resistencia al estrés oxidante. De esta forma, la capacidad para disminuir el contenido de ERO intracelulares, está involucrada en el mantenimiento de la capacidad fermentativa de las levaduras (Landolfo *et al.*, 2010).

1.4.1 Ácido acético

El ácido acético es un subproducto normal de la fermentación alcohólica realizado por levaduras como *S. cerevisiae* o *K. marxianus*, o puede ser originado a partir del pretratamiento del material lignocelulósico para la obtención de azúcares fermentables. Dicho pretratamiento consiste en la hidrólisis de lignocelulosa catalizada por ácidos, en el cual, el ácido acético procede de la hidrólisis de los

grupos acetilo de la hemicelulosa (Figura 2) (Wallace, 2014). La hemicelulosa y la lignina en la pared celular de la planta están acetiladas, produciendo ácido acético como un componente inevitable en hidrolizados celulósicos con concentraciones de ácido acético que oscilan entre 1 y 15 g/l (16-250 mM) (Wei *et al.*, 2013). En la producción de bioetanol a partir de hidrolizados lignocelulósicos, el ácido acético se asocia con la inhibición de la fermentación alcohólica, lo que limita la productividad del proceso. Por lo tanto, el ácido acético tiene un impacto negativo en el rendimiento de levaduras, reprimiendo la eficiencia de la producción de bioetanol.

Las consecuencias directas del estrés por el ácido acético incluyen una disminución del pH intracelular, inhibición del crecimiento y muerte celular apoptótica (Zheng *et al.*, 2011). El ácido acético propicia la generación de especies reactivas de oxígeno, que inducen la muerte celular programada (PCD), ya sea con la participación de la mitocondria (vía intrínseca) o con la intervención de caspasas citosólicas, que implica la vía extrínseca. De acuerdo con Semchyshyn *et al.* (2011), la exposición de levaduras a ácido acético aumenta el nivel de proteínas modificadas por oxidación y la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa. La toxicidad del ácido acético es dependiente del pH, en su forma aniónica, es lipofílico y difunde a través de la membrana celular en su forma no disociada, que es la que prevalece a valores externos de pH inferiores a 4.8. Una vez que el ácido entra en la célula de levadura, éste se disocia y el pH intracelular disminuye. La acumulación excesiva de protones se bombea fuera de las células por diversos mecanismos, incluyendo la translocación de protones con la H⁺-ATPasa de membrana plasmática mediada por la hidrólisis de ATP. Este proceso celular puede ser muy demandante en cuanto a la utilización de ATP. La evidencia sugiere que la exportación de protones es la principal causa de la reducción en la tasa de crecimiento de levaduras con exposición a los ácidos (Caspeta *et al.*, 2015). De acuerdo con Semchyshyn *et al.* (2011) el transportador de unión a adenosina-5'-trifosfato (ATP), de la familia de transportadores ABC, Pdr12p es el responsable de la salida de aniones producidos por ácidos orgánicos débiles como el ácido acético.

1.4.2 Etanol

El etanol es el producto de la fermentación más importante mundialmente. Se utiliza en muchos aspectos de la vida humana, incluyendo el consumo de bebidas alcohólicas y el uso de biocombustibles a base de etanol. Sin embargo, la producción eficiente de etanol se enfrenta a un riguroso problema, este es, que los microorganismos utilizados para la fermentación mueren cuando los niveles de etanol superan una cierta concentración (Kitagaki *et al.*, 2007). Una de las principales ventajas de *S. cerevisiae* para la producción de etanol es la alta tolerancia que esta levadura muestra respecto a otros microorganismos. Por ejemplo, mientras que *Escherichia coli* y *Zymomonas mobilis* tienen tolerancias máximas en torno a 60-127 g/l (Lee *et al.*, 1980; Yomano *et al.*, 1998; Caspeta *et al.*, 2015), *S. cerevisiae* puede tolerar concentraciones de etanol hasta entre 115 y 200 g/l. Sin embargo, concentraciones más altas de 150 g/l de etanol pueden ser necesarias para reducir los costos en la producción de bioetanol (Caspeta *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que el etanol es un metabolito tóxico para las células de levadura e induce respuestas al estrés (Saharan y Sharma, 2010). La toxicidad del etanol se asocia con su capacidad para suprimir la biosíntesis de macromoléculas, la desnaturalización de las proteínas citoplasmáticas, reducción en la actividad de enzimas glicolíticas, alteración en el transporte de iones y metabolitos a través de la membrana plasmática (Saharan y Sharma, 2010) y la alteración en la composición lipídica de la membrana (Costa *et al.*, 1997; Dinh *et al.*, 2008). El estrés con etanol inhibe el sistema de transporte de aminoácidos y el transporte de glucosa, y puede conducir a la pérdida de viabilidad celular y la inhibición del crecimiento celular (Lei *et al.*, 2007). Dado que, el estrés por etanol afecta principalmente la membrana plasmática, se ha reportado que la tolerancia al etanol de la levadura está relacionada con la composición de los lípidos de dicha estructura, por ejemplo, los fosfolípidos (Aguilera *et al.*, 2006; Lei *et al.*, 2007).

Por otro lado, también se ha informado que las ERO participan en muchas formas de apoptosis en la levadura. De acuerdo con Kitagaki *et al.* (2007), se caracterizó la muerte celular inducida por etanol en levadura, en comparación con la apoptosis en la levadura y otros tipos de células, y encontraron que la apoptosis inducida por etanol es mediada por la vía de la fisión mitocondrial (vía intrínseca). Las ERO están involucradas en la apoptosis inducida por el etanol, de acuerdo con investigaciones que estudiaron el efecto de etanol en células de levadura. Por ejemplo, la pérdida de superóxido dismutasa, originó células de levadura sensibles a etanol (Costa *et al.*, 1997), lo que sugiere que la actividad antioxidante de la enzima superóxido dismutasa protege a las células de ERO inducidas por etanol. Por otra parte, otro estudio informó, desde el análisis de microarreglos, que los genes implicados en la defensa antioxidante son sobrerregulados en respuesta a etanol (Alexandre *et al.*, 2001). Este conjunto de datos refuerza el modelo de que las ERO están involucradas en la apoptosis inducida por etanol (Kitagaki *et al.*, 2007).

1.4.3 Furfural

Químicamente, el 2-furaldehído (furfural) está formado por un anillo heteroaromático de furano y un grupo funcional aldehído. Puede formarse por deshidratación de pentosas, como se muestra en la figura 3 (Almeida *et al.*, 2009). El furfural es producido a partir de la hemicelulosa de vegetales ricos en xilosa, como productos de desecho tales como mazorcas de maíz y la cáscara de arroz (Sangarunlert *et al.*, 2007). Se forman durante el pretratamiento ácido de lignocelulosa, que es necesario para la hidrólisis de hemicelulosa y sacarificación enzimática (Gorsich *et al.*, 2006). La concentración de este inhibidor puede variar en función del tipo de biomasa y de las condiciones de la hidrólisis. En un hidrolizado típico de residuos de maíz (hojas, tallos y mazorcas) tratado con ácido, se ha reportado una concentración de alrededor de 2.2 g/l (~ 23 mM) de furfural (Maciel de Mancilha y Karim 2003).

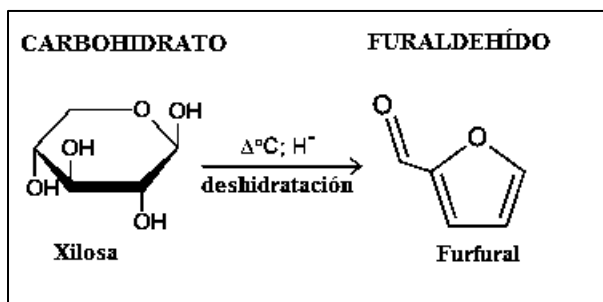


Figura 3. Obtención de furfural a partir de xilosa (Almeida *et al.*, 2009).

El furfural causa en levaduras como *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia stipitis*, y otras, una reducción en la velocidad de fermentación y/o detiene el crecimiento y entra en una fase de latencia prolongada (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000). La viabilidad de *S. cerevisiae* se reduce también. Bajo condiciones anaeróbicas y también durante el metabolismo respiro-fermentativo, la levadura *S. cerevisiae* puede metabolizar el furfural a su alcohol derivado menos tóxico, 2-furilmetanol, con la participación de oxidorreductasas que usan NADPH como un cofactor, un proceso metabólico que ocurre a alta velocidad enzimática. Su conversión aumenta la demanda de energía celular para el mantenimiento y reduce la concentración de cofactores redox (Ask *et al.*, 2013; Caspeta *et al.*, 2015). La vía de las pentosas fosfato (PPP) es esencial para la tolerancia al furfural. Gorsich *et al.* (2006), sugirieron que el NADPH producido en esta vía puede funcionar en algo más que en la conversión del furfural, ya que las células de levadura que carecen de una PPP funcional tienen mayor sensibilidad al daño oxidante. Esta sensibilidad puede deberse a una deficiencia de NADPH, que es cofactor esencial para las enzimas de protección contra el estrés oxidante, que incluyen glutatión reductasa y tiorredoxina reductasa (Almeida *et al.*, 2009).

La reducción del furfural a 2-furilmetanol sucede durante la fase de latencia, después de lo cual el crecimiento se restablece (Caspeta *et al.*, 2015). El retraso observado en el crecimiento puede ser consecuencia de una reducción de la energía celular disponible, causada por la inhibición de enzimas, inhibición de enzimas glicolíticas y fermentativas tales como alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa y dos enzimas glicolíticas clave, hexoquinasa y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Almeida *et al.*, 2009).

Además, los efectos tóxicos ocasionados por los furanos pueden deberse a que, al ser aldehídos, son compuestos químicamente reactivos y que forman compuestos con biomoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y además, producir daños sobre la membrana plasmática (Zaldivar *et al.*, 1999; Almeida *et al.*, 2009). Se ha demostrado que el furfural induce la acumulación de ERO y daña el citoesqueleto de actina y la cromatina, así como las mitocondrias y las vacuolas, ambos compartimentos participan en la regulación del equilibrio redox del citosol (Allen *et al.*, 2010). También, se ha demostrado que el furfural actúa como reactivo electrófilo con los grupos tioles y de esta forma, es capaz de generar estrés oxidante (Kim y Hahn, 2013; Wallace, 2014).

3.5 Participación de las membranas de levaduras en la resistencia al estrés

Las membranas llevan a cabo una serie de funciones fisiológicas. Estas incluyen proporcionar una barrera de difusión, un medio para proteínas de la superficie celular, una superficie flexible para cambios morfológicos, una superficie dinámica para eventos como endocitosis y ser precursoras de señalización celular (Ayyash *et al.*, 2014).

En levaduras, la matriz lipídica de la membrana está constituida por glicerofosfolípidos, esteroides y esfingolípidos. Los glicerofosfolípidos, también denominados fosfolípidos, son el lípido estructural más abundante (Renne *et al.*, 2015). Los fosfolípidos más abundantes en las levaduras son: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina y ácido fosfatídico, con menores cantidades de diacilglicerol-citidínofosfato (Carman y Han, 2009). Tales cantidades relativas de estos fosfolípidos dependen de una serie de factores incluidos la cepa de levadura, disponibilidad de nutrientes, temperatura y fase de crecimiento (Carman y Henry, 2007; Carman y Han, 2009). Los fosfolípidos se clasifican en diferentes clases definidos por la naturaleza del enlace fosfodiéster en la posición sn - 3 del esqueleto de glicerol. Dentro de cada clase de fosfolípidos, se encuentran múltiples especies moleculares definidas por la cadena acilo esterificadas en las posiciones sn-1 y sn-2 del esqueleto de glicerol que

varían en longitud y grado de insaturación. Cada clase de fosfolípidos tiene propiedades físico-químicas específicas determinada por la composición de las cadenas acilo. La composición de las cadenas acilo difieren entre clases de fosfolípidos, por ejemplo, en levaduras, las cadenas acilo insaturadas enriquecen principalmente fosfatidiletanolamina (PE) y cardiolipina (CL), mientras que las cadenas acilo saturadas se encuentran principalmente en el fosfatidilinositol (PI) (Renne *et al.*, 2015).

La membrana celular es una barrera que separa los microorganismos del ambiente externo y también sirve como un sensor directo al medio ambiente del organismo. Su estructura lipídica es clave para determinar el ambiente físico-químico de la membrana (Rodríguez-Vargas *et al.*, 2007; Leach y Cowen, 2014). Algunos autores han sugerido una relación entre la composición de la membrana y la tolerancia a algunos tipos de estrés, incluyendo el etanol, temperaturas bajas, cambios en la temperatura, presión hidrostática, congelamiento, sal y agentes sanitizantes (Aguilera *et al.*, 2006; Rodríguez-Vargas *et al.*, 2007; Landolfo *et al.*, 2010). Esto se debe a que las membranas no sólo tienen una estructura de bicapa lipídica, sino también, proteínas que se encuentran incrustadas o con lípidos asociados. Las bicapas lipídicas son estructuras dinámicas y contienen áreas de heterogeneidad que son vitales para la función de las membranas celulares (Vigh *et al.*, 2005). El estado físico (líquido o sólido) de los lípidos de membrana regula directamente la actividad de proteínas ligadas a esta estructura. Asimismo, alteraciones en los componentes lipídicos de la membrana pueden cambiar la actividad de las proteínas que sirven como canales de iones, transportadores, receptores, traductores de señales, enzimas y, por lo tanto, influir profundamente en la función celular y en la respuesta al estrés (Field, 2000; Volmer *et al.*, 2013).

1.5.1 Membrana celular como sensor de estrés

La membrana plasmática es un componente crítico en la transducción de señales ocasionado por el estrés. Las células perciben el estrés ambiental mediante proteínas incrustadas en sus membranas. Estas proteínas transfieren las señales desde el medio, mediante vías de señalización, con la subsecuente regulación de

la expresión génica (Serrazanetti *et al.*, 2015). Sin embargo, modificaciones químicas y genéticas de las propiedades físicas de los lípidos de la membrana, pueden tener efectos similares sobre la expresión de genes que participan en la aclimatación de las células a distintas condiciones (Henderson y Block, 2014). Un ejemplo es el de *S. cerevisiae* cuando se observó que, al aumentar la saturación de ácidos grasos de los lípidos de la membrana plasmática, aumentó la expresión del gen para la proteína de choque térmico 90 (Hsp90) (Carratu *et al.*, 1996). Este resultado sugiere que, en las células de levadura, la expresión del gen de choque térmico depende de la fluidez de la membrana. Chatterjee *et al.* (2000) observó que un aumento en el porcentaje de ácidos grasos insaturados en células de levadura se correlacionó con una disminución en la inducción de la respuesta general a estrés (GSR) ocasionada por calor y sal en *S. cerevisiae*. Estos estudios contribuyen al modelo de las membranas como potenciales sensores de estrés, donde los cambios en la fluidez de la membrana generan cambios en la expresión de genes que aseguran la aclimatación a un nuevo conjunto de condiciones ambientales (Los y Murata, 2004). El concepto de la membrana como sensor postula que las membranas no son solo los objetivos de daño celular durante el estrés, sino que, además, las alteraciones del estado físico de la membrana y/o la composición, pueden funcionar en eventos iniciales de percepción de estrés, así como en procesos de adaptación. En el modelo propuesto, la intercomunicación entre las membranas y la expresión génica de *hsp* (proteínas de choque térmico), forma una retroalimentación que regula de la siguiente manera: durante las condiciones de estrés las modificaciones del estado físico de la membrana (cambios en la fluidez) activan la transcripción de los genes *hsp*. Las HSP sintetizadas además de proteger y ayudar en el plegamiento de proteínas, interactúan con las membranas restableciendo así el orden en los lípidos y el estado físico adecuado de la membrana. Esto a su vez apaga la generación de la señal de estrés conduciendo a una disminución en la respuesta al estrés (Balogh *et al.*, 2005).

Leach y Cowen (2014) dilucidaron si *Candida albicans* utiliza la fluidez de la membrana como sensor directo de la temperatura. Determinaron que, en

respuesta a un incremento de temperatura disminuyen los niveles de *OLE1* que codifica una desaturasa de ácidos grasos. Subsecuentemente la delección de *OLE1* induce la expresión de *FAS2*, que codifica una sintasa de ácido graso. Mostraron que la delección de *OLE1*, impide la activación satisfactoria del factor de transcripción Hsf1, lo que contribuye a una reducción en la expresión de proteínas de choque térmico en respuesta al choque térmico, y que la reducción en la activación Hsf1 es atribuible a la E3 ubiquitin ligasa Rsp5, que regula *OLE1* a través del factor de transcripción Spt23. De esta forma, se estableció por primera vez en levaduras un mecanismo molecular que relaciona la fluidez de la membrana y la respuesta de choque térmico.

3.6 Influencia de los ácidos grasos en las características de la membrana y en la resistencia al estrés

Los ácidos grasos son compuestos bioactivos involucrados en el transporte intracelular, señalización, endocitosis y control transcripcional, además sirven como sustratos para la β -oxidación y biosíntesis de fosfolípidos, esfingolípidos y esteroides presentes en las membranas (Dickinson y Schweizer, 2004).

Los ácidos grasos insaturados desempeñan un papel esencial en las características biofísicas de las membranas celulares y determinan el correcto funcionamiento de las proteínas de membrana (Rodríguez-Vargas *et al.*, 2007). Además, cambios en la composición de la membrana son reflejados en la modificación de las propiedades físicas de la superficie celular (Gianotti *et al.*, 2008), incluyendo la temperatura de la fase de transición y microviscosidad (Mejia *et al.*, 1999). Fosfolípidos con ácidos grasos insaturados tienen menor punto de fusión y mayor flexibilidad que los fosfolípidos con cadenas acilo saturadas (Murata y Wada, 1995). La generación de ácidos grasos insaturados involucra la inducción de desaturasas de ácidos grasos (Weber *et al.*, 2001), las cuales incorporan enlaces insaturados en posiciones definidas en los ácidos grasos que están unidos a los glicerolípidos de las membranas (Rodríguez-Vargas *et al.*, 2007

Dependiendo de la presencia de enlaces dobles, los ácidos grasos se clasifican en tres grupos principales: (1) ácidos grasos saturados (SFA, por sus siglas en inglés), que no contienen dobles enlaces; (2) ácidos grasos monoinsaturados (MUFA, por sus siglas en inglés), que contienen un doble enlace y (3) ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés), que contienen al menos dos enlaces dobles. De acuerdo con la posición del primer doble enlace desde el extremo metilo del ácido graso, los PUFAs se describen como n-3, n-6 o n-9. La composición de grupos acilo de los lípidos de membrana determina la fluidez de la membrana, la permeabilidad, las estructuras de las balsas lipídicas y, como consecuencia, la transducción de señales (Papackova y Cahova, 2015). La fluidez es un término amplio adoptado para describir el estado físico de las membranas biológicas y depende de la curvatura, la microviscosidad, el nivel de compactación, la estructura y la composición de los lípidos (Maulucci *et al.*, 2016). La fluidez de la membrana aumenta de acuerdo con el mayor contenido de ácidos grasos insaturados ($n-3$ PUFA > $n-6$ PUFA > MUFA > SFA) (Papackova y Cahova, 2015). Algunos organismos han desarrollado mecanismos para mantener una apropiada fluidez en los lípidos de las membranas con respecto a la temperatura ambiental y otros tipos de estrés. Estos mecanismos incluyen cambios en las proporciones y tipo de lípidos, así como alteraciones en la proporción lípido/proteína. El cambio más ampliamente reconocido en la membrana celular a bajas temperaturas es la insaturación de las cadenas acil lipídicas (Rodríguez-Vargas *et al.*, 2007).

Los ácidos grasos presentes en los glicerolípidos de membranas consisten en un amplio rango de especies, que van desde 14 a 26 carbonos con uno a seis dobles enlaces. Los ácidos grasos más comunes esterificados al glicerol de los fosfolípidos de levaduras son el ácido palmítico (C_{16:0}), ácido palmitoléico (C_{16:1}), ácido esteárico (C_{18:0}) y ácido oleico (C_{18:1}) (McDonough *et al.*, 1992).

Ácido oleico (18:1)

El ácido oleico es un ácido graso monoinsaturado de la serie omega 9. Su fórmula química molecular es C₁₈H₃₄O₂. Su nombre IUPAC es ácido cis-9-octadecenoico. (Murray *et al.*, 2010).

Ácido linoleico (18:2)

El ácido linoleico es un ácido graso monoinsaturado de la serie omega 6. Su nombre IUPAC es ácido cis-9,12-octadecadienoico, su fórmula molecular es $C_{18}H_{32}O_2$ (Murray *et al.*, 2010).

Ácido linolénico (18:3)

El ácido linolénico es un ácido graso, poliinsaturado, omega-3 (el isómero α) u omega 6 (el isómero γ), formado por una cadena de 18 carbonos con 3 dobles enlaces. Su fórmula molecular es $C_{18}H_{30}O_2$ (Murray *et al.*, 2010).

Ácido araquídico (20:0)

El ácido araquídico, también denominado ácido eicosanoico, es un ácido graso saturado, su fórmula molecular es $C_{20}H_{40}O_2$ (Murray *et al.*, 2010).

3.7 Modificación de la composición lipídica de membranas

Cambios en los ácidos grasos que componen la membrana son fundamentales para mantener tanto la integridad, como su funcionalidad después de la exposición al estrés ambiental (Serrazanetti *et al.*, 2015). La capacidad de las células para alterar el grado de insaturación en sus membranas es un factor importante en la aclimatación celular a las condiciones ambientales (Rodríguez-Vargas *et al.*, 2007).

S. cerevisiae puede formar *de novo* todos los ácidos grasos que requiere. El oxígeno molecular es requerido durante la biosíntesis de ácidos grasos saturados así como ergosterol (Bisson, 1999). También puede incorporar una amplia variedad de ácidos grasos exógenos, provenientes del medio de crecimiento, de cadenas largas, saturados y poliinsaturados, los cuales son incorporados rápidamente en los lípidos de las membranas (Choi *et al.*, 1996; Bossie 1989; McDonough *et al.*, 1992). Una suplementación de los cultivos de *Saccharomyces* con ácidos grasos insaturados como 18:2 o 18:3 puede producir cambios radicales en la composición de grupos acilo en los lípidos de las membranas, reprimiendo la

actividad de desaturasas y reemplazando las especies nativas monoinsaturadas con los ácidos grasos suplementados, mediante mecanismos detallados de transporte de ácidos grasos, activación (acilación vectorial) y recambio de las cadenas acilo en los fosfolípidos de las membranas (Martin *et al.*, 2007). Por otro lado, Janssens *et al.* (1983) demostraron que la capacidad de fermentación de una cepa de *Kluyveromyces fragilis* se mejoró drásticamente por la adición de ácidos grasos insaturados y ergosterol al medio de crecimiento.

3.8 Transporte de ácidos grasos a través de las membranas

El transporte de ácidos grasos es definido como el movimiento del ácido graso desde el espacio extracelular hacia el compartimento citosólico intracelular. Este proceso no se puede definir simplemente en términos del movimiento del ácido graso de un lado al otro de la membrana, aunque esto es un componente central del proceso global (Black y DiRusso, 2003).

El transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de las membranas celulares es un proceso multifacético, que involucra la liberación de los ácidos grasos a la membrana, movimiento transmembranal y abstracción. Las concentraciones de ácidos grasos libres en el medio extracelular y dentro de las células son particularmente bajos como consecuencia de su relativa insolubilidad en condiciones acuosas. Para compensar su baja solubilidad, mecanismos específicos han evolucionado para regular el movimiento, el almacenamiento y la utilización de los ácidos grasos entre y dentro de las células (Zou *et al.*, 2002).

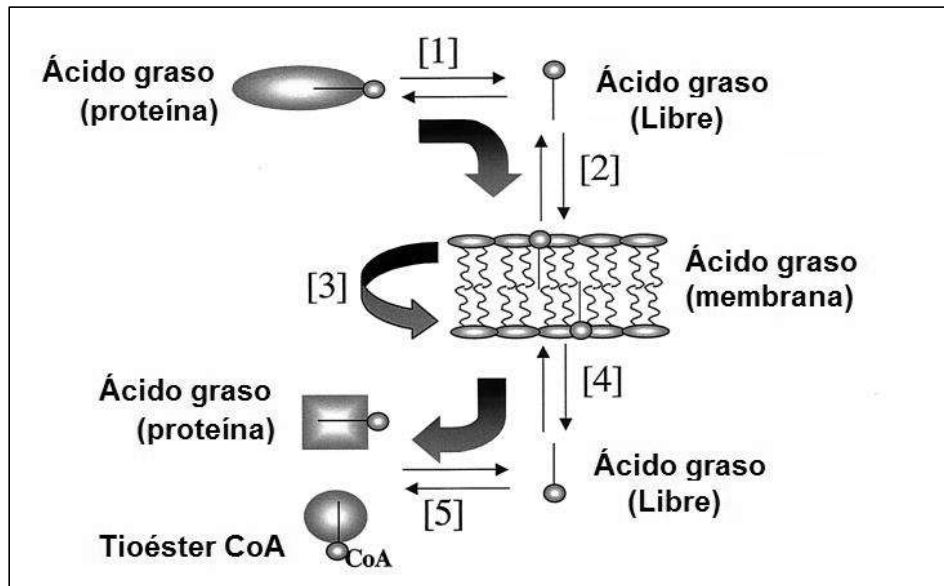
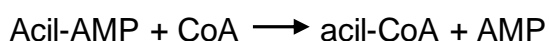
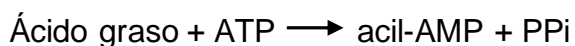


Figura 4. Transporte de ácidos grasos (Black y DiRusso, 2003).

El sistema de transporte de ácidos grasos que funciona a través de un mecanismo acoplado de activación y transporte de ácidos grasos es denominado acilación vectorial (Figura 4). Este término fue acuñado por Peter Overath que reconoció la importancia de las acil-CoA sintetetas (ACS) en este proceso. El transporte de ácidos grasos requiere tanto FAT1P (el ortólogo de levadura de las proteínas de transporte de ácidos grasos en mamíferos [FATP]) y una ACS, ya sea FAA1P o FAA4P (Black y DiRusso, 2007). Ambas proteínas funcionan en conjunto como componentes de un aparato de transporte de ácidos grasos, que da como resultado el transporte y la activación concomitante de ácidos grasos a tioésteres de coenzima A (CoA) (Black y DiRusso, 2003). Las ACS son una familia de enzimas que catalizan la tioesterificación de ácidos grasos con CoA para formar intermediarios activados, que desempeñan un papel fundamental en el metabolismo de los lípidos y la homeostasis de los procesos relacionados con los lípidos (Black y DiRusso, 2007). Las ACS catalizan la formación del acil-CoA mediante un proceso de dos etapas procediendo a través de la hidrólisis del ATP para producir pirofosfato. (Black y DiRusso, 2003).



Se han identificado y caracterizado dos genes que codifican dos isoformas de ACS (*faa1* y *faa4*), que están implicados en la activación de ácidos grasos exógenos de cadena larga y un gen que codifica el ortólogo en levaduras de la proteína de transporte de ácidos grasos de mamíferos (FAT1) (Black y DiRusso, 2003).

En las levaduras, los ácidos grasos de cadena larga importados por FAT1P se convierten en tioésteres CoA por las ACS FAA1P o FAA4P. Los ácidos grasos de cadena larga en forma de acil-CoA pueden seguir distintas rutas ya sea que se incorporen en fosfolípidos, pueden ser también utilizados como sustrato en la acilación de proteínas y como fuentes de carbono y de energía. Los acil-CoA de cadena larga intracelular se presume que se unen a la proteína de unión a acil-CoA (ACBP), que actúa para amortiguar a la célula de las propiedades detergentes de estos compuestos, así como proporcionar un medio de orientación intracelular (Black y DiRusso, 2003).

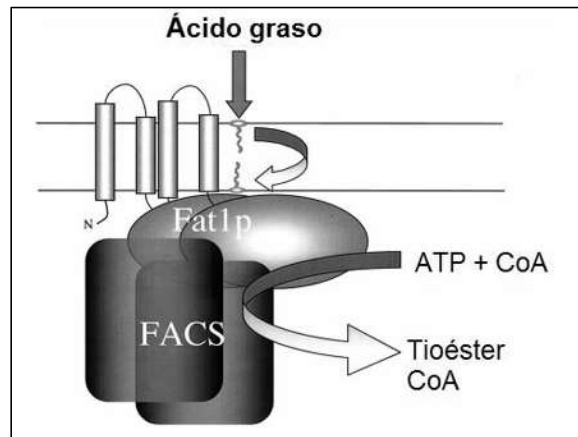


Figura 5. Acilación vectorial (Black y DiRusso, 2003).

El crecimiento en presencia de oleato de ácido graso de cadena larga da lugar a la represión de *ole1*, que codifica la desaturasa de ácidos grasos. En este sentido, el tráfico intracelular de estos compuestos está altamente regulado para mantener la homeostasis celular (Black y DiRusso, 2003).

3.9 Remodelación de la cadena acil lipídica de membranas

La homeostasis lipídica de la membrana celular se mantiene mediante síntesis *de novo*, transporte intracelular, remodelación y degradación de lípidos (Renne *et al.*, 2015). Los glicerofosfolípidos, el componente estructural más abundante de las membranas eucariotas, están sujetos a una remodelación de la cadena de acilo, la cual se define como el proceso post-sintético en el que se intercambian una o ambas cadenas de acilo. Lands (1960) fue el primero en reportar el intercambio en la cadena acilo fosfolipídica; él observó que la lisofosfatidilcolina (lysoPC) formada por la acción de la fosfolipasa A (PLA) puede ser reacilada por una aciltransferasa en una forma dependiente de acil-CoA (Figura 6). Este proceso de dos etapas conocido como el ciclo de Lands se propuso que adapta el perfil de las especies de fosfatidilcolina para obtener el espesor y la fluidez deseados de las membranas celulares. Mecanismos alternativos de intercambio de la cadena de acilo incluyen un intercambio de ambas cadenas acilo con glicerofosfodiésteres como intermediarios y transferencia de acilo independiente de Acil-CoA o CoA en reacciones de transacilación en las que un grupo acilo se transfiere de un donador de (liso-) fosfolípido a lisofosfolípido aceptor (Renne *et al.*, 2015).

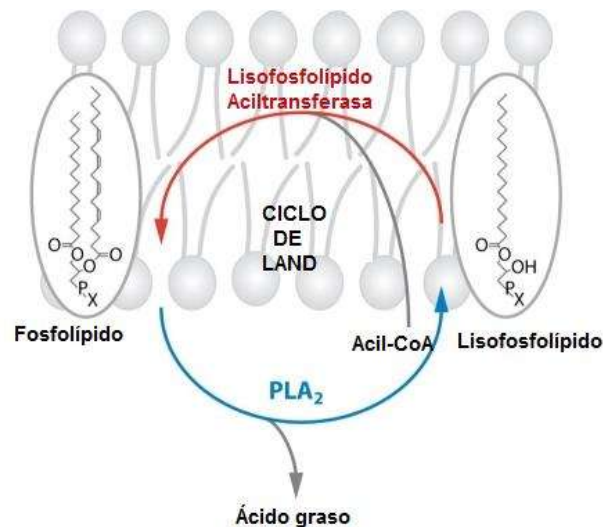


Figura 6. Ciclo de Lands (Lands, 1960).

3.10 Defensas celulares antioxidantes

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son generadas endógenamente a través de la fosforilación oxidativa y las actividades enzimáticas, o exógenamente por factores ambientales. Conducen a una cadena de reacciones de oxidación en la célula, que dañan las estructuras celulares tales como proteínas, lípidos y ADN y además, previenen la actividad enzimática adecuada perturbando el potencial redox interno. Como resultado, la célula ha desarrollado una serie de defensas contra el estrés oxidante, así como mecanismos para mantener su potencial redox interno (Gash, 2003). La concentración intracelular de ERO depende de la producción y/o eliminación por el sistema antioxidante. Las células contienen un gran número de antioxidantes para prevenir o reparar el daño causada por las ERO, así como para regular las vías de señalización sensibles al potencial redox. En células vivas existen dos grupos mayoritarios de enzimas que juegan un papel esencial en la protección contra especies reactivas de oxígeno: la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (Koleva *et al.*, 2008). La SOD convierte el radical superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (O_2), mientras que la catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. El resultado es que dos especies potencialmente dañinas, el superóxido y el peróxido de hidrógeno, se convierten en agua (Weydert y Cullen, 2010). Hay tres isoenzimas SOD que son altamente compartimentadas: la SOD2 es una enzima mitocondrial, que contiene manganeso (Mn-SOD), que proporciona protección de las ERO producidas por la cadena de transporte de electrones. El gen *sod1* codifica una SOD (Cu, Zn-SOD) de cobre y zinc, que se encuentra principalmente en citosol, mientras que algunas se encuentran en las mitocondrias, el núcleo y los lisosomas (Lushchak *et al.*, 2005). Otras enzimas antioxidantes compartimentadas incluyen la catalasa, CTA1, que se localizan en peroxisomas y la CTT1 que es citosólica. Esta enzima reduce el peróxido de hidrógeno usando las propiedades redox de un grupo hemo que está unido con el polipéptido (Herrero *et al.*, 2008). Además de la protección enzimática contra las ERO, existen pequeñas moléculas que actúan como antioxidantes; una de ellas es el glutatión (GSH). Así, las diversas formas de

cada una de estas enzimas reducen el estrés oxidante en las diversas partes de la célula (Weydert y Cullen, 2010).

4. JUSTIFICACIÓN

Diferentes compuestos tóxicos inducen daño celular a través de la producción de estrés oxidante. Los ácidos grasos modifican la resistencia de la levadura al estrés oxidante dependiendo de su número de insaturaciones. Durante la fermentación lignocelulósica el ácido acético, el etanol y el furfural son de los principales compuestos que pueden inducir estrés oxidante en la levadura. Sin embargo, no se conoce la relación entre la resistencia de *Kluyveromyces marxianus* a estos compuestos y además con el grado de insaturación de las membranas.

5. HIPÓTESIS

La incorporación de ácidos grasos en las membranas de levaduras de *Kluyveromyces* altera la tolerancia al estrés oxidante generado por el estrés inducido por compuestos tóxicos para la producción de bioetanol lignocelulósico.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Estudiar la relación entre la resistencia a compuestos tóxicos para la producción de bioetanol lignocelulósico y el grado de insaturación de los ácidos grasos de las membranas de levaduras de *Kluyveromyces*, mediante marcadores de estrés oxidante.

6.2 Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de la adición de ácidos grasos con diferente grado de insaturación sobre la composición membranal de *K. marxianus*.
2. Analizar la influencia de ácidos grasos con diferente grado de insaturación sobre la resistencia a estrés por compuestos tóxicos para la producción de bioetanol lignocelulósico.
3. Determinar el efecto de la adición de ácidos grasos con diferente grado de insaturación sobre la respuesta antioxidante de *K. marxianus* durante el estrés por compuestos tóxicos para la producción de bioetanol lignocelulósico.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Levaduras

Las levaduras utilizadas en este estudio fueron obtenidas de la colección de cultivos del CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, México). Las cepas de levaduras obtenidas del CIATEJ fueron aisladas de fermentaciones espontáneas de mezcal en diferentes estados de la República Mexicana. Las cepas OFF1 y SPL1 de *K. marxianus* fueron aisladas de destilerías rurales mexicanas productoras de mezcal en los estados de San Luis Potosí y Guerrero, respectivamente.

7.2 Reactivos y solventes

2,4-dinitrofenilhidrazina, 2-furaldehído, ácido 2-(N-morfilo) etanelsulfónico (MES), ácido 5-sulfosalicílico, ácido acético, ácido cis-9,12- octadecadienoico, ácido clorhídrico (HCl), ácido eicosanoico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido tiobarbitúrico (TBA), ácido tricloroacético (ATC), ácido cis-6,9,12- octadecatrienoico, ácido cis-9-octadecenoico, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolio), cloruro de potasio (KCl), dextrosa, diacetato de 2',7'-

diclorofluoresceína (H₂DCFDA), dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, extracto de levadura, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), fosfato dibásico de sodio dihidratado (Na₂HPO₄·H₂O), fosfato dipotásico (K₂HPO₄), fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄), hidróxido de sodio (NaOH), igepal, isopropanol, metanol, metil tert-butil éter (MTBE), n-hexano, peptona, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), sal monosódica de (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4- disulfofenil)-2H-tetrazólio), SOD determination kit, trietanolamina (TEA), trifluoruro de boro (BF₃), todos de grado reactivo y obtenidos de Sigma, México.

7.3 Condiciones de crecimiento aerobio

El crecimiento de las levaduras se llevó a cabo utilizando medio YPD que contenían 1% extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de dextrosa como fuente de carbono. Las células se cultivaron a 30 °C y se agitaron a 180 rpm por 24 h.

7.4 Crecimiento anaerobio (adición de ácidos grasos)

Se utilizó el preinóculo preparado previamente en condiciones aerobias, éste se inoculó en medio YPD fresco. Los ácidos grasos (ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico o ácido araquídico) se adicionaron a una concentración de 1 mM, se adicionó Igepal al 1%. Se agitó por 5 minutos y se dejó en crecimiento por 24 h, a 30 °C sin agitación.

7.5 Determinación de la IC50

Para conocer la concentración inhibitoria 50 (IC50) de la viabilidad de cada levadura ante los compuestos ácido acético, etanol y furfural, se realizaron curvas concentración-respuesta. Se utilizaron como referencia las condiciones estresantes reportadas previamente de otras levaduras (Liu *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2010; Caspeta *et al.*, 2015). Para el caso del ácido acético, se adicionó a los medios de cultivo en un rango de 20 a 100 mM, con intervalos de 20 mM y se incubó durante 6 h posteriores a las 24 h de crecimiento anaerobio. En el caso del

etanol se utilizaron concentraciones en el rango del 2 al 12% v/v durante 8 h. Por último, para el caso del furfural se utilizaron concentraciones en el rango del 10 al 50 mM durante 8 h de incubación, posteriores a las 24 h del crecimiento anaerobio. En los tres casos, se determinaron la viabilidad y la concentración inhibitoria 50. Se consideró como referencia el 100% de viabilidad de las levaduras sin adición de ácidos grasos.

7.6 Tratamiento con inhibidores

Después de alcanzar la fase estacionaria, las células fueron sometidas a estrés inducido por los compuestos etanol, ácido acético y furfural a las concentraciones previamente determinadas (IC50).

7.7 Viabilidad celular

El ensayo de MTT (bromuro de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolio) se basa en la conversión de MTT en cristales de formazan por células vivas, lo que determina la actividad mitocondrial. Ya que, para la mayoría de las poblaciones celulares, la actividad mitocondrial total está relacionada con el número de células viables. Para ello, se ajustó la concentración celular mediante un conteo en cámara Neu Bauer. Se colocó en microplaca 80 µl de suspensión celular a una concentración de 1×10^7 cel/ml. Se le adicionó 20 µl de cada uno de los estresantes para obtener la concentración deseada de cada uno (IC50). Se dejó incubar el tiempo correspondiente. Después del tiempo de incubación apropiado se añadió una dilución 1:10 en PBS de MTT (10 µl) 5 mg/ml y se dejó incubar por 2 h. Posteriormente, se añadieron 100 µl de isopropanol acidificado (50 ml HCl / 2.5 l de isopropanol). Se mezcló vigorosamente con pipeta multicanal. Se realizó la medición de la D.O. a 540 nm (Van Merloo *et al.*, 2011).

7.8 Lipoperoxidación

El grado de peroxidación lipídica se determinó a través del método del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Buege y Aust, 1978). Las células se suspendieron en buffer

Tris-HCl, pH 7.4, que contiene 10% de ácido tricloroacético y se añadieron perlas de vidrio. Las muestras se rompieron en 6 ciclos de agitación en vórtex y en hielo. Después de la centrifugación a 300 x g, los sobrenadantes se mezclaron con EDTA 0.1 M y 1% (p / v) de ácido tiobarbitúrico en NaOH 0.05 M. La mezcla de reacción se calentó durante 15 min en un baño de agua en ebullición, y luego se centrifugó. La absorbencia en 532 nm se midió en un espectrofotómetro Perkin-Elmer. Los resultados se calcularon utilizando el coeficiente de extinción molar para malondialdehído ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Los resultados se expresan en nanomoles por miligramo de proteína.

7.9 Carbonilación de proteínas

El contenido de grupos carbonilo en proteínas se midió mediante la determinación de la cantidad de 2,4-dinitrofenilhidrazona formada por reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). El contenido de carbonilos se calculó a partir del máximo de absorbencia de la 2,4-dinitrofenilhidrazona medido a 370 nm utilizando un coeficiente de extinción de $22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Los resultados se expresan en nanomoles por miligramo de proteína (Levine *et al.*, 1990).

7.10 Lisis Celular

Se extrajeron las células del medio de cultivo por centrifugación (5 minutos, 7000 x g). Se lavaron con buffer de fosfato de potasio (pH 7.5). Se resuspendieron en buffer de lisis (fosfato de potasio pH 7.5, PSMF 1 mM, EDTA 0.5 mM). Se agitaron en vórtex durante 15 ciclos de 1 min de agitación en vórtex seguido de 1 min en hielo. Se removieron los restos celulares por centrifugación (10 min, 15 000 x g) (Lushchak *et al.*, 2005).

7.11 Determinación de superóxido dismutasa

La determinación de la actividad de superóxido dismutasa se realizó con la utilización del *Kit SOD determination* (Sigma Aldrich), el cual utiliza la sal monosódica de (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4- disulfofenil)-2H-tetrazólio)

que produce un compuesto colorido de formazan, soluble en agua, después de la reducción con el anión superóxido. El porcentaje de reducción con el O₂ se relaciona linealmente con la actividad de la xantina oxidasa (XO) y es inhibido por la SOD. Por lo tanto, el IC₅₀ puede ser determinado colorimétricamente. Ya que la absorbencia a 440 nm es proporcional a la cantidad de anión superóxido, la actividad de la SOD, como inhibición, se cuantificó midiendo el descenso en el color a 440 nm.

7.12 Determinación de ERO mediante citometría de flujo

Las especies reactivas de oxígeno intracelulares en levaduras se determinaron usando el compuesto fluorescente, sensible a oxidantes que permea las células, diacetato de diclorofluoresceína (H₂DCFDA) (Du y Takagi, 2007; Kitagaki *et al.*, 2007; Pérez-Gallardo *et al.*, 2013). Se utilizó H₂DCFDA a 10 µg/ml en suspensiones celulares; las células fluorescentes y la intensidad de fluorescencia se cuantificó mediante citometría de flujo. Los cultivos celulares se hicieron crecer hasta la fase estacionaria, se tomaron muestras (100 µl) y se incubaron con H₂DCFDA a 30 °C durante 2 h en la oscuridad. Posteriormente, se diluyeron las muestras a 1 ml con buffer PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ · 2 H₂O 8.1 mM, KH₂PO₄, 1.76 mM, a pH 7.4) y las ERO se cuantificaron inmediatamente mediante citometría de flujo.

7.13 Extracción y cuantificación de ácidos grasos

Se centrifugaron las muestras a 13 000 rpm durante 10 min. Posteriormente, se secaron en una centrífuga al vacío. Se añadió metanol (0.5 ml) a una alícuota de 40 mg de muestra, que se colocó en un tubo de vidrio con una tapa revestida de teflón. Se añadieron perlas de vidrio (0.5 mm) y se agitó en vórtex 10 min. Luego, se agregaron 0.75 ml de MTBE y la mezcla se incubó durante 6 min a 4 °C. Se indujo la separación de fases mediante la adición de 0.188 ml de agua ultrapura. Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, la muestra se centrifugó a 14 000 x g durante 2 min. Se recolectó la fase superior (orgánica). Las fases

orgánicas combinadas se secaron en una centrífuga al vacío (Matyash *et al.*, 2008).

Los ésteres metílicos fueron generados por el ensayo de trifluoruro de boro (BF₃) al 14% en metanol (Morrison y Smith, 1964). Se adicionó trifluoruro de boro al 14% en metanol bajo corriente de N₂ en proporción 1 ml BF₃ / 4-16 mg de lípido. Se calentó en baño de agua a 92°C por 30 min. Se extrajeron los metil-ésteres con n-hexano. Se evaporó bajo corriente de N₂.

Después de la extracción con n-hexano, las muestras de metil-ésteres fueron separadas por cromatografía de gases en cromatógrafo Perkin Elmer Clarus 500, usando una columna capilar Omega wax de 30 m x 0.25 mm con N₂ de alta pureza como gas acarreador. Se determinaron los tiempos de retención de cada uno de los estándares de metil-ésteres de ácidos grasos y se hicieron curvas de calibración para cada uno de ellos. La composición de metil-esteres en las muestras y su concentración se determinaron por comparación de los tiempos de retención y por análisis de las áreas bajo los picos, respectivamente.

7.14 Equipos

Citómetro de flujo BD Accuri C6 (BD Biosciences), cromatógrafo Perkin Elmer Clarus 500 y lector de microplaca Synergy 2 Biotek.

7.15 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con el programa estadístico Statistica 7.0; se realizó en cada experimento el análisis de varianza (ANOVA) de una vía; se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey con un nivel de significancia de (P<0.01), (P<0.05) o (P<0.1). Los resultados se expresaron como la media ± el error estándar (E.E.) o como la media ± la desviación estándar (D.E.)

8. RESULTADOS

8.1 Evaluación del efecto de la adición de ácidos grasos con diferente grado de insaturación sobre la composición membranal de *K. marxianus*

Para comprobar la incorporación de los ácidos grasos en las levaduras *K. marxianus* OFF1 y SLP1, se determinó su presencia después de adicionarlos al medio de crecimiento. En la tabla 1 se describe la composición de las levaduras sin adición de ácidos grasos. En las levaduras *K. marxianus* OFF1 predominan los ácidos grasos palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1) y oleico (C18:1) que en conjunto representan el 77 ± 5.9 % del total de ácidos grasos, mientras que en la levadura *K. marxianus* SLP1 predominan los ácidos grasos palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (18:0) y oleico (C18:1) que en conjunto representan el 80 ± 2.1 % del total de ácidos grasos. Sin embargo, al adicionar al medio ácidos grasos exógenos, el perfil de ácidos grasos de la membrana de las levaduras se modificó. En la tabla 2 se muestra la composición porcentual de ácidos grasos en ambas levaduras al adicionar al medio el ácido graso oleico (C18:1). En la determinación porcentual del perfil de ácidos grasos el ácido oleico adicionado constituye el 73 ± 4 % en la levadura *K. marxianus* OFF1 mientras que en la levadura *K. marxianus* SLP1, representa el 51 ± 14 % del total de ácidos grasos.

Tabla 1. Composición porcentual de ácidos grasos en las levaduras *K. marxianus* OFF1 Y SLP1 en el grupo control. El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media \pm D.E.

Cepa de <i>K. marxianus</i>	Perfil de ácidos grasos							
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0
OFF1	4 \pm 0.6	33 \pm 4.0	24 \pm 1.0	9 \pm 0.5	20 \pm 0.9	8 \pm 6.0	2 \pm 0.4	N.D.
SLP1	4 \pm 0.2	28 \pm 1.0	14 \pm 0.3	14 \pm 0.6	24 \pm 0.2	3 \pm 0.0	0.7 \pm 0.2	13 \pm 0.5

Tabla 2. Composición porcentual de ácidos grasos en las levaduras *K. marxianus* OFF1 Y SLP1 en el grupo al cual se le adicionó ácido oleico 1 mM. El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media \pm D.E.

	Perfil de ácidos grasos							
Cepa de <i>K. marxianus</i>	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0
OFF1	3 \pm 0.6	12 \pm 2.0	4 \pm 1.0	2 \pm 0.2	73 \pm 4	5 \pm 6.1	0.3 \pm 0.4	N.D.
SLP1	3 \pm 0.2	19 \pm 9.0	5 \pm 0.5	3 \pm 3	51 \pm 14	3 \pm 1.0	1 \pm 0.3	2 \pm 0.8

En la tabla 3 se muestra la composición porcentual de ácidos grasos en ambas levaduras al adicionar al medio el ácido graso linoleico (C18:2). Al realizar la determinación porcentual del perfil de ácidos grasos, el ácido linoleico adicionado conformó el 73 \pm 4 % en la levadura *K. marxianus* OFF1, mientras que en la levadura *K. marxianus* SLP1 constituyó el 53 \pm 11.4 % del total de ácidos grasos.

Tabla 3. Composición porcentual de ácidos grasos en las levaduras *K. marxianus* OFF1 Y SLP1 en el grupo al cual se le adicionó ácido linoleico 1 mM. El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media \pm D.E.

	Perfil de ácidos grasos							
Cepa de <i>K. marxianus</i>	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0
OFF1	3 \pm 0.5	11 \pm 3.0	3 \pm 5.0	23 \pm 1	4 \pm 1	73 \pm 4	3 \pm 3	N.D.
SLP1	4 \pm 1	21 \pm 0.5	5 \pm 1	4 \pm 1	11 \pm 2	53 \pm 11.4	0.5 \pm 0.0	2 \pm 2

Al adicionar al medio el ácido graso linolénico (C18:3), este constituyó el 68 \pm 3% en la levadura *K. marxianus* OFF1, mientras que en la levadura *K. marxianus* SLP1 conformó el 62.9 \pm 3.1%, de acuerdo con la tabla 4.

Tabla 4. Composición porcentual de ácidos grasos en las levaduras *K. marxianus* OFF1 Y SLP1 en el grupo al cual se le adicionó ácido linolénico 1mM. El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media \pm D.E.

	Perfil de ácidos grasos							
Cepa de <i>K. marxianus</i>	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0
OFF1	2 \pm 0.5	14 \pm 3.0	3.7 \pm 5.0	4.1 \pm 1	4 \pm 1	6 \pm 1	68 \pm 3	N.D.
SLP1	1.8 \pm 0.4	14.8 \pm 2.3	4.3 \pm 1.1	4 \pm 1.4	5.1 \pm 1.3	5 \pm 1.3	62.9 \pm 3.1	2 \pm 2.1

En la tabla 5 se detalla la composición de ácidos grasos al adicionar al medio de crecimiento el ácido araquídico (C20:0). En la levadura *K. marxianus* OFF1, el ácido graso adicionado constituye el 74 \pm 13% del total de ácidos grasos, mientras que en la levadura *K. marxianus* SLP1 el ácido araquídico conforma el 78 \pm 4.8%.

Tabla 5. Composición porcentual de ácidos grasos en las levaduras *K. marxianus* OFF1 Y SLP1 en el grupo al cual se le adicionó ácido araquídico 1mM. El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media \pm D.E.

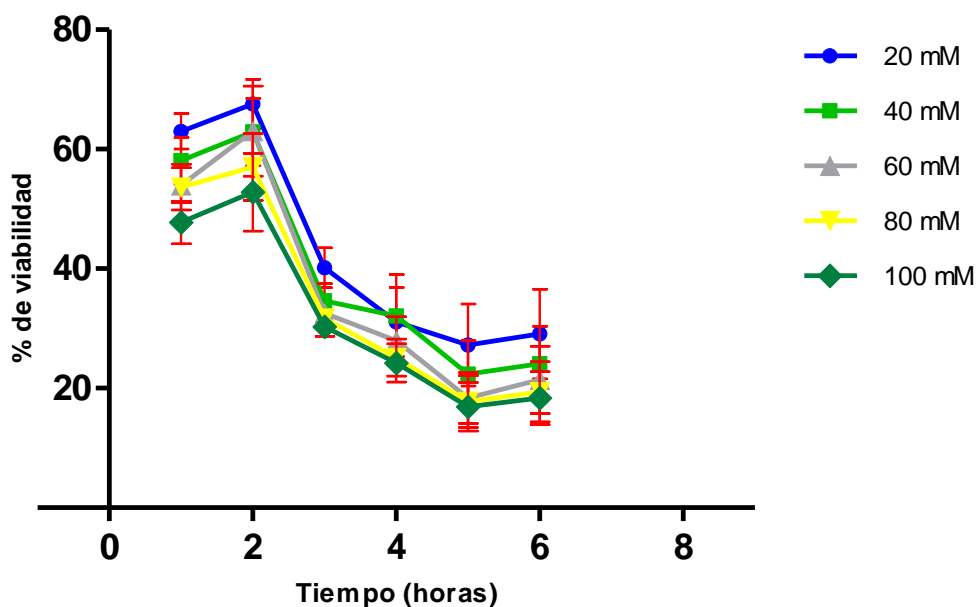
	Perfil de ácidos grasos							
Cepa de <i>K. marxianus</i>	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0
OFF1	2 \pm 0.5	5.7 \pm 3.0	1.4 \pm 0.5	1.5 \pm 1	1 \pm 0.1	0.6 \pm 0.3	0.3 \pm 0.1	74 \pm 13
SLP1	1.1 \pm 0.4	4 \pm 0.3	4.1 \pm 3.1	1 \pm 0.7	3.2 \pm 2.3	2.8 \pm 2.3	0.4 \pm 0.2	78 \pm 4.8

8.2 Análisis de la influencia de ácidos grasos con diferente grado de insaturación sobre la resistencia a estrés por compuestos tóxicos para la producción de bioetanol lignocelulósico.

Se determinó la concentración de cada estresante (ácido acético, etanol y furfural) que redujo el porcentaje de viabilidad en cada levadura al 50% (IC50). En la gráfica 1 se muestra la determinación del IC50 en la levadura *K. marxianus* OFF1 en tratamiento con ácido acético. En la tabla 6 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de viabilidad correspondiente a la gráfica 1. El ANOVA se realizó entre los porcentajes de viabilidad determinados a cada hora obtenidos a partir de las distintas concentraciones de ácido acético utilizado. El IC50 determinado para el ácido acético en la levadura *K. marxianus* OFF1 se obtuvo al utilizar ácido acético 80 mM a la primera hora. Sin embargo, no hay diferencia estadística con respecto a las otras concentraciones utilizadas a la misma hora.

Tabla 6. Porcentaje de viabilidad en la determinación del IC50 de la levadura *K. marxianus* OFF1 en tratamiento con ácido acético y análisis de varianza (ANOVA) de una vía.

OFF1	Concentraciones de ácido acético (mM)				
Tiempo (horas)	100	80	60	40	20
1	53.6 ^a	55.1 ^a	58.1 ^a	49.4 ^a	48.7 ^a
2	57.0 ^a	63.0 ^a	64.0 ^a	62.9 ^a	67.6 ^a
3	31.7 ^a	32.6 ^a	34.6 ^a	40.2 ^{ab}	46.9 ^b
4	25.1 ^a	27.9 ^a	32.1 ^a	31.1 ^a	44.2 ^a
5	17.8 ^a	18.3 ^a	22.3 ^a	27.2 ^{ab}	44.4 ^b
6	19.4 ^a	21.4 ^a	24.1 ^{ab}	29.1 ^{ab}	45.6 ^b

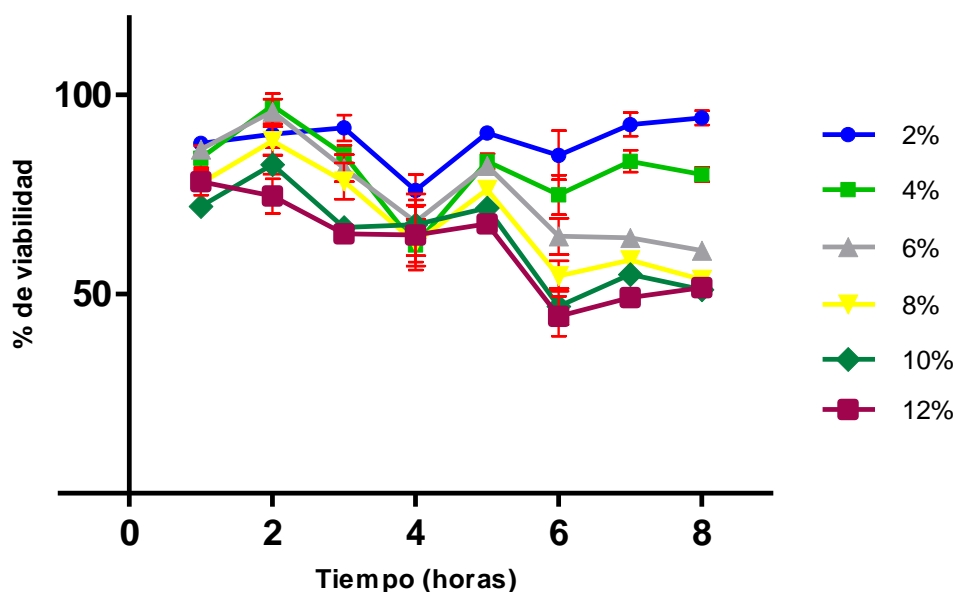


Gráfica 1. Determinación del IC50 en la levadura *K. marxianus* OFF1 en tratamiento con ácido acético. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media \pm E.E.

En la gráfica 2 se muestra la determinación del IC50 en la levadura *K. marxianus* OFF1 en tratamiento con etanol. En la tabla 7 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de viabilidad correspondiente a la gráfica 1. El ANOVA se realizó entre los porcentajes de viabilidad determinados a cada hora obtenidos a partir de las distintas concentraciones de etanol utilizado. El IC50 determinado para el etanol en la levadura *K. marxianus* OFF1 se obtuvo al utilizar etanol 10% v/v a las seis horas. No hay diferencia estadística con respecto a las concentraciones de 6, 8 y 12% utilizadas a la misma hora.

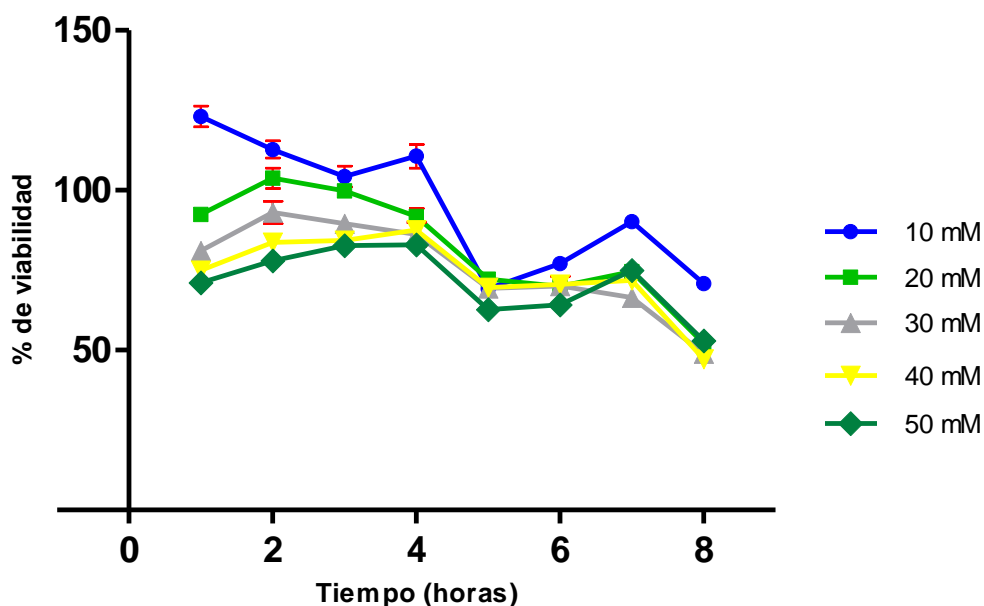
Tabla 7. Porcentaje de viabilidad en la determinación del IC50 de la levadura *K. marxianus* OFF1 en tratamiento con etanol y análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$).

OFF1	Concentraciones de etanol (porcentaje % v/v)					
Tiempo (horas)	12	10	8	6	4	2
1	78.3 ^{abc}	72.1 ^a	77.9 ^{ab}	86.3 ^{bc}	84.2 ^{bc}	87.9 ^c
2	74.6 ^a	82.5 ^{ab}	88.5 ^{abc}	95.9 ^{bc}	97.3 ^c	90.2 ^{bc}
3	65.2 ^a	66.7 ^{ab}	78.4 ^{bc}	81.6 ^{cd}	85.1 ^{cd}	91.7 ^d
4	64.9 ^a	67.4 ^a	62.9 ^a	68.2 ^a	62.4 ^a	76.0 ^a
5	67.7 ^a	71.7 ^{ab}	76.3 ^{bc}	82.3 ^{cd}	83.4 ^d	90.4 ^e
6	44.4 ^a	46.9 ^a	54.6 ^{ab}	64.5 ^{abc}	74.9 ^{bc}	84.9 ^c
7	49.2 ^a	55.0 ^{ab}	58.5 ^{bc}	64.2 ^c	83.4 ^d	92.6 ^e
8	51.7 ^a	51.2 ^a	53.7 ^a	61.0 ^b	80.0 ^c	94.2 ^d



Gráfica 2. Determinación del IC50 en la levadura *K. marxianus* OFF1 en tratamiento con etanol. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media \pm E.E.

La determinación del IC50 en la levadura *K. marxianus* OFF1, en tratamiento con furfural, se muestra en la gráfica 3. En la tabla 8 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de viabilidad correspondiente a la gráfica 3. El ANOVA se realizó entre los porcentajes de viabilidad determinados a cada hora obtenidos a partir de las distintas concentraciones de furfural utilizadas. El IC50 determinado para el furfural en la levadura *K. marxianus* OFF1 se obtuvo al utilizar furfural 20 mM a las ocho horas. No hay diferencia estadística con respecto a las concentraciones de 30, 40 y 50 mM utilizadas a la misma hora.

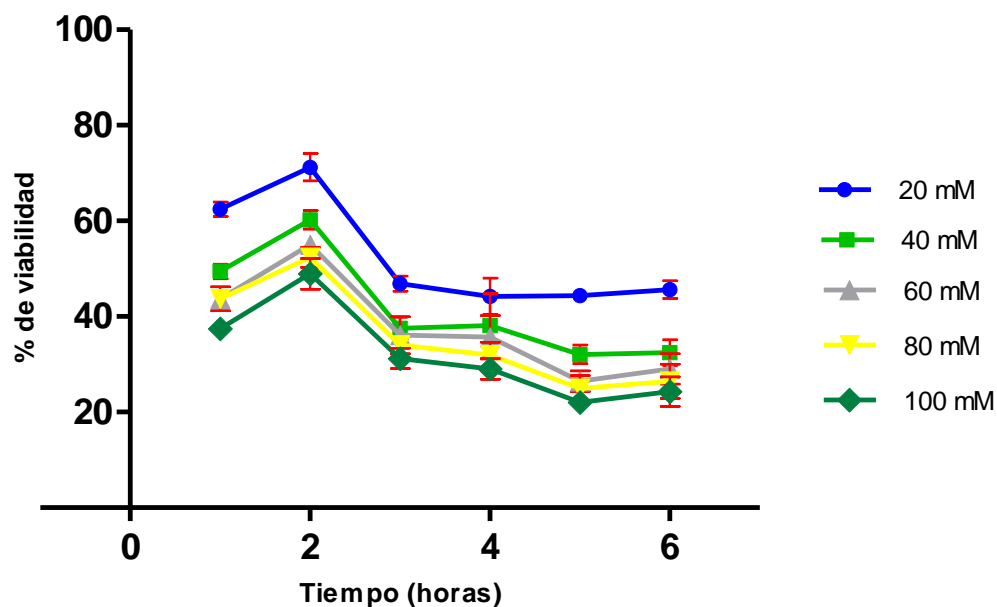


Gráfica 3. Determinación del IC50 en la levadura *K. marxianus* OFF1 en tratamiento con furfural. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media \pm E.E.

Tabla 8. Porcentaje de viabilidad en la determinación del IC50 de la levadura *K. marxianus* OFF1 en tratamiento con furfural y análisis de varianza (ANOVA) de una vía.

OFF1	Concentraciones de furfural (mM)				
Tiempo (horas)	50	40	30	20	10
1	71.0 ^a	75.0 ^{ab}	81.0 ^b	92.4 ^c	123.0 ^d
2	77.3 ^a	83.6 ^{ab}	93.1 ^{bc}	103.8 ^{cd}	112.7 ^d
3	83.3 ^a	84.3 ^a	89.5 ^a	99.8 ^b	104.3 ^b
4	79.8 ^a	87.5 ^a	86.2 ^a	91.9 ^a	110.7 ^b
5	65.0 ^a	69.6 ^a	69.3 ^a	72.2 ^a	69.2 ^a
6	63.0 ^a	70.6 ^{ab}	70.1 ^{ab}	69.9 ^{ab}	77.1 ^b
7	74.9 ^b	71.8 ^{ab}	66.5 ^a	74.5 ^b	90.2 ^c
8	52.9 ^b	47.2 ^a	49.0 ^{ab}	52.1 ^{ab}	70.9 ^c

En la gráfica 4 se muestra la determinación del IC50 en la levadura *K. marxianus* SLP1 en tratamiento con ácido acético. En la tabla 9 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de viabilidad correspondiente a la gráfica 4. El ANOVA se realizó entre los porcentajes de viabilidad determinados a cada hora obtenidos a partir de las distintas concentraciones de ácido acético utilizado. El IC50 determinado para el ácido acético en la levadura *K. marxianus* SLP1, se obtuvo al utilizar ácido acético 40 mM a la primera hora. Sin embargo, no hay diferencia estadística con respecto a las concentraciones 60 y 80 mM utilizadas a la misma hora.

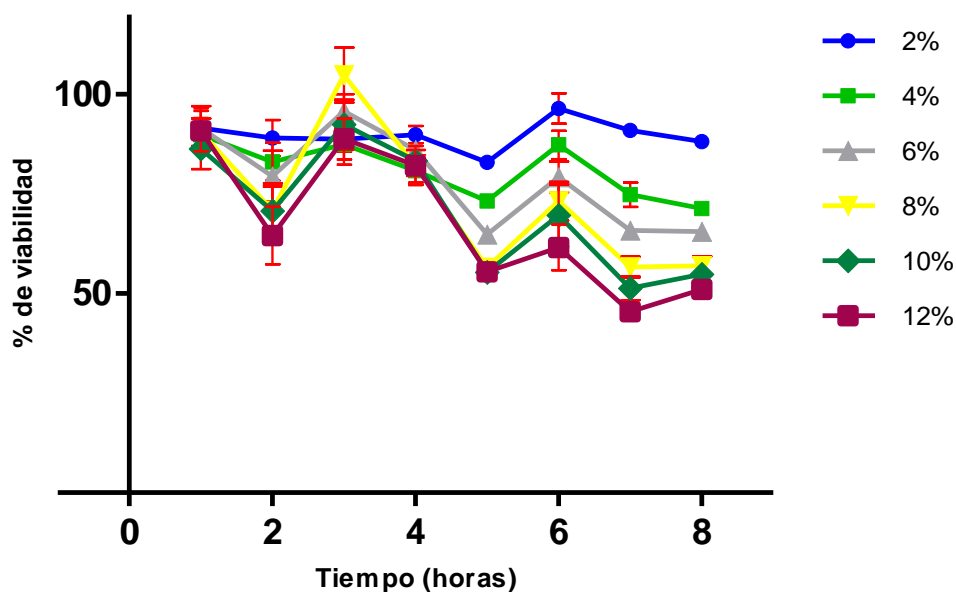


Gráfica 4. Determinación del IC50 en la levadura *K. marxianus* SLP1 en tratamiento con ácido acético. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media \pm E.E.

Tabla 9. Porcentaje de viabilidad en la determinación del IC50 de la levadura *K. marxianus* SLP1 en tratamiento con ácido acético y análisis de varianza (ANOVA) de una vía.

SLP1	Concentraciones de ácido acético (mM)				
	100	80	60	40	20
Tiempo (horas)					
1	37.4 ^a	43.7 ^{ab}	43.7 ^{ab}	49.4 ^b	62.5 ^c
2	48.9 ^a	52.4 ^{ab}	55.0 ^{ab}	60.2 ^b	71.2 ^c
3	31.2 ^a	34.0 ^a	36.1 ^a	37.5 ^{ab}	46.9 ^b
4	29.0 ^a	31.9 ^a	35.7 ^a	38.1 ^a	44.2 ^a
5	22.0 ^a	24.9 ^{ab}	26.5 ^{ab}	32.1 ^b	44.4 ^c
6	24.3 ^a	26.5 ^a	29.0 ^a	32.5 ^a	45.6 ^b

En la gráfica 5 aparece la determinación de la IC50 en la levadura *K. marxianus* SLP1 en tratamiento con etanol.

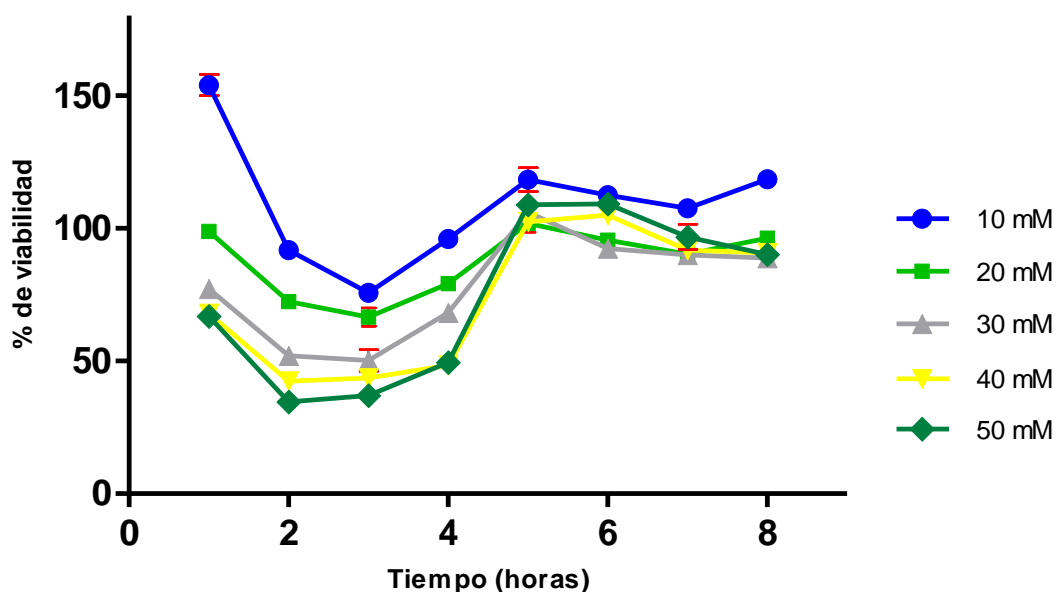


Gráfica 5. Determinación del IC50 en la levadura *K. marxianus* SLP1 en tratamiento con etanol. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media \pm E.E.

En la tabla 10 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de viabilidad correspondiente a la gráfica 5. El ANOVA se realizó entre los porcentajes de viabilidad determinados a cada hora obtenidos a partir de las distintas concentraciones de etanol utilizado. El IC50 determinado para el etanol en la levadura *K. marxianus* SLP1 se obtuvo al utilizar etanol 10% v/v a la séptima hora. Sin embargo, no hay diferencia estadística con respecto a los porcentajes de viabilidad obtenidos al usar las concentraciones de 12 y 8% de etanol a la misma hora.

Tabla 10. Porcentaje de viabilidad en la determinación del IC50 de la levadura *K. marxianus* SLP1 en tratamiento con etanol y análisis de varianza (ANOVA) de una vía.

SLP1	Concentraciones de etanol (porcentaje % v/v)					
Tiempo (horas)	12	10	8	6	4	2
1	90.8 ^a	86.4 ^a	90.5 ^a	91.5 ^a	89.8 ^a	91.6 ^a
2	64.6 ^a	70.8 ^a	70.9 ^a	79.5 ^a	83.1 ^a	89.0 ^a
3	88.8 ^a	92.4 ^a	104.8 ^a	95.7 ^a	87.5 ^a	88.8 ^a
4	82.1 ^a	83.4 ^a	82.2 ^a	86.1 ^a	80.9 ^a	89.9 ^a
5	55.4 ^a	55.4 ^a	56.5 ^a	64.9 ^b	73.3 ^c	82.9 ^d
6	61.6 ^a	69.6 ^{ab}	73.2 ^{ab}	79.3 ^{abc}	87.3 ^{bc}	96.5 ^c
7	45.5 ^a	51.3 ^{ab}	56.7 ^{bc}	65.9 ^{cd}	74.8 ^d	90.9 ^e
8	51.1 ^a	54.9 ^a	57.0 ^a	65.5 ^b	71.4 ^b	88.2 ^c



Gráfica 6. Determinación del IC50 en la levadura *K. marxianus* SLP1 en tratamiento con furfural. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media \pm D.E.

La determinación del IC50 en la levadura *K. marxianus* SLP1 en tratamiento con furfural se muestra en la gráfica 6. En la tabla 11 se muestra el análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de viabilidad correspondiente a la gráfica 6. El ANOVA se realizó entre los porcentajes de viabilidad determinados a cada hora

obtenidos a partir de las distintas concentraciones de furfural utilizadas. El IC50 determinado para el furfural en la levadura *K. marxianus* SLP1 se obtuvo al utilizar furfural 30 mM durante dos horas.

Tabla 11. Porcentaje de viabilidad en la determinación del IC50 de la levadura *K. marxianus* SLP1 en tratamiento con furfural y análisis de varianza (ANOVA) de una vía.

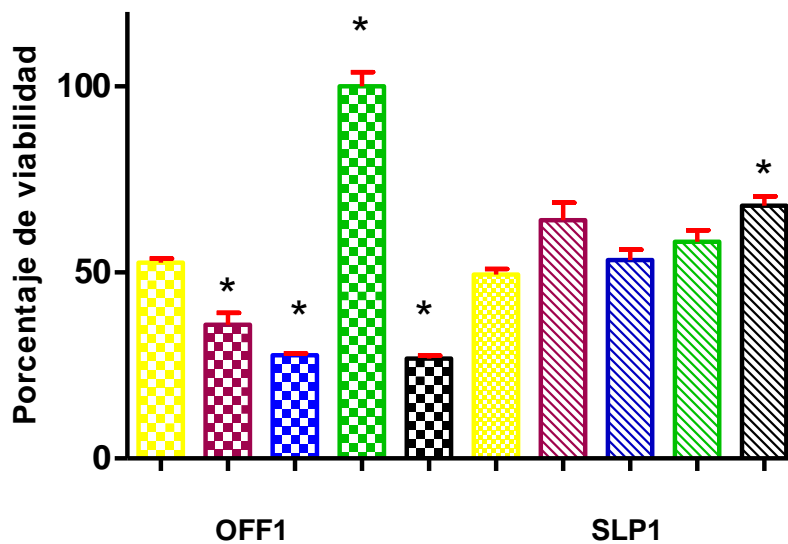
SLP1	Concentraciones de furfural (mM)				
Tiempo (horas)	50 mM	40	30	20	10
1	66.9 ^a	67.9 ^{ab}	77.2 ^b	98.8 ^c	153.9 ^d
2	34.5 ^a	42.4 ^b	52.0 ^c	72.4 ^d	91.8 ^e
3	37.0 ^a	43.6 ^{ab}	50.2 ^b	66.5 ^c	75.6 ^c
4	49.4 ^a	48.4 ^a	68.2 ^b	79.2 ^c	95.9 ^d
5	108.8 ^{ab}	102.4 ^a	106.0 ^{ab}	101.8 ^a	118.2 ^b
6	109.1 ^{bc}	105.0 ^b	92.3 ^a	95.5 ^a	112.4 ^c
7	96.7 ^a	91.7 ^a	90.0 ^a	90.2 ^a	107.4 ^b
8	90.0 ^a	90.6 ^{ab}	88.7 ^a	96.2 ^b	118.5 ^c

Tabla 12. Resumen de las concentraciones de compuestos tóxicos utilizados en las levaduras *K. marxianus* OFF1 Y SLP1 una vez realizada la modificación del perfil lipídico, para determinar la resistencia y la respuesta antioxidante.

Cepa	Compuesto	IC50
<i>K. marxianus</i> OFF1	Ácido acético	80 mM
	Etanol	10%
	Furfural	20 mM
<i>K. marxianus</i> SLP1	Ácido acético	40 mM
	Etanol	10%
	furfural	30 mM

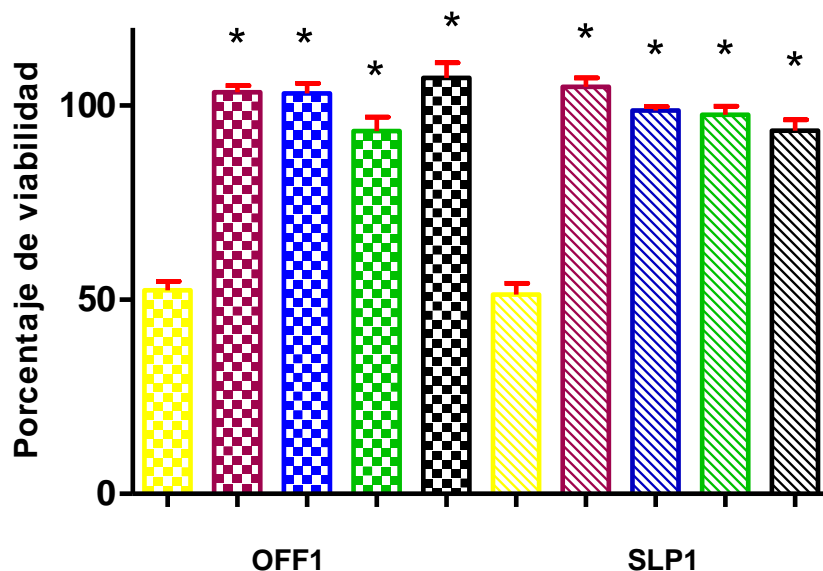
En los experimentos posteriores se realizó la adición, de manera separada, de los ácidos grasos oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolénico (C18:3) y araquídico (C20:0). A continuación, se determinaron algunos parámetros, el primero de ellos fue la viabilidad. En la gráfica 7 aparecen los porcentajes de viabilidad para cada cepa al utilizar el IC50 de ácido acético determinado anteriormente. En el caso de la levadura *K. marxianus* SLP1, la adición de cualquiera de los ácidos grasos generó aumento en la viabilidad, no obstante, sólo resultó estadísticamente

significativo al adicionar el ácido araquídico. En el caso de *K. marxianus* OFF1, al ser modificada con el ácido linolénico, la viabilidad se mantuvo en 100% a pesar de adicionar el IC50 de ácido acético. Por lo contrario, al adicionar los ácidos oleico, linoleico y araquídico, se observa una reducción en la viabilidad por abajo del 50%.



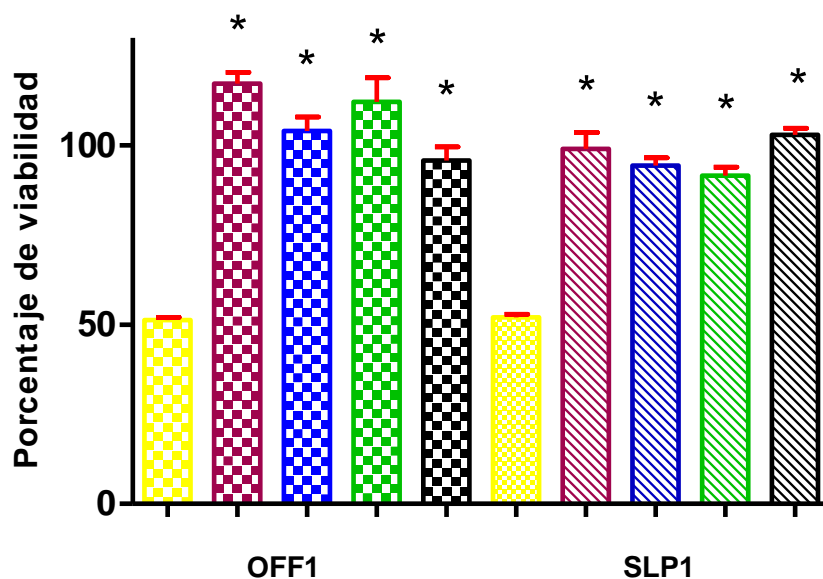
Gráfica 7. Viabilidad de levaduras *K. marxianus* OFF1 y SLP1 con modificación del perfil lipídico (amarillo: control; morado: C18:1; azul: C18:2; verde: C18:3 y negro: C20:0) y en tratamientos con ácido acético IC50. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media \pm E.E.

En la gráfica 8 aparecen los porcentajes de viabilidad para cada cepa con modificación del perfil lipídico y al utilizar el IC50 de etanol. En el caso de ambas cepas, al adicionar cualquiera de los ácidos grasos ensayados, la viabilidad se mantuvo en 100% a pesar de la adición del etanol.



Gráfica 8. Viabilidad de levaduras *K. marxianus* OFF1 y SLP1 con modificación del perfil lipídico (amarillo: control; morado: C18:1; azul: C18:2; verde: C18:3 y negro: C20:0) y en tratamientos con etanol IC50. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media \pm E.E.

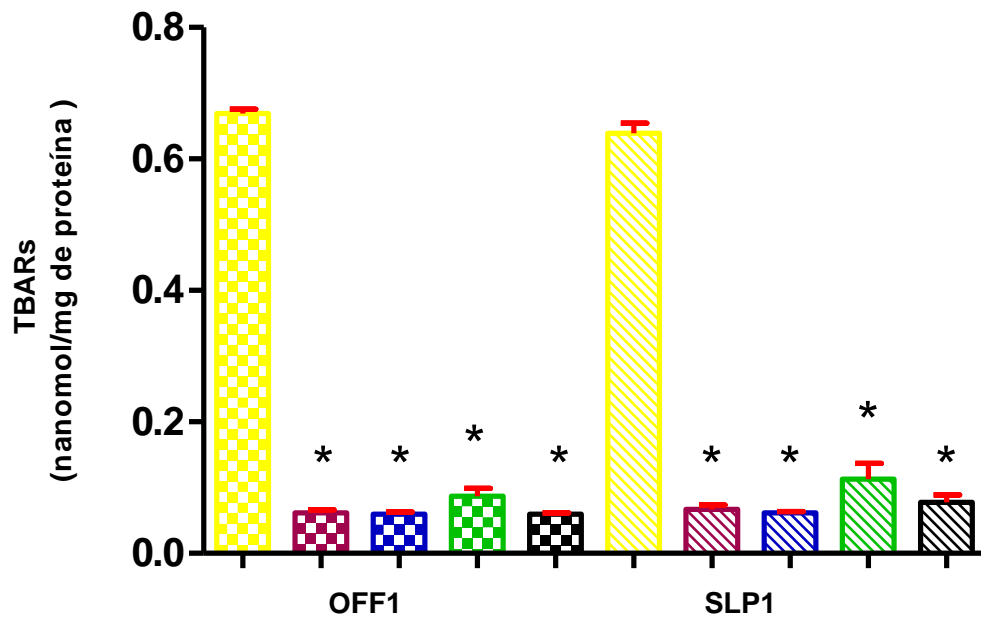
La adición de ácidos grasos en ambas cepas de levadura mantuvo la viabilidad al 100%, a pesar de la adición del IC50 de furfural determinado para cada cepa, como se muestra en la gráfica 9.



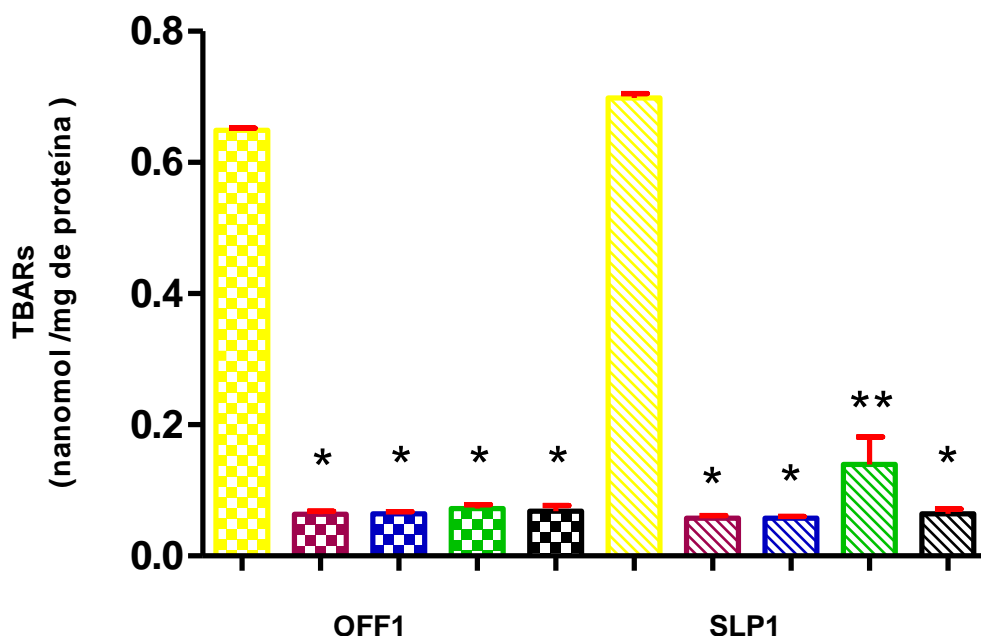
Gráfica 9. Viabilidad de levaduras *K. marxianus* OFF1 y SLP1 con modificación del perfil lipídico (amarillo: control; morado: C18:1; azul: C18:2; verde: C18:3 y negro: C20:0) y en tratamientos con furfural IC50. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media \pm E.E.

8.3 Determinación del efecto de la adición de ácidos grasos con diferente grado de insaturación sobre la respuesta antioxidante de *K. marxianus* durante el estrés por compuestos tóxicos para la producción de bioetanol lignocelulósico.

La siguiente determinación realizada para conocer el estado redox celular en las cepas *K. marxianus* OFF1 y SLP1 con modificación del perfil lipídico y expuestas a condiciones estresantes (IC50) de ácido acético, etanol y furfural, fue la cuantificación de productos de la lipoperoxidación conocidos como TBARs. Como se muestra en la gráfica 10, al realizar la modificación del perfil lipídico y posteriormente ser expuestas al ácido acético, ambas levaduras presentaron menores niveles en la cuantificación de productos de la lipoperoxidación, con respecto a las levaduras no modificadas. Sin embargo, al realizar modificación del perfil lipídico, se observa una tendencia en la cual las levaduras que se modificaron con ácido linolénico tienen mayores niveles de TBARs, con respecto a las levaduras modificadas con ácido oleico, linoleico y araquídico.



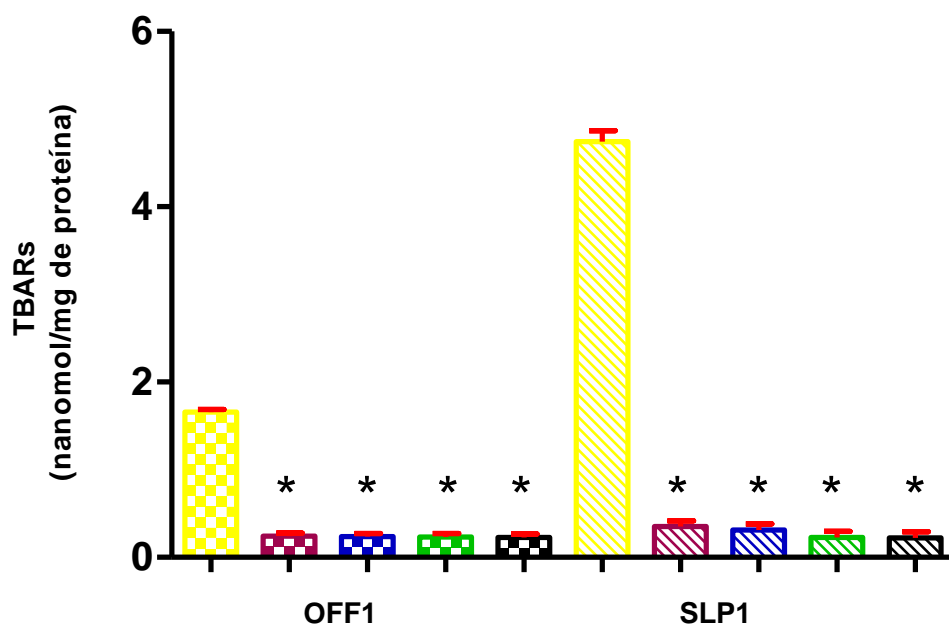
Gráfica 10. Lipoperoxidación en levaduras *K. marxianus* OFF1 y SLP1 con modificación del perfil lipídico (amarillo: control; morado: C18:1; azul: C18:2; verde: C18:3 y negro: C20:0) y en tratamientos con ácido acético IC50. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media \pm E.E.



Gráfica 11. Lipoperoxidación en levaduras *K. marxianus* OFF1 y SLP1 con modificación del perfil lipídico (amarillo: control; morado: C18:1; azul: C18:2; verde: C18:3 y negro: C20:0) y en tratamientos con etanol IC50. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media \pm E.E

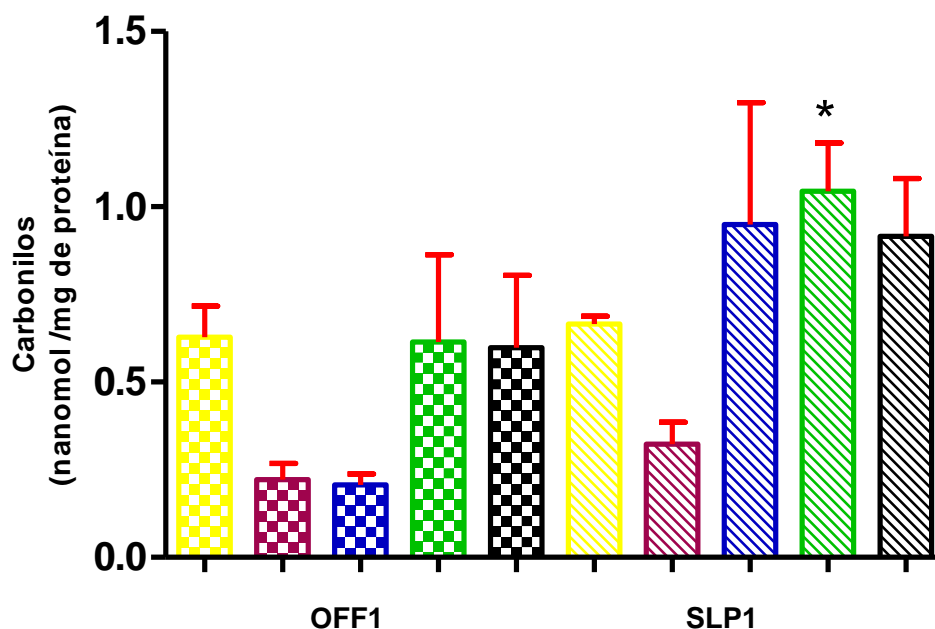
En la gráfica 11 se presentan los niveles de lipoperoxidación en ambas cepas de levadura al ser expuestas a etanol. Se observa que al realizarles modificación del perfil lipídico ambas cepas presentaron menores niveles de TBARs respecto al control. Sin embargo, al realizar modificación del perfil lipídico, se observa una tendencia en la cual las levaduras que se modificaron con ácido linolénico tienen mayores niveles de TBARs, con respecto a las levaduras modificadas con ácido oleico, linoleico y araquídico y el efecto fue mayor en la levadura *K. marxianus* SLP1.

El efecto que se observó en ambas levaduras al ser expuestas a furfural, como se muestra en la gráfica 12 y al ser modificadas con los ácidos grasos, fue una reducción en los niveles de TBARs.



Gráfica 12. Lipoperoxidación en levaduras *K. marxianus* OFF1 y SLP1 con modificación del perfil lipídico (amarillo: control; morado: C18:1; azul: C18:2; verde: C18:3 y negro: C20:0) y en tratamientos con furfural IC50. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media \pm E.E

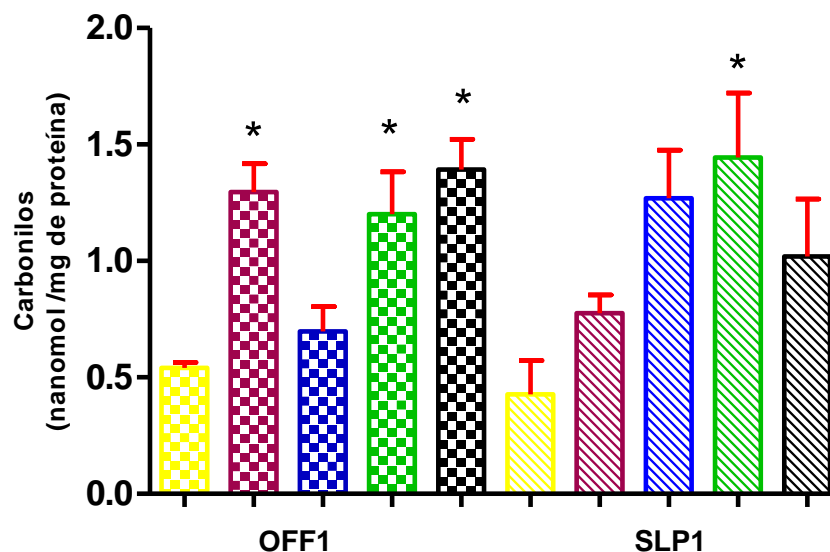
Otra determinación realizada para conocer la respuesta antioxidante de las levaduras con modificación del perfil lipídico y expuestas a estresantes, fue la cuantificación de grupos carbonilos. En la gráfica 13 aparecen los niveles de carbonilos en levaduras expuestas a ácido acético. Se observa que la levadura *K. marxianus* SLP1, al adicionarle ácido linolénico, presentó mayor nivel de carbonilos. Sin embargo, la adición de cualquiera de los otros ácidos grasos en la misma levadura y en el caso de *K. marxianus* OFF1, ningún ácido graso generó cambios estadísticamente significativos en los niveles de carbonilos.



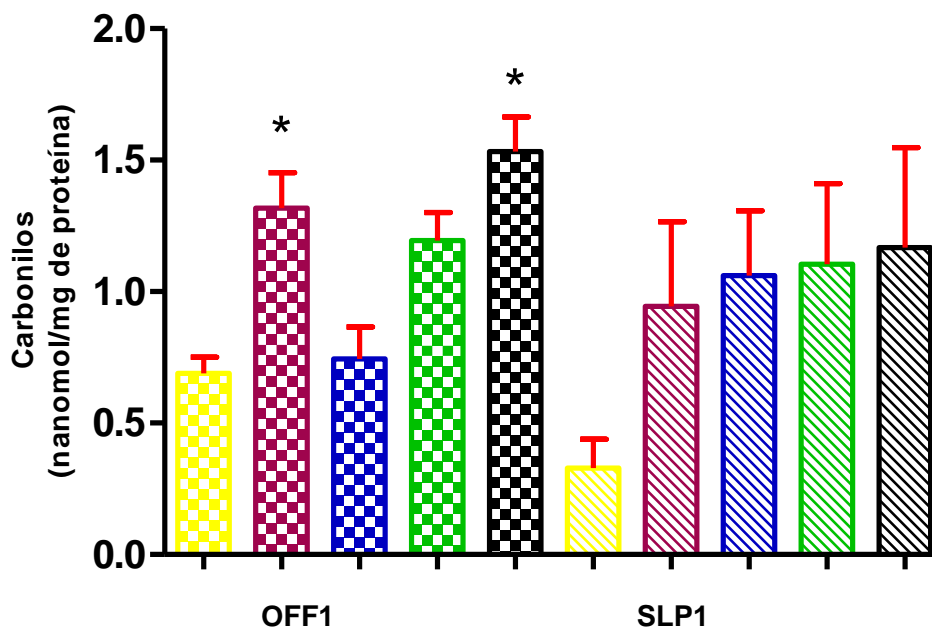
Gráfica 13. Carbonilación en levaduras *K. marxianus* OFF1 y SLP1 con modificación del perfil lipídico (amarillo: control; morado: C18:1; azul: C18:2; verde: C18:3 y negro: C20:0) y en tratamientos con ácido acético IC50. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.1$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media \pm E.E

Al utilizar el estresante etanol, como se muestra en la gráfica 14, en la levadura *K. marxianus* SLP1, la adición del ácido linolénico favoreció la formación de carbonilos. No obstante, la adición de los otros ácidos grasos no generó cambios estadísticamente significativos en los niveles de carbonilos en la misma levadura. En el caso de la levadura *K. marxianus* OFF1, la adición de los ácidos grasos oleico, linolénico y araquídico fomentaron la generación de carbonilos.

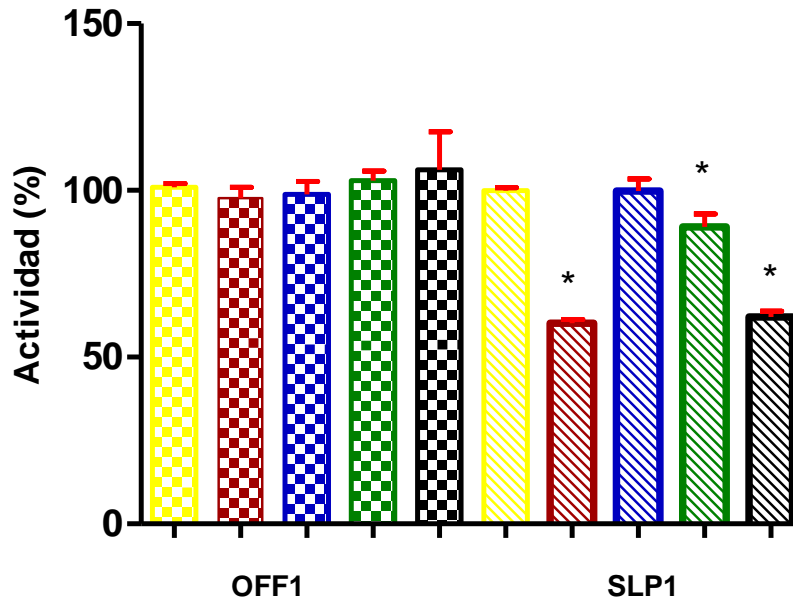
En la gráfica 15 se muestran los niveles de carbonilos en ambas cepas de levadura con modificación del perfil lipídico y expuestas al estresante furfural IC50, como se observa, la adición de los ácidos oleico y araquídico en la levadura *K. marxianus* OFF1, favoreció la formación de carbonilos. En la levadura *K. marxianus* SLP1, la adición de cualquiera de los ácidos grasos no generó cambios estadísticamente significativos.



Gráfica 14. Carbonilación en levaduras *K. marxianus* OFF1 y SLP1 con modificación del perfil lipídico (amarillo: control; morado: C18:1; azul: C18:2; verde: C18:3 y negro: C20:0) y en tratamientos con etanol IC50. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.1$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media \pm E.E

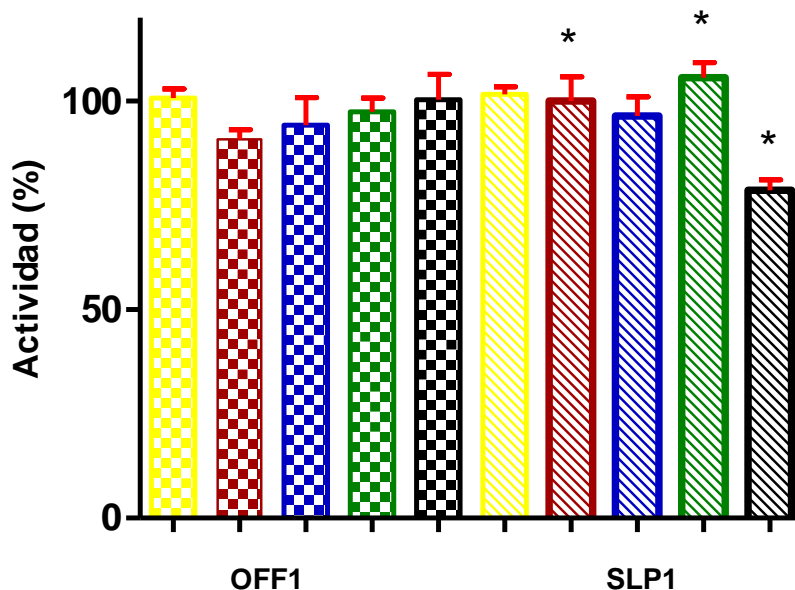


Gráfica 15. Carbonilación en levaduras *K. marxianus* OFF1 y SLP1 con modificación del perfil lipídico (amarillo: control; morado: C18:1; azul: C18:2; verde: C18:3 y negro: C20:0) y en tratamientos con furfural IC50. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media \pm E.E



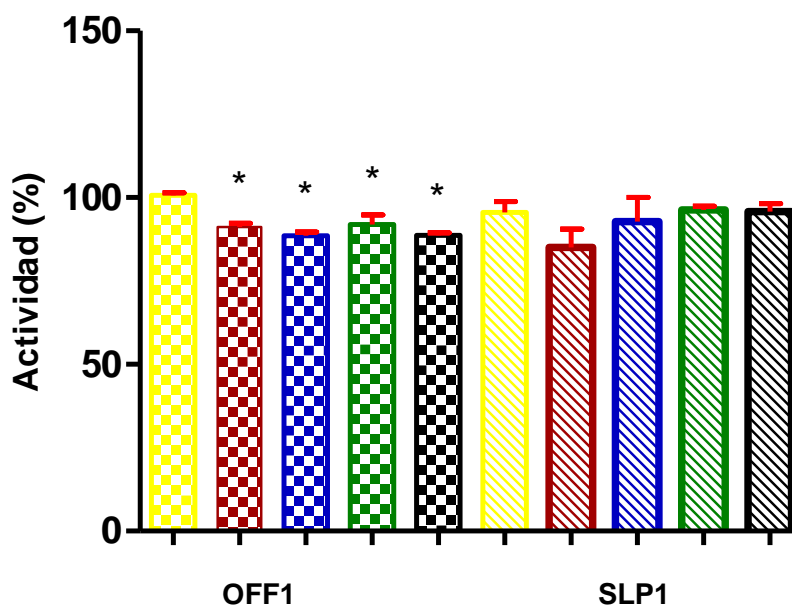
Gráfica 16. Actividad SOD en levaduras *K. marxianus* OFF1 y SLP1 con modificación del perfil lipídico (amarillo: control; morado: C18:1; azul: C18:2; verde: C18:3 y negro: C20:0) y en tratamientos con ácido acético IC50. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media \pm E.E

Se realizó la determinación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa. En la gráfica 16 se muestra la actividad de la SOD en levaduras expuestas a ácido acético. En el caso de la levadura *K. marxianus* SLP1, la adición de los ácidos grasos oleico, linolénico y araquídico, se relacionó con una menor actividad de la enzima. Por otro lado, en la levadura *K. marxianus* OFF1, la adición de los ácidos grasos no mostró efecto sobre la actividad de dicha enzima.



Gráfica 17. Actividad SOD en levaduras *K. marxianus* OFF1 y SLP1 con modificación del perfil lipídico (amarillo: control; morado: C18:1; azul: C18:2; verde: C18:3 y negro: C20:0) y en tratamientos con etanol IC50. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media \pm E.E

En la gráfica 17 se muestra la actividad de la SOD en levaduras expuestas a etanol. En el caso de la levadura *K. marxianus* OFF1, la adición de cualquiera de los ácidos grasos, no mostró cambios en la actividad de la enzima. Respecto a la cepa *K. marxianus* SLP1, la adición de los ácidos grasos oleico y linolénico se relacionó con una mayor actividad, mientras que la cepa a la cual se le adicionó el ácido araquídico mostró una menor actividad.



Gráfica 18. Actividad SOD en levaduras *K. marxianus* OFF1 y SLP1 con modificación del perfil lipídico (amarillo: control; morado: C18:1; azul: C18:2; verde: C18:3 y negro: C20:0) y en tratamientos con furfural IC50. Se realizó análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de comparación de medias múltiple Tukey ($p < 0.05$). El experimento se repitió 3 veces y cada valor representa la media \pm E.E

En la gráfica 18 aparece la actividad SOD de las cepas en tratamientos con furfural. La cepa de *K. marxianus* OFF1 mostró menor actividad de esta enzima cuando se modificó su perfil lipídico con cualquiera de los ácidos grasos utilizados. La levadura *K. marxianus* SLP1 no presentó cambios en la actividad de la enzima al adicionar los diferentes ácidos grasos.

En la tabla 12 aparecen los promedios de fluorescencia que se muestran gráficamente en las figuras 7 y 8, en las determinaciones de ERO mediante citometría de flujo. En los tratamientos con ácido acético la cepa OFF1 presentó menor producción de ERO cuando se modificó el perfil lipídico con ácido oleico y araquídico. La cepa SLP1 presentó menor producción de ERO con la adición de cualquiera de los ácidos grasos comparada con el control. Sin embargo, el efecto fue mayor con la adición del ácido araquídico.

Tabla 13. Promedio de fluorescencia de levaduras *K. marxianus* OFF1 y SLP1 en la determinación de ERO mediante citometría de flujo y en tratamientos con ácido acético IC50.

Levadura	Adición de ácido graso	Promedio de fluorescencia
<i>K. marxianus</i> OFF 1	Control	6 953.85
	Oleico (18:1)	4 685.69
	Linoleico (18:2)	10 141.64
	Linolénico (18:3)	9 349.22
	Araquídico (20:0)	4 926.42
<i>K. marxianus</i> SLP 1	Control	104 401.22
	Oleico (18:1)	72 270.88
	Linoleico (18:2)	84 831.73
	Linolénico (18:3)	71 060.44
	Araquídico (20:0)	66 271.11

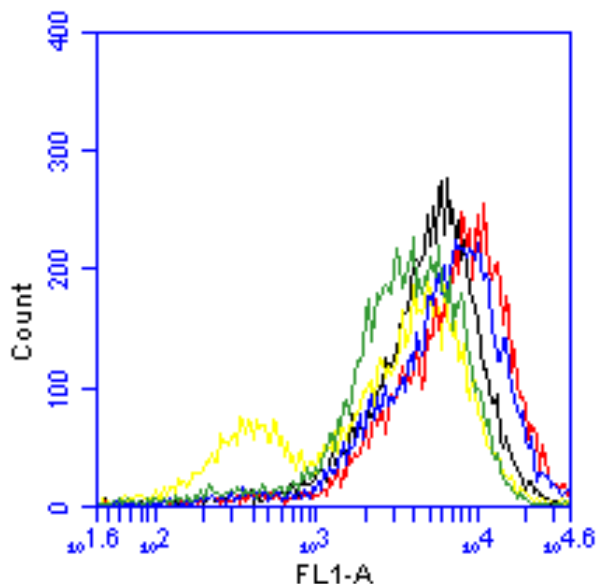


Figura 7. Determinación de ERO mediante citometría de flujo en levaduras *K. marxianus* OFF1 con modificación del perfil lipídico (negro: control; amarillo: 18:1; rojo: 18:2; azul: 18:3 y verde 20:0) y en tratamientos con ácido acético IC50. Se utilizó H2DCFDA que detecta ERO. La emisión de fluorescencia se detectó en el canal FL1A (533/30 nm).

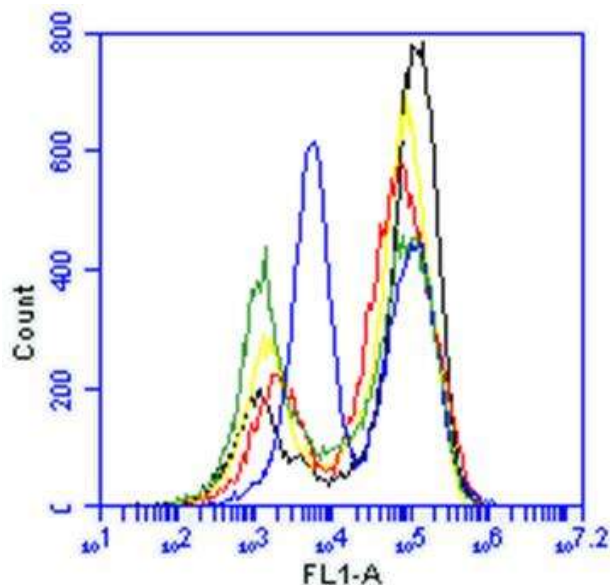


Figura 8. Determinación de ERO mediante citometría de flujo en levaduras *K. marxianus* SLP1 con modificación del perfil lipídico (negro: control; amarillo: 18:1; rojo: 18:2; azul: 18:3 y verde 20:0) y en tratamientos con ácido acético IC50. Se utilizó H2DCFDA que detecta ERO. La emisión de fluorescencia se detectó en el canal FL1A (533/30 nm).

En la tabla 13 así como en las figuras 9 y 10, aparecen los promedios de fluorescencia en las determinaciones de ERO mediante citometría de flujo. En los tratamientos con etanol la cepa OFF1 presentó menor producción de ERO al adicionar cualquiera de los ácidos grasos. El efecto fue mayor al adicionar el ácido oleico y el ácido araquídico. La cepa SLP1 presentó menor producción de ERO respecto al control al adicionar el ácido araquídico.

Tabla 14. Promedio de fluorescencia de levaduras *K. marxianus* OFF1 y SLP1 en la determinación de ERO mediante citometría de flujo y en tratamientos con etanol IC50.

Levadura	Adición de ácido graso	Promedio de fluorescencia
<i>K. marxianus</i> OFF 1	Control	23 284.59
	Oleico (18:1)	7 701.76
	Linoleico (18:2)	14 051.10
	Linolénico (18:3)	12 689.62
	Araquídico (20:0)	7 224.72
<i>K. marxianus</i> SLP 1	Control	9 259.96
	Oleico (18:1)	9 963.82
	Linoleico (18:2)	10 703.47
	Linolénico (18:3)	10 908.81
	Araquídico (20:0)	8 909.74

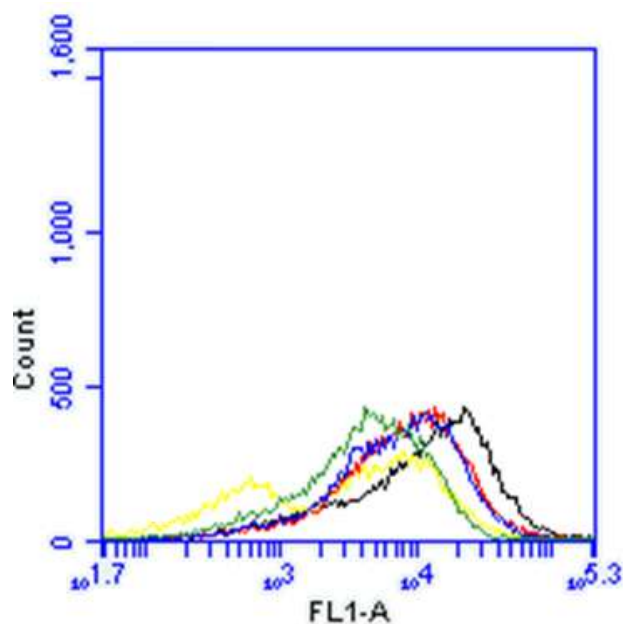


Figura 9. Determinación de ERO mediante citometría de flujo en levaduras *K. marxianus* OFF1 con modificación del perfil lipídico (negro: control; amarillo: 18:1; rojo: 18:2; azul: 18:3 y verde 20:0) y en tratamientos con etanol IC50. Se utilizó H2DCFDA que detecta ERO. La emisión de fluorescencia se detectó en el canal FL1A (533/30 nm).

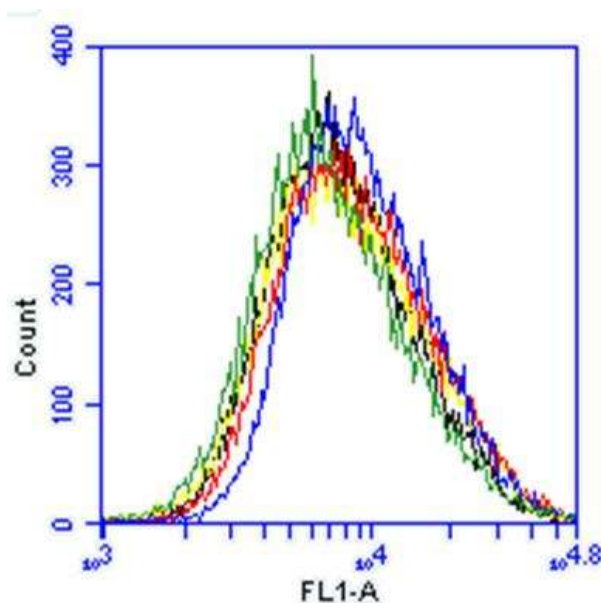


Figura 10. Determinación de ERO mediante citometría de flujo en levaduras *K. marxianus* SLP1 con modificación del perfil lipídico (negro: control; amarillo: 18:1; rojo: 18:2; azul: 18:3 y verde 20:0) y en tratamientos con etanol IC50. Se utilizó H2DCFDA que detecta ERO. La emisión de fluorescencia se detectó en el canal FL1A (533/30 nm).

En la tabla 14 así como en las figuras 11 y 12, se muestran los promedios de fluorescencia en las determinaciones de ERO mediante citometría de flujo. En los tratamientos con furfural la cepa OFF1 presentó menor producción de ERO al adicionar cualquiera de los ácidos grasos. La cepa SLP1 presentó menor producción de ERO, respecto al control al adicionar el oleico.

Tabla 15. Promedio de fluorescencia de levaduras *K. marxianus* OFF1 y SLP1 en la determinación de ERO mediante citometría de flujo y en tratamientos con furfural IC50.

Levadura	Adición de ácido graso	Promedio de fluorescencia
<i>K. marxianus</i> OFF 1	Control	41 638.35
	Oleico (18:1)	7 266.89
	Linoleico (18:2)	19 586.84
	Linolénico (18:3)	20 083.37
	Araquídico (20:0)	11 930.71
<i>K. marxianus</i> SLP 1	Control	31 749.08
	Oleico (18:1)	26 799.23
	Linoleico (18:2)	65 341.11
	Linolénico (18:3)	45 269.09
	Araquídico (20:0)	52 527.95

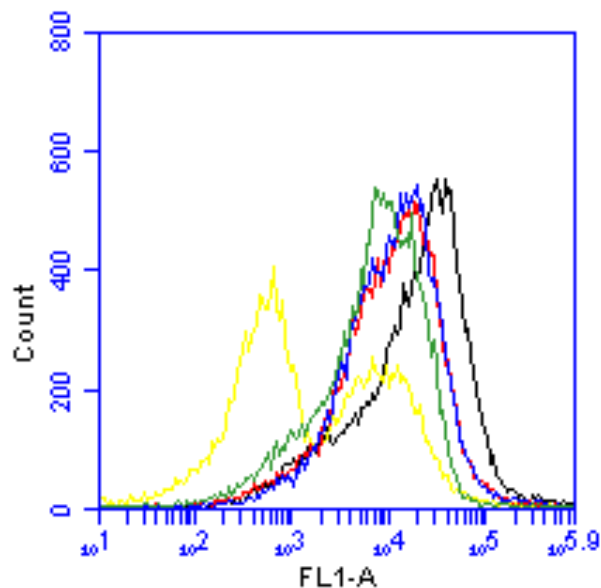


Figura 11. Determinación de ERO mediante citometría de flujo en levaduras *K. marxianus* OFF1 con modificación del perfil lipídico (negro: control; amarillo: 18:1; rojo: 18:2; azul: 18:3 y verde 20:0) y en tratamientos con furfural IC50. Se utilizó H2DCFDA que detecta ERO. La emisión de florescencia se detectó en el canal FL1A (533/30 nm).

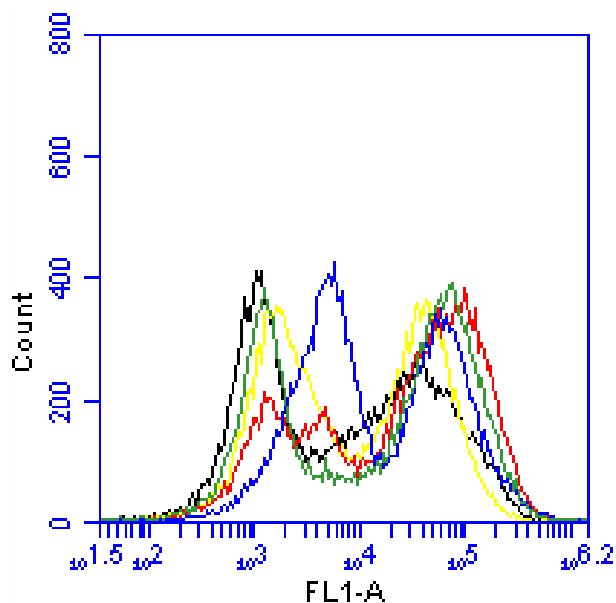


Figura 12. Determinación de ERO mediante citometría de flujo en levaduras *K. marxianus* SLP1 con modificación del perfil lipídico (negro: control; amarillo: 18:1; rojo: 18:2; azul: 18:3 y verde 20:0) y en tratamientos con furfural IC50. Se utilizó H2DCFDA que detecta ERO. La emisión de florescencia se detectó en el canal FL1A (533/30 nm).

9. DISCUSIÓN

Una de las desventajas en la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, es que durante los procesos de hidrólisis se generan compuestos tóxicos para las levaduras. Los principales subproductos que se generan de esta degradación y que pueden resultar tóxicos, son el aldehído furfural y el ácido acético; además, el producto de la fermentación, el etanol también puede dañar a los microorganismos en concentraciones específicas para cada cepa. El efecto tóxico de estos compuestos lo ejercen alterando el estado redox celular mediante la generación o la inducción de especies reactivas del oxígeno. Por lo tanto, es de vital importancia encontrar mecanismos para generar resistencia en los microorganismos y que, de esta forma, puedan tolerar el estrés oxidante generado por los compuestos tóxicos y llevar a cabo de forma óptima la fermentación.

La capacidad de las levaduras para incorporar ácidos grasos es una ventaja si se pretende mejorar su resistencia a compuestos tóxicos. Como lo comprobó Cortés-Rojo *et al.* (2009), cuando las células de levadura son crecidas en presencia de un ácido graso exógeno, éste se convierte en el principal constituyente, mientras que la concentración de ácidos grasos nativos disminuye. Estos datos concuerdan con nuestros resultados, ya que al realizar la adición de los ácidos grasos oleico, linoleico, linolénico o araquídico, estos representaron la mayor proporción de ácidos grasos en las membranas de las levaduras, formando desde un 51% hasta un 78% del total de ácidos grasos. Aprovechando esta ventaja, se han realizado algunos trabajos, donde se mejora la resistencia de levaduras a algunos tipos de estrés como son estrés salino, congelamiento, etanol, presión hidrostática y cambios en la temperatura (Aguilera *et al.*, 2006; Rodríguez Vargas *et al.*, 2007; Landolfo *et al.*, 2010).

Se evaluó la resistencia de las levaduras *K. marxianus* OFF1 y SLP1 a los estresantes acético, etanol y furfural para conocer su desempeño en condiciones nativas. Se utilizó el porcentaje de reducción de viabilidad en presencia de los tres compuestos tóxicos como método para evaluar la tolerancia a los mismos. Se modificó un medio con ácido acético, etanol y furfural de forma independiente,

empleando concentraciones reportadas para cada estresante en estudios con otras levaduras (Ludovico *et al.*; 2002; Allen *et al.*, 2010; Caspeta *et al.*, 2015) y una condición de control sin inhibidores. De acuerdo con Ludovico *et al.* (2001), en ciertas condiciones, el ácido acético compromete la viabilidad celular de *S. cerevisiae* y finalmente resulta en dos tipos de muerte celular. De acuerdo con sus resultados, un proceso no activo (necrótico) es el mecanismo predominante de muerte celular en muestras expuestas durante 200 minutos a ácido acético a concentraciones superiores 80 mM. Sin embargo, las características comunes con un fenotipo apoptótico pueden ser inducidas por el ácido acético a concentraciones entre 20 y 80 mM en *S. cerevisiae*. Por lo anterior, en relación con los resultados obtenidos de viabilidad de las cepas de *K. marxianus* OFF1 y SLP1 en presencia de ácido acético, como se mostró en las gráficas 1 y 4 respectivamente, se esperaba que en dichas células tratadas con ácido acético en este estudio esté ocurriendo muerte celular apoptótica. En el mismo trabajo la viabilidad de *S. cerevisiae* W303-1A tratadas con ácido acético a una concentración menor a 50 mM durante tres horas, se redujo a un porcentaje menor al 20%, mientras que en el presente estudio en las mismas condiciones la viabilidad de ambas cepas de *K. marxianus* OFF1 y SLP1 se mantuvo en 30%, incluso en la concentración más alta probada de 100 mM. Lo anterior demuestra que ambas cepas de *K. marxianus* son más resistentes a este compuesto, con respecto a la cepa probada en el estudio mencionado.

El efecto del etanol sobre la viabilidad celular, a las distintas concentraciones utilizadas fue paulatino. La reducción en este parámetro a lo largo del tiempo estudiado fue constante sin alcanzar porcentajes de viabilidad menores al 50% aun con la mayor concentración utilizada (12%). Como lo reportó Lei *et al.* (2007), el estrés con etanol puede conducir a la pérdida de viabilidad celular y la inhibición del crecimiento celular. Sin embargo, las concentraciones a las cuales se induce este efecto varían dependiendo del microorganismo. La utilización de *K. marxianus* OFF1 y SLP1 en la producción de bioetanol es viable de acuerdo con este estudio, ya que las tolerancias al etanol son similares a las de *S. cerevisiae*. Según lo reportó Caspeta *et al.* (2015), esta levadura puede tolerar

concentraciones de etanol entre 115 y 200 g/l, mientras que las levaduras usadas en el presente estudio toleraron el equivalente a 120 g/l sin alcanzar porcentajes de viabilidad menores a 50%. En general, el etanol inhibe el crecimiento de la levadura por encima de las concentraciones del 10% (v /v), mientras que la capacidad de fermentación se inhibe al 20% (v/v) de etanol (Pratt *et al.*, 2003), por lo cual es de esperarse que cualquiera de las cepas estudiadas en el presente trabajo mantenga su capacidad fermentativa a concentraciones de 12% de etanol.

En ambas cepas utilizadas de *K. marxianus* OFF1 y SLP1 en presencia de furfural a la más baja concentración probada (10 mM), se observó un aumento en la viabilidad con respecto al control sin el inhibidor. A pesar de que los reportes sobre la degradación anaeróbica de furfural son escasos, solo dos microorganismos, cepas de *Desulfovibrio* (Brune *et al.* 1983; Boopathy y Daniels 1991), se sabe que transforman furfural anaeróticamente, produciendo ácido acético. Por otro lado, existen estudios sobre el metabolismo aeróbico del furfural. Los genes responsables del catabolismo aeróbico de furfural fueron descubiertos en *Cupriavidus basilensis* HMF14, que le permiten la conversión completa de este compuesto al intermediario del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, 2-oxo-glutarato. De esta forma, este microorganismo puede metabolizar el furfural y utilizarlo como fuente de carbono y energía (Wierckx *et al.*, 2011). Respecto al comportamiento de la cepa *K. marxianus* SLP1 durante las ocho horas de estudio al realizar la adición del furfural, se observó inicialmente una reducción en la viabilidad durante las primeras cuatro horas y posteriormente se restableció la viabilidad, lo que se atribuye al reinicio del crecimiento de la población posterior a una etapa de adaptación que involucra la detoxificación de furfural, mediante el empleo de equivalentes reductores (NADH) para convertir el aldehído en el alcohol correspondiente furfuril alcohol, que es menos tóxico (Ask *et al.*, 2013).

Una vez definido el nivel de resistencia de las levaduras ante cada inhibidor, se estableció usar la IC50 para determinar el efecto de la adición de ácidos grasos sobre la viabilidad celular. Al adicionar el ácido acético, no hubo efectos semejantes en las dos cepas estudiadas. En la cepa OFF1 se mejoró la

resistencia al adicionar el ácido oleico. En el caso de la cepa SLP1 se mejoró la resistencia al adicionar el ácido araquídico. Como lo reportó Mejía *et al.* (2016), al evaluar el efecto del estrés por temperatura, la levadura *K. marxianus* SLP1 mostró ser termotolerante, lo cual se atribuyó al contenido de ácido araquídico. De acuerdo con este trabajo, respecto al resultado de la exposición al estrés inducido por ácido acético, al adicionarse el ácido araquídico, la levadura mostró mayor resistencia. Aunque no hay reportes previos sobre el efecto en la fluidez de membranas de este estresante, se sugiere que este ácido graso saturado participe estabilizando la membrana. Por otro lado, se sugiere que este ácido graso esté implicado en los mecanismos de activación en la respuesta a estrés, mediados por la fluidez de la membrana como lo reportó Leach y Cowen (2014), de forma tal, que al estar presente este ácido graso se genera una respuesta inmediata para compensar los efectos del ácido acético, así como los del aumento de temperatura.

El etanol tiene un potencial considerable para interrumpir la distribución, la función y el recambio de proteínas asociadas a la membrana a través de mecanismos mediados por lípidos en membranas biológicas (Henderson y Block, 2014). Uno de estos efectos es aumentar la fluidez de las membranas (Jones y Greenfield, 1987). Además, se ha reportado que la capacidad de las levaduras para mantener su fluidez de la membrana en un ambiente con concentraciones altas de etanol se correlaciona con la tolerancia al mismo compuesto (Alexandre *et al.*, 1994; Huffer *et al.*, 2011). Como se mostró previamente (gráfica 8), al adicionar cualquiera de los ácidos grasos, ambas cepas de levadura mostraron resistencia al etanol al no reducir su viabilidad. El perfil de ácidos grasos de las levaduras analizadas en este estudio está formado principalmente por los ácidos palmítico, palmitoleico y oleico. La fluidez de las membranas aumenta de acuerdo con el mayor contenido de ácidos grasos insaturados, a su vez, los ácidos grasos generan mayor fluidez conforme aumenta el número de insaturaciones ($n-3$ PUFA > $n-6$ PUFA > MUFA > SFA) (Papackova y Cahova, 2015). En el caso de la adición de ácido araquídico, al ser un ácido saturado, su efecto podría deberse a que participa estabilizando la membrana y compensando el aumento en la fluidez que genera el etanol. Sin

embargo, se ha reportado que las células de *S. cerevisiae* con membranas enriquecidas en ácidos grasos insaturados, mostraron mayor tolerancia al etanol en base a su captación de L-alanina, flujo de protones y tasa de fermentación (Henderson y Block, 2014). Lo cual explica porqué al adicionar los ácidos grasos oleico, linoleico y linolénico en este estudio, el efecto sobre la viabilidad fue similar, ya que no se redujo al adicionar dicho estresante.

En el caso de la resistencia al furfural en levaduras cuyo perfil lipídico fue modificado, el efecto fue similar al utilizar el etanol, es decir, ambas cepas de levadura mostraron resistencia a este compuesto al no reducir su viabilidad. La resistencia aumentó indistintamente del ácido graso adicionado. Como se comentó anteriormente, el efecto tóxico del furfural en las levaduras se debe a que, al ser un aldehído, es químicamente reactivo y puede formar aductos con muchas clases de moléculas biológicas incluyendo los lípidos presentes en membranas (Zaldivar *et al.*, 1999). Sin embargo, al encontrarse disponibles los ácidos grasos adicionados, las levaduras pueden modificar las cadenas acil lipídicas dañadas mediante un recambio lipídico y de esta forma mantener la viabilidad celular. En general, la adición de ácidos grasos mejoró la resistencia a los tres inhibidores probados. De forma global este efecto puede deberse a que, como se mencionó previamente, de acuerdo con la teoría de la membrana como sensor de estrés, la fluidez de la membrana participa de forma directa sobre la respuesta a estrés, generando cambios en la composición lipídica que son traducidos en la expresión de genes que participan en la aclimatación a las condiciones ambientales a las que son expuestos los microorganismos (Balogh *et al.*, 2005). Al adicionar los ácidos grasos al medio, después de ser incorporados por las levaduras, estos son activados mediante la reacción con CoA (Black y DiRusso, 2007), de forma que están disponibles para satisfacer las necesidades inmediatas de la célula. De esta forma, al estar presentes en la membrana, están disponibles para generar los cambios que favorezcan la respuesta al estrés que están sometidas las células.

Una de las consecuencias del estrés oxidante no controlado es la lesión de células. Los niveles altos de radicales libres o especies reactivas de oxígeno

(ERO) pueden infligir daño directo a macromoléculas como los lípidos y las proteínas (Ayala *et al.*, 2014). La continua oxidación de ácidos grasos de cadenas laterales y PUFA liberados, y la fragmentación de peróxidos para producir aldehídos, eventualmente conducen a la pérdida de la integridad de la membrana. Por lo tanto, fue de nuestro interés conocer los efectos de la adición de ácidos grasos a levaduras expuestas a estrés por el ácido acético, el etanol y el furfural y la respuesta al estrés oxidante inducido por dichos compuestos.

En el caso de la lipoperoxidación, en las pruebas con los tres inhibidores hubo una marcada reducción de esta reacción al adicionarse los ácidos grasos. Sin embargo, hay una tendencia donde las levaduras, cuyo perfil lipídico se modificó con el ácido linolénico, tuvieron mayor nivel de lipoperoxidación, respecto a las que fueron modificadas con los otros ácidos grasos probados. Esto se debe a que, como es sabido, la susceptibilidad de las membranas biológicas a la peroxidación depende del grado de insaturación de los lípidos que las constituyen, siendo mayor su susceptibilidad conforme aumenta el número de dobles enlaces (Pamplona *et al.*, 2000; Cortés-Rojo *et al.*, 2009). De forma que, al ser el ácido linolénico el que presenta mayor número de insaturaciones, de los cuatro ácidos grasos que fueron probados, es de esperarse que éste favoreció más la lipoperoxidación.

Algunos productos de la lipoperoxidación son aldehídos altamente reactivos como malondialdehído y 4-hidroxinonenal, se forman a partir de la descomposición de hidroperóxidos lipídicos. Estos productos a su vez conducen a la carbonilación de proteínas (Levine, 2002). En el presente trabajo, al adicionar ácidos grasos a las levaduras, se observó una reducción en la lipoperoxidación, por consiguiente, este dato se relacionó con los niveles de carbonilación donde se observa una tendencia, ya que en los casos donde hubo mayor generación de productos de la lipoperoxidación, es decir, al adicionar el ácido linolénico, en general con los tres estresantes se observa mayor generación de daños en las proteínas debido a la carbonilación.

La actividad de la enzima superóxido dismutasa en las levaduras con modificación del perfil lídico, en algunos casos no presentó cambios y en otros presentó incluso menor actividad con respecto a los controles, en condiciones de estrés oxidante inducido por ácido acético, etanol y furfural, por lo que se sugiere que su participación en el control de dicho estrés no es relevante. Este resultado concuerda con el estudio realizado por Lee *et al.* (2015), donde evaluó el transcriptoma de células de levadura tratadas con ácido acético. En dicho estudio no se identificó algún cambio en la regulación de la expresión de genes relacionados con la enzima superóxido dimutasa. Por otro lado, de acuerdo con lo reportado por Costa *et al.* (1992), el estrés inducido por 8% de etanol, no tuvo efecto sobre la actividad de la enzima citosólica CuZn superóxido dismutasa (SOD1), lo que sugiere que el desarrollo de resistencia a concentraciones letales de etanol es independiente de esta defensa antioxidante. En dicho trabajo, además, se encontró que una mutante de *S. cerevisiae*, deficiente en CuZnSOD, tenía una tolerancia al etanol incluso mayor, en comparación con la cepa de tipo salvaje. En otro estudio realizado por Lin *et al.* (2009), se efectuó un análisis comparativo del proteoma para estudiar el perfil de expresión global de proteínas en *S. cerevisiae* en condiciones de tratamiento con furfural. A pesar de que las proteínas que responden al estrés oxidante representan el segundo grupo más grande, entre las proteínas relacionadas con la respuesta al estrés, que mostró cambios de abundancia en presencia de furfural. La enzima superóxido dismutasa SOD1 se sobrerreguló significativamente sólo a los 20 minutos, pero no mostró un cambio de abundancia a las 2 horas en respuesta a la presencia de furfural. Estos datos aunados a los datos obtenidos en el presente estudio sugieren que la actividad de la enzima SOD no es crucial en la detoxificación de furfural por levaduras.

Como lo comprobaron Ludovico *et al.* (2002), Kitagaki *et al.* (2007) y Allen *et al.* (2010), el ácido acético, el etanol y el furfural tienen la capacidad de inducir la producción de ERO en levaduras. En este trabajo se comprobó que la adición de los ácidos grasos oleico y araquídico a la levadura *K. marxianus*, disminuyó la producción de ERO inducida por la adición de estos tres estresantes (Tabla 12, 13

y 14). Además, los resultados de las determinaciones de ERO se relacionan directamente con los obtenidos en los resultados de viabilidad celular, ya que en los casos en los que se redujo la producción de ERO con la adición de los ácidos grasos, las células no redujeron su viabilidad al exponerlas a los distintos estresantes a la concentración de IC50.

10. CONCLUSIÓN

La adición de los ácidos grasos generó cambios en el perfil de los grupos acilo de las membranas, lo cual le confiere mayor resistencia a los estresantes utilizados al reducir los efectos del estrés oxidante.

11. REFERENCIAS

1. Aguilera F, Peinado R.A, Millán C, Ortega J.M y Mauricio J.C. (2006). Relationship between ethanol tolerance, H⁺-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *Int J Food Microbiol.* 110: 34-42.
2. Alexandre H, Ansanay-Galeote V, Dequin S. y Blondin B. (2001). Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 498: 98-103.
3. Alexandre H, Berlot J.P y Charpentier C. (1994). Effect of ethanol on membrane fluidity of protoplasts from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* grown with or without ethanol, measured by fluorescence anisotropy. *Biotechnol. Tech.* 8:295-300.
4. Allen S.A, Clark W, McCaffery J.M, Cai Z, Lanctot A, Slininger P.J, Liu L.Z y Gorsich S.W. (2010). Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels.* 3:2.
5. Almeida J. R. M, Bertilsson M, Gorwa-Grauslund M, Gorsich S y Lidén G. (2009). Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 82: 625-638.
6. Ask M, Bettiga M, Mapelli V y Olsson L. (2013). The influence of HMF and furfural on redox-balance and energy-state of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels.* 6: 22.
7. Attfield P.V. (1997) Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat Biotechnol.* 15: 1351-1357.

8. Ayala A, Muñoz M.F, Argüelles S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014: 1-31.
9. Ayyash M, Algahmia A, Gillespieb J y Oelkers P. (2014). Characterization of a lysophospholipid acyltransferase involved in membrane remodeling in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta.* 1841(4): 505-513.
10. Azhar S.J.M, Abdulla R, Jambo S.A, Marbawi H, Gansau J.A, Faik A.A.M y Rodrigues K.F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: a review. *Biochem Biophys Reports.* 10:52-61.
11. Balat M y Balat H. (2009). Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. *Appl. Energy.* 86: 2273-2282.
12. Balogh G, Horváth I, Nagy E, Hoyk Z, Benkı S, Bensaude O y Vıgh L. (2005). The hyperfluidization of mammalian cell membranes acts as a signal to initiate the heat shock response. *FEBS J.* 272(23): 6077-86.
13. Black P.N. y DiRusso C.C. (2003). Transmembrane movement of exogenous long-chain fatty acids: proteins, enzymes, and vectorial esterification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67(3): 454-472.
14. Black P.N. y DiRusso C.C. (2007). Yeast acyl-CoA synthetases at the crossroads of fatty acid metabolism and regulation. *Biochim Biophys Acta.* 1771: 286-298.
15. Bossie M.A, Martin C.E. (1989). Nutritional regulation of yeast Δ -9 fatty acid desaturase activity. *J. Bact.* 171: 6409-6413.
16. Buege J.A. y Aust S. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52: 302-310.
17. Carman G.M. y Han G.S. (2009). Phosphatidic acid phosphatase, a key enzyme in the regulation of lipid synthesis. *J Biol Chem.* 284(5):2593-7.
18. Carman G.M. y Henry S.A. (2007). Phosphatidic acid plays a central role in the transcriptional regulation of glycerophospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 282(52):37293-7.
19. Carratu L, Franceschelli S, Pardini C.L, Kobayashi G.S, Horvath I, Vıgh L y Maresca B. (1996). Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 3870-3875.
20. Caspeta L, Castillo T y Nielsen J. (2015). Modifying yeast tolerance to inhibitory conditions of ethanol production processes. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3:184.
21. Chatterjee MT, Khalawan SA, Curran BP. (2000). Cellular lipid composition influences stress activation of the yeast general stress response element (STRE). *Microbiology.* 146 (Pt 4):877-84.
22. Choi J.Y, Stucky J, Hwang S.Y, Martin C.E. (1996). Regulatory elements that control transcription activation and unsaturated fatty acid-mediated

- repression of the *Saccharomyces cerevisiae* OLE1 gene. *J. Biol. Chem.* 271:3581-3589.
23. Cortés-Rojo C, Estrada-Villagómez M, Manzo-Ávalos S, Saavedra-Molina A. (2009). Influence of lipoperoxidation over mitochondrial oxidative damage and integrity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Inf. Technol.* 20(2): 71-81.
 24. Costa V, Amorim M.A, Reis E, Quintanilha A. y Moradas-Ferreira, P. (1997). Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. *Microbiology.* 143: 1649-1656.
 25. Costa V, Reis E, Quintanilha A, Moradasferreira P. (1992). Acquisition of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the key role of the mitochondrial superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 300 (2): 608-614.
 26. Demirbas M.F y Balat M. (2006). Recent advances on the production and utilization trends of bio-fuels: a global perspective. *Energy Convers. Manag.* 47:2371-2381.
 27. Dickinson R. J. y Schweizer M. (2004). *The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*. (2a ed.). Londres. CRC Press.
 28. Dinh T.N, Nagahisa K, Hirasawa T, Furusawa C, Shimizu H. (2008). Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* cells to high ethanol concentration and changes in fatty acid composition of membrane and cell size. *PLoS ONE* 3(7): e2623.
 29. Du X. y Takagi H. (2007). N-Acetyltransferase Mpr1 confers ethanol tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen species. *Appl Microbiol Biotechnol.* 75: 1343-1351.
 30. Gasch A.P. (2003). The environmental stress response: a common yeast response to environmental stresses. En: Hohmann S., Mager W.H. (eds) *Yeast Stress Responses. Topics in Current Genetics*, vol 1. Springer, Berlin, Heidelberg.
 31. Gianotti A, Serrazanetti D.I, Sado Kamdem S, Guerzoni M.E. (2008). Involvement of cell fatty acid composition and lipid metabolism in adhesion mechanism of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 123: 9-17.
 32. Gibson B, Lawrence S, Leclaire J, Powell C, Smart K. (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol Rev.* 31(5):535-69.
 33. Gorsich S.W, Dien B.S, Nichols N.N, Slininger P.J, Liu Z.L y Skory C.D. (2006). Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes ZWF1, GND1, RPE1, and TKL1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 71: 339-349.
 34. Goshima T, Masaharu T, Hiroyuki I, Shinichi Y, Tamotsu H. Y Akinori M. (2013). Bioethanol production from lignocellulosic biomass by a novel

- Kluyveromyces marxianus* strain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77(7):1505-1510.
35. Henderson C.M y Block D.E. (2014). Examining the role of membrane lipid composition in determining the ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 8(10): 2966-2972.
 36. Hoekman S.K. (2009). Biofuels in the US-challenges and opportunities. *Renew. Energy.* 34(1):14-22.
 37. Huffer S, Clark M.E, Ning J.C, Blanch H.W y Clark D.S. (2011). Role of alcohols in growth, lipid composition, and membrane fluidity of yeasts, bacteria, and archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:6400-6408.
 38. Jeulin C, Soufir J.C, Weber P, Laval-Martin D. y Calvayrac R. (1989). Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res.* 24:185-196.
 39. Jones R.P. y Greenfield P.F. (1987). Ethanol and the fluidity of the yeast plasma membrane. *Yeast.* 3:223-232.
 40. Kim D. y Hahn J.S. (2013). Roles of Yap1 transcription factor and antioxidants in yeast tolerance to furfural and 5-hydroxymethylfurfural that function as thiol-reactive electrophiles generating oxidative stress. *Appl Environ Microbiol.* 79(16): 5069-5077.
 41. Kitagaki H, Araki Y, Funato K, Shimoi H. (2007). Ethanol-induced death in yeast exhibits features of apoptosis mediated by mitochondrial fission pathway. *FEBS Lett.* 581:2935-2942.
 42. Kumar V, Hart A. J, Keerthiraju E. R, Waldron P.R, Tucker G.A, Greetham D. (2010). Expression of mitochondrial cytochrome c oxidase chaperone gene (*COX20*) improves tolerance to weak acid and oxidative stress during yeast fermentation. *PLoS ONE.* 10(10): e0139129.
 43. Landolfo S, Zara G, Zara S, Budroni M, Ciani M, Mannazzu I. (2010). Oleic acid and ergosterol supplementation mitigates oxidative stress in wine strains. *Int J Food Microbiol.* 141: 229-235.
 44. Lands WE. (1960). Metabolism of glycerolipids. 2. The enzymatic acylation of lysolecithin. *J Biol Chem.* 235:2233-2237.
 45. Leach D.M. y Cowen L.E. (2014). Membrane fluidity and temperature sensing are coupled via circuitry comprised of Ole1, Rsp5, and Hsf1 in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 13 (8): 1077-1084.
 46. Lee K.J, Skotnicki M.L, Tribe D.E y Rogers P.L. (1980). Kinetic studies on a highly productive strain of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* 2: 339-344
 47. Lee K.M, Kalyani D, Tiwari M.K, Kim T.S, Dhiman S.S, Lee J.K, Kim I.W. (2012). Enhanced enzymatic hydrolysis of rice straw by removal of phenolic compounds using a novel laccase from yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour. Technol.* 123:636-645.

48. Lee Y, Nasution O, Choi E, Choi IG, Kim W, Choi W. (2015). Transcriptome analysis of acetic-acid-treated yeast cells identifies a large set of genes whose overexpression or deletion enhances acetic acid tolerance. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99: 6391.
49. Lei J, Zhao X, Ge X, Bai F. (2007). Ethanol tolerance and the variation of plasma membrane composition of yeast floc populations with different size distribution. *J. Biotechnol.* 131: 270-275.
50. Levine R.L, Garland D, Oliver C.N, Amici A, Climent I, Lenz A, Ahn B, Shaltiel S, Stadtman E. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186: 464-78.
51. Levine R.L. (2002) Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med.* 32: 790-796.
52. Lin FM, Qiao B, Yuan Y.J. (2009). Comparative proteomic analysis of tolerance and adaptation of ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* to furfural, a lignocellulosic inhibitory compound. *Appl Environ Microbiol.* 75(11): 3765-3776.
53. Liu Z. L, Slininger P.J, Dien B.S, Berhow M.A, Kurtzman C.P, y Gorsich S. W. (2004). Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 31: 345-352
54. Los D.A. y Murata N. (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochim Biophys Acta.* 1666: 142-157.
55. Ludovico P, Joao Sousa M, Silva M, Leao C y Côrte M. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology.* 147: 2409-2415.
56. Ludovico P, Rodrigues F, Almeida A, Silva M.T, Barrientos A, Côrte M. (2002). Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 13: 2598-2606.
57. Lushchak V, Semchyshyn H, Lushchak O, Mandryk S. (2005). Diethyldithiocarbamate inhibits in vivo Cu, Zn-superoxide dismutase and perturbs free radical processes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338: 1739-1744.
58. Maciel de Mancilha I, Karim M.N. (2003). Evaluation of ion exchange resins for removal of inhibitory compounds from corn stover hydrolyzate for xylitol fermentation. *Biotechnol. Prog.* 19:1837-1841.
59. Martin C.E, Oh C.S, Jiang Y. (2007). Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. *Biochim Biophys Acta.* 1771(3):271-285.
60. Matyash V, Liebisch G, Kurzchalia T.V, Shevchenko A, Schwudke D. (2008). Lipid extraction by methyl-ter-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J. Lipid Res.* 49: 1137-1146.

61. Maulucci G, Cohen O, Daniel B, Sansone A, Petropoulou P.I, Filou S, Spyridonidis S, Pani G, De Spirito M, Chatgialloglu C, Ferreri C, Kypreos K.E. y Sasson S. (2016). Fatty acid-related modulations of membrane fluidity in cells: detection and implications. *Free Radic Res.* 50: S40-S50.
62. McDonough V.M, Stukey J. E y Martin C.E. (1992). Specificity of unsaturated fatty acid-regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* OLE1 gene. *J. Biol. Chem.* 267: 5931-5936.
63. Mejia R, Gomez-Eichelmann M.C. y Fernandez M.S. (1999). *Escherichia coli* membrane fluidity as detected by excimerization of dipyranylpropane: sensitivity to bacterial fatty acid profile. *Arch. Biochem. Biophys.* 368:156-160.
64. Montanari, C., Sado Kamdem, S. L., Serrazanetti, D. I., Etoa, F. X., and Guerzoni M. E. (2010). Synthesis of cyclopropane fatty acids in *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus sanfranciscensis* and their cellular fatty acids changes following short term acid and cold stresses. *Food Microbiol.* 27: 493-502.
65. Morrison W.R. y Smith L.M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.* 5:600-608.
66. Murata N. y Wada H. (1995). Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochem. J.* 308:1-8.
67. Murray R. K, Bender D, Botham K, Kennelly P, Rodwell V, Weil P. (2010). *Harper Bioquímica Ilustrada* (28a ed.). México. Mcgraw-hill.
68. Nigam P.S y Singh A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Prog. Energy Combust. Sci.* 37: 52-68.
69. Palmqvist E y Hahn-Hägerdal B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour Technol.* 74: 25-33.
70. Pamplona R1, Portero-Otín M, Riba D, Requena JR, Thorpe SR, López-Torres M, Barja G. (2000). Low fatty acid unsaturation: a mechanism for lowered lipoperoxidative modification of tissue proteins in mammalian species with long life spans. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 55(6):286-29.
71. Papackova Z y Cahova M. (2015). Fatty acid signaling: the new function of intracellular lipases. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 3831-3855.
72. Pérez-Gallardo R, Briones L, Díaz A, Gutiérrez S, Rodríguez J, Zavala J, Campos J. (2013). Reactive oxygen species production induced by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* increases because of a dysfunctional mitochondrial iron-sulfur cluster assembly system. *FEMS Yeast Res.* 13: 804-819.
73. Renne M.F, Bao X, de Smet C, de Kroon A. (2015). Lipid acyl chain remodeling in yeast. *Lipid Insights.* 8(s1): 33-40.

74. Rodríguez-Vargas S, Sánchez-García A, Martínez-Rivas J. M, Prieto J. A, y Randez-Gil F. (2007). Fluidization of membrane lipids enhances the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to freezing and salt stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 110-116.
75. Saharan K. R y Sharma S. C. (2010). Correlation studies of trehalose with oxidative stress in ethanol stressed yeast *Pachysolen tannophilus*. *Curr. Res. J. Biol. Sci.* 2(5): 300-305.
76. Sangarunlert W, Piumsomboon P, Ngamprasertsith S. (2007). Furfural production by acid hydrolysis and supercritical carbon dioxide extraction from rice husk. *Kor J Chem Eng.* 24:936–941
77. Semchyshyn H, Abrat A, Miedzobrodzki J, Inoue Y, Lushchak V. (2011) Acetate but not propionate induces oxidative stress in bakers' yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Redox rep.* 16:1.
78. Serrazanetti D, Patrignani F, Russo A, Vannini L, Siroli L, Gardini F, y Lanciotti R. (2015). Cell membrane fatty acid changes and desaturase expression of *Saccharomyces bayanus* exposed to high pressure homogenization in relation to the supplementation of exogenous unsaturated fatty acids. *Front. Microbiol.* 6:1105.
79. Van Meerloo J, Kaspers G.J.L. y Cloos J. (2011). Cell sensitivity assays: The MTT assay. *Methods Mol Biol.* 731: 237-245.
80. Vigh L, Escriba P.V, Sonnleitner A, Sonnleitner M, Piotto S, Maresca B, Horváth I, Harwood J.L. (2005). The significance of lipid composition for membrane activity: new concepts and ways of assessing. *Prog. Lipid Res.* 44: 303-344.
81. Volmer R, van der Ploeg K, Ron D. (2013). Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:4628-4633.
82. Wallace V. (2014). Improving stress tolerance in industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from lignocellulosic biomass. Tesis Doctoral. Faculty of Engineering, Lund University, Suecia.
83. Weber M.H, Klein W, Muller L, Niess U.M, Marahiel M.A. (2001). Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock. *Mol. Microbiol.* 39:1321-1329.
84. Wei N, Quarterman J, Rin S, Jamie H.D. y Yong-Su J., (2013). Enhanced biofuel production through coupled acetic acid and xylose consumption by engineered yeast. *Nat. Commun.* 2580.
85. Weydert C.J. y Cullen J.J. (2010). Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc.* 5(1): 51-66.

86. Yomano, L. P., York, S. W. e Ingram L.O. (1998). Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20: 132-138.
87. Zaldivar J, Martinez A, Ingram LO (1999). Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 65:24–33.
88. Zheng D.Q, Wu X.C, Wang P.M, Chi X.Q, Tao X.L, Li P, Jiang X.H, Zhao Y.H. (2011). Drug resistance marker-aided genome shuffling to improve acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 38(3):415-22.
89. Zou Z, DiRusso C.C, Ctrnacta V, Black P.N. (2002). Fatty acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Directed mutagenesis of FAT1 distinguishes the biochemical activities associated with Fat1p. *J Biol Chem.* 277(34) :31062-31071.